

# MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DETECTION ET D'IDENTIFICATION MOLECULAIRE DE L'AVIFAUNE A PARTIR DE PRELEVEMENTS ENVIRONNEMENTAUX

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**AUBIN François**  
Né le 19/05/1995 à 29/03/1994  
à SAINT-PIERRE (974)

**Directeur de thèse : M. Guillaume LE LOC'H**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Christophe PASQUIER**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Guillaume LE LOC'H**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**M. Jean-Luc GUERIN**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITEE :

**Mme Chloé LE GALL LADEVEZE**

Docteure vétérinaire



**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur** : Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, (Emérite) - *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

**PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
 M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
 M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
 M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
 Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
 M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

#### **MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
 Mme **BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
 Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
 Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
 M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
 M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
 Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*  
 Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*  
 Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
 M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*  
 M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
 Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
 Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*  
 Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*  
 Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*  
 Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
 M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
 M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*  
 M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
 Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
 Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*  
 M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
 Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
 M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*  
 Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### **CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS**

- M. **BOLON Pierrick**, *Production et pathologie aviaire*  
 M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*  
 Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*  
 Mme **TOUSSAIN Marion**, *Pathologie des équidés*

#### **ENSEIGNANT DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES VETERINAIRES**

- Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

#### **ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
 M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*  
 M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*  
 M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*  
 M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
 M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*  
 M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

## **Remerciements**

---

### **Au Président du Jury de cette thèse, M. Christophe Pasquier**

Professeur des Universités, Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de  
Toulouse Virologie et bactériologie

Qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Hommages respectueux et sincères remerciements.

### **A M. Guillaume Le Loc'h,**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*

Merci de votre disponibilité, de votre écoute, ainsi que de vos précieux conseils  
qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

### **A M. Jean-Luc Guérin**

Professeur en aviculture et pathologies aviaires

Qui me fait l'honneur d'avoir pris en considération mon travail.

Hommages respectueux et sincères remerciements.

### **A Mme. Chloé Le Gall - Ladeveze**

Docteur vétérinaire

Merci pour l'encadrement tout au long de mes travaux d'études, la disponibilité  
et la bienveillance.

# Table des matières

---

<b>Partie A : Etude bibliographique.....</b>	<b>11</b>
1. Étude globale et pluridisciplinaire des interfaces entre faune sauvage et élevages .....	11
1.1. Enjeux écologiques .....	12
1.1.1. Biodiversité et conservation .....	12
1.1.2. Domaine socio-économique : Conflits entre hommes et faune sauvage .....	13
1.2. Enjeux économiques et sanitaires .....	14
1.2.1. De la faune sauvage à Homme .....	14
1.2.2. De l'Homme à la faune sauvage .....	15
1.3. Étude des interfaces avec la faune sauvage .....	16
1.3.1. Intérêt de l'étude des interfaces avec la faune sauvage .....	16
1.3.2. Méthodes d'étude des interfaces avec la faune sauvage .....	16
2. L'analyse de l'ADN environnemental : méthode ancienne mais récemment démocratisée grâce aux outils de séquençage à haut débit .....	17
2.1. Origine de l'ADN environnemental .....	17
2.2. La persistance de l'ADN dans l'environnement .....	17
2.3. Usages variés de l'ADN environnemental .....	18
2.4. Contraintes liées à l'ADN environnemental, une méthode qui doit être sensible ..	20
2.4.1. Difficultés dans la collecte du milieu contenant l'ADN environnemental .....	20
2.4.1.1. Mise au point sur les méthodes d'échantillonnage et d'extraction possible .....	21
2.4.1.2. Conservation des échantillons d'ADNe .....	24
2.4.2. Les inhibiteurs de PCR présents dans l'environnement .....	24
2.4.2.1. Les mécanismes .....	25
2.4.2.2. Limiter la présence d'inhibiteurs et stratégies possibles .....	25
2.4.2.3. Contrôler la présence d'inhibiteurs .....	29
2.4.3. Bilan .....	29
3. Du barcoding au metabarcoding .....	30
3.1. Le barcoding pour référencer génétiquement la biodiversité .....	30
3.2. Le séquençage et les bases de données de références .....	32
3.3. Le metabarcoding pour identifier par des méthodes haut débit les espèces en présence .....	33
3.3.1. Les applications du barcoding et du metabarcoding .....	34
3.3.1.1. Le barcoding au service de la compréhension de la biodiversité passée .....	34
3.3.1.2. Le metabarcoding au service de la conservation et de l'étude de la biodiversité .....	34
3.3.2. Confrontation aux méthodes conventionnelles d'étude des interfaces avec la faune sauvage .....	35
4. Étude de l'ADNe à l'interface entre avifaune et élevages avicoles .....	36

4.1.	Les travaux sur l'étude des interfaces entre avifaune et élevages avicoles à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.....	36
4.2.	Contexte de l'étude .....	36
4.3.	Avantages et défis de la méthode à mettre au point .....	37
4.4.	Méthode et stratégie de travail .....	38
<b>Partie B : Etude expérimentale .....</b>		<b>39</b>
5.	Matériel et méthode .....	39
5.1.	Description du site de l'étude .....	39
5.2.	Choix de la matrice et collecte des échantillons.....	39
5.2.1.	Matrices d'ADNe sur le site d'étude .....	39
5.2.2.	Collecte d'espèces aviaires de référence.....	40
5.2.3.	Préparation et concentration des échantillons .....	40
5.3.	Extraction et purification de l'ADN .....	42
5.3.1.	Fèces fraîches .....	42
5.3.2.	Muscle .....	43
5.4.	Filtrations de solutions aqueuses .....	43
5.5.	Amplification des séquences par PCR.....	43
5.5.1.	Sélection des couples d'amorces .....	43
5.5.2.	PCR conventionnelle .....	44
5.5.3.	PCR quantitative.....	45
5.5.4.	Contrôles positifs.....	45
5.6.	Purification et séquençage.....	46
5.7.	Sélection des espèces de référence .....	47
5.8.	Production d'une gamme de contrôles positifs .....	48
5.9.	Optimisation de la méthode PCR .....	49
5.9.1.	Analyse de la spécificité .....	49
5.9.2.	Analyse de la sensibilité.....	50
5.9.3.	Quantification/détermination de la qualité de l'ADN.....	51
6.	Résultats .....	52
6.1.	Performance des extractions selon la matrice utilisée .....	52
6.2.	Préparation et concentration des matrices.....	53
6.2.1.	Tests des filtres sur fèces diluées.....	53
6.2.2.	Test des filtres sur fèces en boue artificielle .....	54
6.3.	Purification et extraction des ADN.....	54
6.4.	Choix des amorces et évaluation de leur spécificités sur les espèces d'intérêt.....	56
6.5.	Optimisation de la sensibilité du protocole PCR.....	59
7.	Discussion .....	61
7.1.	Méthode.....	61
7.1.1.	Préparation des échantillons, purifications et extractions .....	61
7.1.2.	Amplification des séquences par PCR.....	62
7.1.3.	Séquençage de l'ADN amplifié et spécificité .....	63
7.2.	Optimisation de la méthode.....	64
7.2.1.	Ajout d'un contrôle positif et fabrication d'une gamme plasmidique.....	64
7.2.2.	S'affranchir des ADN de canard surnuméraires.....	64
7.3.	Résultats et biais possibles .....	65

7.4. Conclusion et perspectives .....	66
<b>Annexe 1: protocole d'extraction à partir de tissu frais. ....</b>	<b>85</b>
<b>Annexe 2: protocole d'extraction d'ADN génomique à partir du kit d'extraction One4all® de Biobasic Canada INC.....</b>	<b>86</b>
<b>Annexe 3. Protocole modifié d'extraction à partir du kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini kit .....</b>	<b>87</b>
<b>Annexe 4 : Fiche de synthèse du protocole proposé pour une application sur le terrain</b>	<b>88</b>



## Liste des figures, des tableaux et des annexes

---

Figure 1 : Interactions, facteurs favorisant la transmission d'agents pathogènes et interfaces entre la faune sauvage/l'homme/les animaux domestiques, principe One Health inspiré de (Daszak et al. 2000).....	12
Figure 2 : Schéma représentant une séquence cible type de barcoding (inspiré de (Taberlet et al. 2018)).....	31
Figure 3 : Nombre de publications (en ordonnée) selon le mot clé sur les 10 dernières années sur le moteur de recherche Pubmed®.....	33
Figure 4 : zones de parcours et de prélèvement des échantillons sur le terrain (photo C.Legall Ladeveze ©).....	39
Figure 5 : Exemple de chromatogramme exploitable.....	47
Figure 6 : Exemple de reconstruction d'une séquence (FS2- buse variable) à partir des séquences brutes.....	47
Figure 7 Séquence de Buse variable (Buteo buteo) obtenues avec les amorces AVES 02 et comparée données de GenBank© .....	49
Figure 8: Figure 5 Différences entre une séquence obtenues et les séquences présentes dans GenBank© .....	50
Figure 9 : Classement des séquences par pourcentage d'identité avec la séquence testée avec Blast© de NCBI .....	50
Figure 10 : Exemple de courbes d'amplification obtenues par PCR quantitative (amorces AVES 02) à partir d'ADN issu de différentes matrices. ....	52
Figure 11 : Résultat des PCR réalisées sur différentes dilutions filtrées avant extraction de fèces réalisés en duplicats (amorce Ltyr).....	53
Figure 12 comparaison de l'efficacité d'extraction d'un filtre (courbes d'amplification : rouge extraction à partir de filtre, bleus sur filtrat) -chaque courbe correspond à un degré de dilution (en duplicat), résultats d'amplification par PCR quantitative.....	53
Figure 13 : Comparaison des seuils d'amplification (rouge avec tampon phosphaté, bleu sans tampon phosphaté), les courbes correspondant au résultats de PCR quantitative en utilisant l'amorce AVES 02 à partir d'échantillons boueux contenant 50 mg de fèces .....	54
Figure 14: Résultat de PCR visualisés sur gel d'électrophorèse pour la comparaison des seuils de détection selon le kit d'extraction utilisé. Tpos : témoin positif (ADN extrait de muscles), chaque échantillon est traité en duplicat et amplifiés par .....	55
Figure 15 : Gamme de température d'hybridation (Tm) sur les paires d'amorces Aves 01,02 et 03 à partir d'échantillons musculaires de perruche. (bleu: Aves 01, jaune Aves 02 ; vert Aves 03 ; rouge : témoin négatif avec dimère d'amorce) chaque courbe correspond à une température d'hybridation différente.....	59
Figure 16 : Courbe d'amplification (a) et courbe de fusion (b) obtenu par amplification de la gamme plasmidique.....	60

Tableau 1 Amorces spécifiques à l'identification d'espèces aviaires utilisables en PCR conventionnelle .....	43
Tableau 2 Liste des espèces ciblées dans l'étude ( bleu: échantillons issus de fèces ; rouge: échantillons issus de tissus musculaires) pour tester la méthode.....	48
Tableau 3 Tableau 3 : Ct obtenu après amplification d'une gamme plasmidique à l'aide de l'amorce Aves 02 .....	61

## Acronymes

---

**Bp/pb** : Base pair/Pair de base

**Ct** : cycling threshold

**PCR** : Polymerase chain reaction

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNe** : ADN environnemental

**ADNm** : AND mitochondrial

**NGS** : Next generation sequencing, Séquençage de Nouvelle Génération ou haut débit

**OIE** : Organisation mondiale de la santé animale.

**qPCR** : Quantitative polymerase chain reaction

# Partie A : Etude bibliographique

---

## 1. Étude globale et pluridisciplinaire des interfaces entre faune sauvage et élevages

En occident, les changements dans la manière d'occuper l'espace par l'Homme ont modifié progressivement ses interactions ainsi que ses contacts avec la faune sauvage. Une précipitation de ces changements a eu lieu au cours du siècle dernier à l'occasion de la croissance exponentielle de la population mondiale et de l'urbanisation (Hassell et al. 2017). L'industrialisation a eu pour conséquence l'intensification de l'activité anthropique de manière générale, et plus spécifiquement de l'élevage. En réaction, il est observé au niveau des filières agricoles un accroissement des intérêts en faveur d'une évolution vers des modes d'élevages responsables (labels ou Bio®, agroécologie...) (Demaison 2017 ; Pautard 2016), ou de type extensif/moins intensif (se vérifiant en élevage aviaires et porcins principalement) (Poulette 2018). De même, on observe une évolution des pratiques d'amélioration du bien-être animal, gages de qualité mais qui ont tendance à augmenter par ailleurs les contacts potentiels avec la biodiversité extérieure et amènent de nouvelles problématiques sanitaires (Kruse et al. 2004).

L'étude de ces interfaces doit permettre à terme d'adapter la gestion des crises le plus précocement et le plus ciblé possible. Ces épisodes présentent des enjeux sanitaires mais également économiques et écologiques. Ici nous nous intéresserons plus particulièrement à l'enjeu lié aux interfaces sauvage / domestique comme de nombreux auteurs l'ont fait auparavant. (Phouratsamay 2018 ; Huggins et al. 2020 ; Naguib et al. 2019 ; Tsiodras et al. 2008 ; Cappelle et al. 2011 ; Kukielka et al. 2016 ; Gortazar et al. 2015 ; Siembieda et al. 2011 ; Rossi et al. 2019 ; Daszak et al. 2000).

L'implication de la faune sauvage dans l'émergence de ces crises sanitaires a interpellé les politiques, amenant à mettre en place des dispositifs pour gérer ces menaces. Une manière de penser plus globale et moins anthropocentrée a vu le jour via une conception de la santé publique humaine liant la faune sauvage et l'Homme selon le principe *One health*, une seule santé. Ce concept est entré dans la politique publique actuelle il y a 10 ans. Il intègre ainsi plusieurs réservoirs (animal, environnemental et humains) et les enjeux sanitaires de chacun sont pris en compte afin d'avoir une approche globale, chaque réservoir étant susceptible d'influencer les autres par les interactions et liens qui existent entre eux via les interfaces notamment (fig 1.) (Destoumieux-Garzón et al. 2018).

À partir de cette politique *One health*, l'introduction de la santé animale dans la surveillance et le suivi des grandes catastrophes sanitaires à fort impact médico-social et économiques a, par exemple, poussé l'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale) à créer une branche d'activité WAHIS-wild (*World Animal Health Information System*) depuis 2013, dont le rôle est la surveillance sanitaire de la faune sauvage (Ben Jebara et al. 2016).

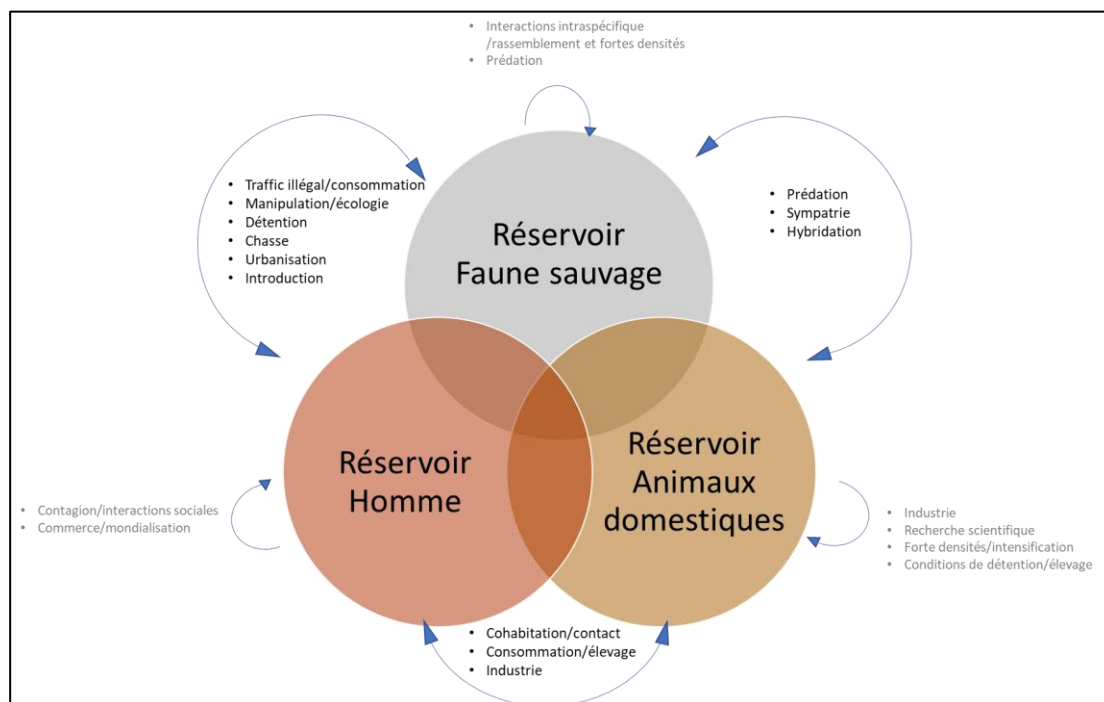


Figure 1 : Interactions, facteurs favorisant la transmission d'agents pathogènes et interfaces entre la faune sauvage/l'homme/les animaux domestiques, principe One Health inspiré de (Daszak et al. 2000)

De nombreux facteurs sont impliqués dans l'émergence de nouvelles interfaces et sont présentés dans les paragraphes suivants.

## 1.1. Enjeux écologiques

### 1.1.1. Biodiversité et conservation

L'extinction de masse que nous traversons actuellement et l'accélération du déclin des espèces multiplié par 100 à 1000 par rapport à la période préhumaine démontre l'influence majeure de l'Homme sur l'ensemble de la biosphère (Pimm 1995).

Parmi les activités ayant un impact direct sur les interfaces entre l'homme et la faune sauvage on peut citer le trafic illégal d'animaux ou de produits dérivés ainsi que la chasse. Par définition moins contrôlé en quantité et en qualité que la chasse légale, le trafic illégal par exemple découle de nombreuses motivations : pour une subsistance alimentaire, par ornement, collection et détention, ou par croyances médicinales (Alexander, Sanderson 2017 ; Gonçalves et al. 2015 ; Yang et al. 2018 ; Asis et al. 2016).

On peut citer comme exemple d'espèce victime actuellement du braconnage, les rhinocéros et les éléphants qui font l'objet de plans de reproduction et de réintroduction (Hermes et al. 2007). Plus pertinent en termes de conséquence sanitaire nous intéressant ici, on peut citer les pangolins (Zhang et al. 2020 ; Tiwari et al. 2020), les civettes ou encore les chauves-souris utilisés comme viande de brousse et étant à l'origine probable de transmission d'agents pathogènes majeurs à l'homme (Ordaz-Németh et al. 2017).

Le trafic illégal n'est pas la seule activité humaine susceptible de bouleverser les écosystèmes. L'expansion des surfaces agricoles est une cause majeure d'expansion des interfaces, en réduisant drastiquement les territoires disponibles pour les espèces sauvages, et ce faisant les niches écologiques disponibles, les amenant à s'adapter à une vie plus proche des lieux anthropisés. On peut citer comme écosystème particulièrement impacté les forêts d'Amazonie (Vieira et al. 2008) ou du Congo (Lange et al. 2016) et comme espèces concernées par ces activités certains grands singes comme les bonobos et les orangs-outangs (Lange et al. 2016) ou encore les pandas en Asie (Wei et al. 2015).

### **1.1.2. Domaine socio-économique : Conflits entre hommes et faune sauvage**

Outre l'impact négatif sur la conservation de la biodiversité, les interactions entre activités humaines et faune sauvage peuvent se traduire également par des conflits que la proximité grandissante peut exacerber. Des relations de compétition pour une ressource ou un territoire ou des relations de prédatons entre des espèces existent, l'Homme et les animaux domestiques ne font pas exception. Les exemples de relations conflictuelles ne sont pas rares et on peut citer entre autres les conflits liés aux espèces prédatrices (ex. loups et ours en France, éléphants et léopards au Népal (Acharya et al. 2016)). Ce type de conflit est lié le plus souvent à la prédation dans les élevages et à l'impact néfaste qui en découle sur les cheptels (Lute et al. 2016 ; Grande et al. 2018).

## **1.2. Enjeux économiques et sanitaires**

### **1.2.1. De la faune sauvage à Homme**

Sur le plan sanitaire, une multitude de maladies émergentes humaines sont issues de la faune sauvage, certaines étant parfois à l'origine de crises majeures. Historiquement, on peut rappeler la crise de la grippe espagnole ayant fait près de 50 millions de victimes au début du XX<sup>ème</sup> siècle et qui a été provoquée par un virus influenza H1N1 issu de l'avifaune (Mahardika et al. 2019). D'autres émergences n'ont pas eu d'impact en santé publique mais sur le secteur économique des filières d'élevage. On peut citer par exemple l'influenza aviaire (dont le réservoir d'origine est l'avifaune sauvage) ou la peste porcine africaine (réservoir d'origine : porcs et sangliers) (Jones et al. 2008 ; Miller et al. 2013 ; Siembieda et al. 2011 ; Decker et al. 2010 ; Ferguson et al. 2001).

La transmission d'un agent infectieux depuis une population sauvage réservoir à un hôte domestique (élevages, animaux domestiques) ou humain se fait par adaptation de l'agent à l'hôte, plus ou moins directement selon la proximité phylogénique des espèces. Les populations d'animaux d'élevage constituant des réservoirs homogènes et de taille très importante, elles représentent alors de véritables incubateurs pour le nouvel agent infectieux. Éventuellement, cette multiplication de l'agent en élevage associée à de potentielles mutations permettent le passage à un hôte humain, facilité par les liens étroits qu'ils entretiennent, et entraînant potentiellement une maladie émergente de gravité variable pour la santé publique.

Ainsi un point clé de la transmission des agents pathogènes est le passage du réservoir sauvage au réservoir domestique. Les interfaces entre faune sauvage et animaux d'élevages ont toujours existé mais ont été largement réduites par l'intensification des systèmes d'élevage et la systématisation des mesures de biosécurité au cours de la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Elles semblent néanmoins aujourd'hui revenir au-devant de la scène, ainsi que les risques sanitaires qui en découlent, en lien avec l'évolution des modes d'élevage plus soucieux du bien-être animal et de leur impact environnemental, mais également en lien avec l'anthropisation et l'urbanisation croissantes des territoires (Hassell et al. 2017 ; Siembieda et al. 2011).

Il a été montré que la déforestation, l'expansion des territoires occupés par les animaux domestiques et l'exploitation de la faune sauvage (viande de brousse) sont liées à la transmission d'agents pathogènes responsables de nouvelles maladies humaines, comme par exemple les virus Marburg et Ebola, d'origine simienne (Aylward 2014), le SARS-CoV1 en 2002 à Hong-Kong issu de civette palmistes et de chauve-souris (Lee et al. 2003) ou le SARS CoV2 dont l'origine n'est pas encore totalement connue (Daszak et al. 2000 ; Morse 1995 ; Tiwari et al. 2020). Des données de la littérature ont ainsi estimé que 80% des maladies émergentes sont des zoonoses et que la plupart sont issues de l'interaction avec la faune sauvage (Miller et al. 2013 ; Cleaveland et al. 2001 ; Jones et al. 2008). Des conséquences sanitaires à impact économique touchant strictement les animaux d'élevages en découlent également comme dans les cas des crises d'influenza aviaire (Cook 2005), de la tuberculose, de la peste porcine africaine ou de la fièvre aphteuse (De Garine-Wichatitsky 2014).

### **1.2.2. De l'Homme à la faune sauvage**

Les échanges d'agents infectieux peuvent se faire dans les deux sens, et l'homme ou les espèces domestiques peuvent être réservoirs pour la faune sauvage. En effet, une forte proportion des agents pathogènes d'élevage (77%) et des agents pathogènes de carnivores domestiques (91%) ont plusieurs hôtes possibles dont des espèces sauvages. Il sont donc susceptibles de menacer la biodiversité et la pérennité de certaines espèces sauvages (Cleaveland et al. 2001 ; Daszak et al. 2000). Des extinctions locales ou du moins un affaiblissement et une diminution de la résilience des populations à certaines épizooties ont déjà été observées à la suite de transmissions d'agents pathogènes depuis les animaux domestiques (Woodroffe 1999 ; McCallum, Dobson 1995). Un exemple intéressant est le déclin rapide de la population de lycaons (*Lycaon pictus*) en Afrique depuis 1960, avec notamment une extinction locale observée au Serengeti en 1991 concomitante à une épizootie de maladie carré et de rage au sein de la population de chien sympatrique (Flacke et al. 2013).

De manière synthétique, il en ressort par ces enjeux sanitaires que caractériser les interactions spatio-temporelles entre la faune sauvage et les animaux domestiques est essentiel à la compréhension des dynamiques épidémiologiques.

### **1.3. Étude des interfaces avec la faune sauvage**

#### **1.3.1. Intérêt de l'étude des interfaces avec la faune sauvage**

Afin de comprendre la transmission d'agents infectieux entre des populations notamment domestiques et sauvages, il faut dans un premier temps caractériser ces différentes populations puis connaître les types de contacts existants entre elles (directs ou indirects via l'environnement partagé), dans quelles conditions ces contacts s'établissent et quels en sont les facteurs favorisants. Cette connaissance permettra ensuite de cibler les mesures de surveillance et de biosécurité en fonction des risques principaux pour la transmission.

#### **1.3.2. Méthodes d'étude des interfaces avec la faune sauvage**

De nombreuses méthodes ont été mises au point afin d'étudier ces interfaces. Elles sont souvent complémentaires et possèdent leurs avantages et inconvénients propres. Il existe une dichotomie dans les méthodes actuelles utilisées :

- Les méthodes d'observation directe, standardisées par un protocole prédéfini (Hamede et al. 2009 ; Richomme et al. 2006).
- Les méthodes d'observation indirecte : pièges photographiques (Kukielka et al. 2013), vidéosurveillance (Elbers, Gonzales 2020), recherche de signes indirects de passage tels que les empreintes ou les traces ADN (fèces, phanères).

Il s'agit cependant de méthodes coûteuses et chronophages, nécessitant l'investissement de moyens humains et financiers parfois importants. C'est pourquoi une équipe de l'université de Melbourne en Australie a comparé les différences et l'avantage de l'usage de méthodes plus récentes par rapport aux méthodes traditionnelles, faisant état des intérêts majeurs liés au développement de méthodes nouvelles (Smart et al. 2016). Ainsi une course à la recherche de méthodes toujours plus performantes a conduit depuis plus de trente ans au développement de nouveaux outils tel que la recherche et identification d'ADN environnemental (ADNe). C'est dans cet axe que s'inscrit notre étude.



## **2. L'analyse de l'ADN environnemental : méthode ancienne mais récemment démocratisée grâce aux outils de séquençage à haut débit**

### **2.1. Origine de l'ADN environnemental**

Il convient de définir correctement l'ADN environnemental (ADNe). Il s'agit de l'ensemble de l'ADN collecté à partir d'un échantillon environnemental (fèces, eau, sédiments ou sol), ou de toute matière récupérée par filtration préalable d'air, d'eau, ou des matériaux de surface (Taberlet et al. 2012). L'ADN provient d'une espèce hôte, soit via la présence de restes de son organisme dans le cas de cadavres (exemple notamment des microorganismes), soit via des éléments tissulaires qu'elle a pu déposer directement sur son passage (phanères, cellules épithéliales) soit via ses excréments ou urines. L'ADNe tel qu'il est trouvé après ce dépôt a pu subir des dégradations réduisant ainsi la quantité exploitable pour l'identification. Il se présente en général en une part intracellulaire et une part extracellulaire (Siuda, Chróst 2000). Le type de matériel génétique visé, ADNe libre ou intra cellulaire, conditionnera la méthodes d'isolation et d'analyse utilisées due notamment à leur capacité de persistance dans l'environnement et leur accessibilité (liée à des particules ou isolée dans des structures biologiques) (Nagler et al. 2018 ; Pietramellara et al. 2008 ; Levy-Booth et al. 2007).

### **2.2. La persistance de l'ADN dans l'environnement**

L'étude de l'ADNe est rendue difficile par sa disponibilité et son caractère éphémère, celui-ci étant soumis aux conditions physico-chimiques et biologiques de l'environnement qui peuvent le dégrader. Des phénomènes de dispersion et de diffusion en milieu aqueux sont aussi susceptibles de se produire diminuant les concentrations attendues au fil du temps (Goldberg et al. 2018). On comprend alors que disposer d'une méthode très sensible est une condition *sine qua non* dans l'étude de l'ADNe. En revanche une grande sensibilité de détection posera des contraintes liées aux contaminations possibles, même très faibles, lors des différentes étapes de manipulation des échantillons.

Les mécanismes de persistance de l'ADN dans l'environnement nécessitent d'être bien compris. Il existe en effet des variations importantes de vitesse de dégradation de l'ADN selon les conditions environnementales et l'espèce. Les études concernant la dégradation de l'ADN dans l'environnement ont montré que celui-ci pouvait persister jusqu'à plusieurs millions d'années dans les sédiments (Thomsen, Willerslev 2015a). Il a aussi été estimé que de l'ADN bactérien âgé d'entre 400 000 ans et 1,5 millions d'années est encore détectable dans le permafrost (Willerslev et al. 2004).

D'autres études montrent en revanche une persistance de l'ADN de seulement quelques semaines en milieu aquatique (Dejean et al. 2011 ; Thomsen, Kielgast, Iversen, Wiuf, Rasmussen, M. Thomas P Gilbert, et al. 2012). L'hypothèse mise en avant concernant cette dégradation rapide en milieu aqueux serait qu'elle est liée à l'activité microbienne principalement, les conditions physico-chimiques de dégradation (pH, température, UV) étant corrélées aux paramètres optimaux de développement de la vie microbienne (Strickler et al. 2015 ; Jo et al. 2019). Il en ressort que l'ADN en milieu aqueux commence à se dégrader immédiatement après la mort de la cellule et ce de manière exponentielle au fil du temps (Barnes et al. 2014 ; Moushomi et al. 2019 ; Goldberg et al. 2011). Ceci devra être pris en compte dans les étapes de préparation (pores de filtration à faible diamètre) et d'analyse des échantillons (courtes séquences cibles), afin d'atténuer au maximum la perte de détectabilité induite par la dégradation (Deagle et al. 2006 ; Rees et al. 2014 ; Piaggio et al. 2014a ; Moushomi et al. 2019).

En conclusion, la dégradation de l'ADNe dans un milieu donné est difficile à estimer en quantité et en qualité étant donné le nombre de paramètres physiques, chimiques et biologiques entrant en jeu. Des études réalisées dans différents milieux seraient nécessaires et l'on comprend d'autant mieux la nécessité d'études préliminaires lorsque l'on s'intéresse au dosage de l'ADNe dans un milieu spécifique.

### **2.3. Usages variés de l'ADN environnemental**

Depuis quelques dizaines d'années la communauté scientifique met peu à peu au jour la diversité d'informations que recèle l'ADNe et les travaux se multiplient. Cet intérêt s'est vu décuplé et démocratisé notamment grâce au développement du séquençage haut débit.

En tant que traces et indices de passages laissés par un individu, l'ADNe a été majoritairement utilisé dans le domaine de l'écologie de la conservation et constitue un outil prometteur (Kress et al. 2015). Il s'agit d'une avancée dans l'étude de la biodiversité en permettant de manière plus précoce la détection d'espèces invasives ou pour détecter finement la présence d'espèces rares (Jerde et al. 2011b ; Wilcox et al. 2013 ; Doi et al. 2017 ; Harper et al. 2019 ; Piaggio et al. 2014b ; Hunter et al. 2015 ; Dejean et al. 2012).

Historiquement les 1<sup>ers</sup> usages de l'ADNe datent de 1987 dans le cadre d'une étude réalisée en paléoécologie sur des micro-organismes dans des sédiments (Ogram et al. 1987). Les études suivantes, durant la première quinzaine d'année, se sont intéressées essentiellement aux microorganismes. Quelques études en médecine légale se sont aussi intéressées à la persistance de l'ADN soumis à diverses contraintes environnementales (Schwartz et al. 1991).

Les premières études s'intéressant aux macro-organismes datent seulement de 2003 sur les traces d'ADN retrouvés dans le permafrost (Willerslev et al. 2003).

L'ADNe dans les sédiments est étudié généralement en paléoécologie dans une optique de compréhension des dynamiques d'apparition et de disparition des espèces anciennes et pour ensuite permettre la préservation des espèces présentes en comprenant les aléas susceptibles d'impacter considérablement la biodiversité. (Thomsen, Willerslev 2015b ; 2015b ; Pimm 1995).

Par la suite une des premières applications majeures dans le domaine de l'écologie et l'étude des écosystèmes a été l'étude de la faune marine à partir de prélèvements aquatiques, domaine jusqu'alors méconnu à cause de la difficulté d'accès à l'information (Taberlet et al. 2018).

Un outil développé ultérieurement a eu une application majeure dans l'analyse de l'ADNe et plus précisément dans la distinction taxonomique des espèces, il s'agit du barcoding. La méthode repose sur la présence au sein des génomes d'un locus ou de plusieurs loci à la fois conservés entre les être-vivants mais suffisamment mutés pour permettre l'identification au niveau de l'espèce. La confrontation d'une séquence inconnue au sein d'un échantillon à la base de données de séquences connues permet éventuellement l'identification de l'espèce d'origine. (Bączkiewicz et al. 2017 ; Kress et al. 2015).

Un autre enjeu majeur du barcoding est la possibilité de l'utiliser pour évaluer l'abondance relative des espèces dans un milieu. Pour l'instant, il s'agit d'un objectif non atteint. Ainsi, une étude en 2015 a montré que l'efficacité d'une PCR donnée variait beaucoup suivant l'espèce ce qui rendait difficile l'évaluation d'une abondance d'espèce dans un milieu donné et permettait de manière fiable d'en indiquer uniquement l'absence ou la présence (Elbrecht, Leese 2015). Une méta-analyse récente à partir de la littérature disponible étudiant la quantification de la biomasse par le barcoding a conclu qu'il s'agissait d'une application à proscrire en l'état actuel des choses (Lamb et al. 2019).

Ces applications aussi variées ont conduit à un accroissement de l'intérêt scientifique mais également de l'intérêt des politiques et des citoyens par l'éveil collectif quant aux enjeux de préservation de la biodiversité. Des moyens financiers et une communauté scientifique ont été mobilisés autour du sujet. Un exemple des plus probants est le récent projet iBOL (international Barcoding Of Life) initié par le Royaume Uni en 2010 ayant pour objectif de générer des séquences de référence (« barcodes ») pour 500 000 espèces. Aujourd'hui le projet ne compte pas moins de 35 pays participants. (Adamowicz 2015).

Ainsi, le matériel génétique environnemental présente de multiples usages tels que la recherche d'agents infectieux, la recherche d'une espèce cible (cryptique ou invasive) dans le cadre d'un suivi de population ou d'une étude taxonomique ou encore la description d'un écosystème.

## **2.4. Contraintes liées à l'ADN environnemental, une méthode qui doit être sensible**

Les conditions auxquelles est soumis l'ADNe sont à l'origine de la difficulté d'analyse et d'extraction du matériel génétique qui est en faible quantité et peu accessible selon la matrice (contaminants, particules, richesse en matériels génétiques accessoires). Cela impose des méthodes spécifiques d'extraction (usage d'une grande quantité de matrice initiale) et de traitement des échantillons (concentration et purification).

L'ADNe est présent dans des matières complexes, en faible concentration, plus ou moins dégradé, formé de fragments d'ADN d'une multitude d'organismes et de fait plus difficile à analyser que de l'ADN extrait directement de tissus frais. Ainsi l'usage de l'ADNe issus des sols est amené à se développer mais demeure aujourd'hui un challenge de par les nombreux aspects techniques non maîtrisés (Taberlet et al. 2018).

De nombreuses études préliminaires s'intéressant à l'ADNe des sols ont été publiées, et de nombreuses applications ont été testées avec plus ou moins de succès. Les écueils potentiels sont nombreux, ce qui nécessite une mise au point méthodologique avant toute exploitation d'ADNe. Cette mise au point a fait l'objet des travaux réalisés pour la présente thèse.

### **2.4.1. Difficultés dans la collecte du milieu contenant l'ADN environnemental**

La difficulté première de la manipulation de l'ADNe est l'accessibilité des échantillons et leur collecte.

Selon les questions de recherche, différents échantillons environnementaux sont utilisés :

- Aquatique dans l'étude du microbiote, des vertébrés aquatiques et d'espèces invasives (Dejean et al. 2012 ; Hunter et al. 2015 ; Jerde et al. 2011b ; Thomsen, Kielgast, Iversen, Wiuf, Rasmussen, M. Thomas P. Gilbert, et al. 2012).
- Sols récents dans l'étude et la comparaison des communautés bactériennes et de la biodiversité (Smets et al. 2016 ; Tringe et al. 2005).
- Permafrost et sédiments dans l'étude de la biodiversité passée (Wei et al. 2019 ; Thomsen, Willerslev 2015b).

- Fèces dans l'étude de la diététique (Kumari et al. 2019 ; Andriollo et al. 2019 ; De Barba et al. 2014).

Du fait de la récolte des échantillons parfois à grandes distances des laboratoires d'analyse, un délai plus ou moins conséquent existe entre le moment de l'échantillonnage et l'analyse, ce qui nécessite la mise en place de moyens de conservation des échantillons ou la réalisation sur le terrain de certaines étapes de préparation à la conservation (filtration, élimination de parties indésirables...), pouvant poser des problèmes de contamination et des contraintes logistiques.

#### **2.4.1.1. Mise au point sur les méthodes d'échantillonnage et d'extraction possible**

Lorsqu'une forte hétérogénéité est suspectée dans la zone de prélèvement, et si l'on veut balayer de manière complète et optimale cette zone, il est notamment possible et intéressant de sous-échantillonner afin d'estimer une variance liée à l'hétérogénéité locale puis de mélanger ces échantillons pour un traitement ultérieur (Prosser 2010).

#### **Sur surface lisse/peu souillée**

Une méthode décrite pour l'échantillonnage dans ce cas est dérivée de protocoles utilisés en biosécurité et en contrôle sanitaire alimentaire. Il s'agit de la méthode de prélèvement sur chiffonnettes pour la recherche de bactéries pathogènes qui a montré des résultats satisfaisants (Soria et al. 2017). Une autre étude dans la détection d'ADNe issus de fèces de mammifères africains utilise des écouvillons (Tighe et al. 2020).

Voici un exemple de protocole issu d'une étude réalisée en 2015 par Bowman et son équipe dans le cadre de prélèvements bactériens pour une application en biosécurité (Bowman et al. 2016), ainsi que d'une étude de 2017 réalisée par Soria pour la recherche de salmonelles dans un élevage de poules pondeuses (Soria et al. 2017). Concrètement, une compresse stérile humidifiée de PBS (*phosphate buffered saline*) ou d'eau stérile est utilisée pour balayer une surface de taille standardisée. L'ajout ultérieur d'eau stérile ou de PBS permet de diluer l'ADNe puis une centrifugation est utilisée afin de concentrer ce dernier avant conservation par le froid.

#### **Sur échantillon aquatique**

Comme le matériel génétique est généralement très dilué dans un prélèvement aquatique, il est nécessaire de le concentrer, simultanément au prélèvement ou après. Cette concentration peut se faire par centrifugation ou par filtration.

Deux stratégies sont possibles :

1. Filtration avec l'aide de pompes électriques ou mécaniques pour des grands volumes ou pour des prélèvements à turbidité importante ; ou avec système de type seringue à filtre pour de petits volumes (Moushomi et al. 2019) ;
2. Pour des volumes modérés, le prélèvement non filtré peut aussi être concentré par ultracentrifugation ou centrifugation simple (Valiere, Taberlet 2000). Le surnageant est ensuite éliminé puis les débris soumis à une extraction classique en débutant par une lyse avec des protéinases. Une étude publiée en 2017 par une équipe japonaise a montré que l'extraction pouvait se faire sans préoccupation particulière pour le pH et qu'un traitement à base de protéinase K pouvait être utile (Tsuji et al. 2017).

Cependant la filtration a, dans plusieurs études, été montrée comme plus performante que la centrifugation/précipitation pour concentrer les ADNe (Deiner et al. 2015 ; Eichmiller et al. 2016 ; Spens et al. 2017).

Le choix de la méthode de captage est dépendant du type d'ADN ciblé. En effet, on peut rappeler que l'ADNe est présent sous plusieurs formes : une forme intracellulaire et une forme extracellulaire, libre ou adsorbée à des particules environnementales (Siuda, Chróst 2000). Ceci conditionne le fait qu'on va choisir plutôt une méthode de précipitation ou centrifugation si l'on vise une forme intracellulaire ou adsorbé (Ficetola et al. 2008 ; Thomsen, Kielgast, Iversen, Wiuf, Rasmussen, M. Thomas P Gilbert, et al. 2012 ; Foote et al. 2012) ou de filtration si l'on vise un ADN libre (Goldberg et al. 2011 ; Jerde et al. 2011a ; Thomsen, Kielgast, Iversen, Møller, Rasmussen, Eske Willerslev 2012).

De nombreuses études suggèrent que l'ADNe est certes constitué d'ADN extracellulaire mais que celui-ci peut être sous différentes formes : libre, lié ou au sein d'organelles, notamment de mitochondries (Moushomi et al. 2019 ; Pietramellara et al. 2008). L'ADN mitochondrial se dégrade moins rapidement car protégé par une double membrane contre les facteurs environnementaux tels que pH, oxygène, salinité, enzymes, température, ou lumière.

Par ailleurs, cibler des séquences courtes présente un autre avantage. L'ADN étant progressivement dégradé, ce seront surtout de courtes séquences qui subsisteront dans l'échantillon. Elles persisteront plus longtemps et seront présentes sous forme extracellulaires et libre en quantité plus importante. Pour cette raison il est préférable de cibler l'ADN libre extra cellulaire pour optimiser la sensibilité de détection (Murgia et al. 1992 ; Rickwood, Chambers 1981 ; Miyakawa 2017).

De nombreux produits sont commercialisés pour la filtration de prélèvement. Une méthode souvent décrite consiste en l'usage d'un filtre stérile à usage unique, à ouverture de pores spécifique (Moushomi et al. 2019 ; Majaneva et al. 2018). La taille des pores est choisie afin de capter les molécules d'ADN fixées à des particules ainsi que de petits organites tels que les mitochondries et cellules tout en évitant une saturation rapide et la limitation des volumes filtrés. Le choix est dicté par la taille des particules cibles (par exemple une mitochondrie mesure entre 0,2 et 1,2  $\mu\text{m}$  de diamètre pour une longueur de 1-8  $\mu\text{m}$ ).

Afin d'améliorer le rendement d'extraction il peut être intéressant de cibler, en plus de l'ADN dégradé, de l'ADN intracellulaire peu dégradé. Pour cela, à l'issue de la filtration, il peut être utile d'optimiser le protocole en s'assurant que le maximum d'ADNe soit sous forme libre, et ce par lyse mécanique ou enzymatique des cellules retenues par le filtre. Afin de faciliter la séparation de l'ADN du filtre et libérer le matériel génétique des cellules et particules, une étape de broyage des filtres au vortex Precellys® dans des tubes à billes d'argile a donc été ajoutée avant l'extraction. Cette étape est souvent utilisée dans le traitement de l'ADNe. D'après une étude menée sur des bactéries il s'agit d'une étape bénéfique et non négligeable (Bowman et al. 2016).

### **Sur matière fécale**

Deux stratégies sont souvent décrites : (i) l'utilisation d'un kit dédié à l'extraction d'ADN issu de fèces (QIAamp DNA Stool Mini Kit de Qiagen) ; (ii) l'utilisation d'un tampon à base de phosphate et permettant l'usage d'un kit d'extraction moins complet. L'inconvénient est cependant que les cellules sont moins facilement lysées lorsque l'on utilise un buffer phosphaté et qu'ainsi moins d'ADN hôte est libéré (Taberlet et al. 2012). L'avantage des kits spécifiquement conçus pour l'analyse de fèces réside dans le traitement de certaines molécules inhibitrices de PCR notamment présentes en grande quantité dans des échantillons fécaux purs, afin d'obtenir un ADN utilisable dans la suite des protocoles.

### **Sur sol et humus**

Une publication d'une équipe de l'université du Michigan aux États-Unis conclut suite à l'extraction d'ADN issus de sols de compositions différentes que chaque type de sol devrait avoir un protocole d'extraction spécifique et élaboré selon ses caractéristiques propres (Zhou et al. 1996).

La méthode utilisable pour les sols est similaire à celle utilisée pour des échantillons aquatiques riches en particules. Une mise en suspension préalable de la matrice est nécessaire avec une solution phosphatée, suivie de la filtration du surnageant après centrifugation.

#### **2.4.1.2. Conservation des échantillons d'ADNe**

Compte tenu des potentielles contraintes de fragilité et de faible quantité des ADN, et de distance entre les lieux de récolte et d'analyse, il est souvent nécessaire de mettre en place des méthodes de conservation permettant de freiner les processus de dégradation de l'ADNe et ainsi d'améliorer sa persistance dans le temps.

Les protocoles les plus simples passent par une extraction de l'ADNe le plus rapidement possible après le prélèvement, afin de le séparer immédiatement des facteurs de dégradation environnementaux (biologiques et physico-chimiques). Certaines études décrivent ainsi la mise en place de véritables laboratoires mobiles afin de procéder aux premières étapes du protocole à proximité immédiate du lieu de prélèvement (Taberlet et al. 2018).

D'autres procédés de conservation peuvent jouer sur la modification des paramètres physico-chimiques de l'échantillon. Certains consistent à modifier le milieu chimiquement afin de bloquer toute activité biologique susceptible de dégrader l'ADN, avec par exemple de l'acétate de sodium ou de l'éthanol (Ficetola et al. 2008), ou encore des tampons comme le cetrimonium de bromide (CTAB ou longmire buffer) (Taberlet et al. 2018). D'autres procédés consistent plus simplement à refroidir l'échantillon, mais il faut avoir conscience que si l'on cible de l'ADN extracellulaire, un cycle de congélation/décongélation risque de le dégrader. On peut également conserver les filtres de prélèvement à l'état sec, sur gel de silice par exemple.

#### **2.4.2. Les inhibiteurs de PCR présents dans l'environnement**

La méthode d'amplification génétique utilisée dans les processus d'analyse de l'ADNe est la PCR (réaction de polymérisation en chaîne). Cette méthode permet l'amplification en chaîne de séquences cibles d'ADN, par hybridation spécifique d'amorces puis élongation par une enzyme ADN polymérase, s'effectuant dans des conditions d'alternance de phases de températures précises. Des études utilisent parfois des méthodes de PCR conventionnelle (Cheung et al. 2009 ; Tavares, Baker 2008 ; Lijtmaer et al. 2012) mais le plus souvent les articles les plus récents utilisent des méthodes de qPCR (PCR quantitative ou en temps réel) dont la progression peut être suivi en temps réel par fluorescence. Chaque méthode a ses avantages. Les PCR conventionnelles permettant l'amplification de plus longs fragments (plus de résolution dans l'identification), tandis que la qPCR est plus rapide et permet une détection plus sensible des cibles d'amplification. Un choix éclairé selon les moyens et objectifs de l'étude est nécessaire avant de choisir l'une ou l'autre méthode.

Les inhibiteurs de PCR constituent cependant un des principaux obstacles dans l'analyse de l'ADNe, car ils peuvent être présents en grande quantité dans l'environnement.



Ils sont une cause importante d'échecs car parfois difficilement séparables de l'ADN à analyser (Schrader et al. 2012). Ils sont responsables d'un risque accru de faux négatifs et d'incertitudes quant à la quantification des ADN cibles. Ils sont également à l'origine d'un biais empêchant la reproductibilité des méthodes malgré la mise en place de protocoles standardisés.

Une liste des inhibiteurs connus a été établie en 2013 (Hedman et al. 2013). Il s'agit notamment pour les prélèvements de sols des acides humiques et fulvique, et des phénols. Dans les fèces se trouvent surtout les acides biliaires, les polysaccharides, la bilirubine, les acides phytiques et les sels biliaires.

Trois inhibiteurs issus de la dégradation des sols ont été étudiés et particulièrement incriminés : l'acide humique (Yamada et al. 1998 ; Sidstedt et al. 2015 ; Albers et al. 2013), l'acide fulvique et l'acide tannique (Kreider 1996 ; Schrader et al. 2012). **L'acide humique** étant présent en plus grande quantité (Tebbe, Vahjen 1993 ; Tsai, Olson 1992), les études d'optimisation de procédés de séparation de l'ADN extrait et des inhibiteurs se sont donc concentrées sur cet inhibiteur.

#### **2.4.2.1. Les mécanismes**

Les mécanismes d'inhibition de PCR ont été beaucoup étudiés et demeurent partiellement élucidés. L'acide humique est soupçonné d'interagir avec la séquence d'ADN en diminuant la disponibilité des cibles génétiques d'intérêt (Opel et al. 2010). Il est aussi supposé interagir avec l'enzyme ADN polymérase directement (Sutlovic et al. 2008), diminuant voire empêchant l'amplification. Enfin, il pourrait interagir avec les fluorophores utilisés en qPCR (Hedman et al. 2013). Un article récent fait état des mécanismes impliqués (Sidstedt et al. 2015 ; 2020) qui sont différents selon le type de PCR. Dans le cas d'une qPCR, l'inhibiteur altère la dénaturation de l'ADN, la fixation de l'enzyme au monobrin et la libération des fluorophores. Les PCR émergentes comme la dPCR (PCR digitale) seraient moins affectées par les inhibiteurs que la qPCR (Sidstedt et al. 2020 ; Sedlak et al. 2014 ; Hoshino, Inagaki 2012).

Il est important de garder à l'esprit que les mécanismes d'inhibition sont peu connus. D'autres inhibiteurs que ceux cités précédemment existent et l'inhibition de la PCR résulte très probablement de l'effet cumulé ou synergique de l'ensemble de ces inhibiteurs.

#### **2.4.2.2. Limiter la présence d'inhibiteurs et stratégies possibles**

##### **Limiter la co-extraction**

La co-extraction d'inhibiteur (c'est-à-dire le fait d'extraire les inhibiteurs en même temps que les ADN cibles) est un sujet très étudié et beaucoup de protocoles ont été proposés. En effet une élimination précoce des inhibiteurs permettrait de ne plus s'en soucier dans les étapes suivantes.

Dans une étude menée par l'équipe de l'université de Stellenbosch en Afrique du Sud , corroborée par d'autres études (Fortin et al. 2004 ; Bürgmann et al. 2001), il a été montré que l'ajout d'une étape de broyage par des billes en céramique lors de l'extraction d'ADNe induit non seulement une augmentation de rendement mais aussi accroît la séparation de l'ADN et des acides humiques (Lakay et al. 2007). En revanche, la même étude a montré (il faut le préciser et y être attentif) que la méthode conduisait également à une proportion plus importante d'ADN dégradé ayant des conséquences majeures lors du séquençage.

Des étapes de purification peuvent être ajoutées pour limiter la co-extraction d'inhibiteurs. On peut citer par exemple une filtration supplémentaire au travers d'un gel d'agarose (Tsai, Olson 1992), qui a montré dans certaines études une bonne efficacité de purification sur ADN bactérien engendrant peu de pertes en ADN exploitable (Sagar et al. 2014 ; Tsai, Olson 1992).

Une autre méthode de filtration décrite utilise une membrane de silice (Sagar et al. 2014).

L'ajout d'étapes est possible afin de se débarrasser d'une grande partie des inhibiteurs, cependant cela demande davantage d'investissement en termes de temps et de finances. De surcroît, il a été montré qu'une perte d'ADN brut et donc de sensibilité était possible avec certaines méthodes (Hata et al. 2011).

Afin d'intégrer la purification d'inhibiteurs au processus d'extraction sans supplément de temps de manipulations excessif, une offre importante de kits commerciaux a été développée. Une étude récente menée par une équipe japonaise a comparé la qualité de PCR sur de l'ADNe extrait par divers kits commerciaux dont quatre robustes aux inhibiteurs environnementaux (acides fulvique, humique et tannique)(Uchii et al. 2019). Il en ressort que chaque kit a ses avantages et inconvénients mais qu'aucun n'a de compétence totale pour purifier les inhibiteurs présents dans les échantillons environnementaux. Ainsi l'utilisation de kit conçu spécifiquement pour l'extraction d'ADNe est parfois décevante comparée à des protocoles élaborés sur mesure pour les matrices étudiées (Sagar et al. 2014 ; Uchii et al. 2019 ; Harry et al. 1999).

Des produits peuvent également être utilisés afin de limiter la co-extraction d'inhibiteurs. En effet l'addition de certaines substances dans le tampon d'extraction avant l'étape de lyse cellulaire ont été étudiés, comme la polyvidone (PVP) (Porteous, Armstrong 1991 ; Sagar et al. 2014), le bromure de cétrimonium (CTAB) et le propylène glycol (PEG) qui permettraient de minimiser la co-précipitation des substances humiques avec l'ADN et donc leur co-extraction (Zhou et al. 1996).

Cependant les méthodes d'extraction les plus efficaces, selon une étude de l'équipe de l'université de Tezpur en Inde, ne contenaient que du propylène glycol, les autres substances engendrant l'extraction d'un matériel génétique de qualité insuffisante pour permettre l'amplification PCR (Sagar et al. 2014).

Un produit couramment utilisé dans la purification d'échantillons aqueux est le charbon activé par sa capacité d'adsorption, connue pour être efficace dans le retrait des polluants chimiques (Baker et al. 2003). Il s'est révélé intéressant dans les étapes précédant l'extraction pour le retrait de l'acide tannique et des acides humiques, ainsi que des métaux lourds (cuivre et plomb) et des sulfonates de lignine (Logan et al. 1997 ; Seo, Ohgaki 2001 ; Parlayici et al. 2015).

L'utilisation d'agents chélateurs parfois décrite est à proscrire pour la détection sensible de l'ADNe car cette méthode diminue fortement les rendements d'extraction (Braid et al. 2003).

Outre l'étape d'extraction, l'étape de PCR est également un levier sur lequel agir afin de maîtriser les effets des inhibiteurs.

### **L'usage de produits résistants aux inhibiteurs en PCR**

Étant difficile voire impossible d'éliminer les inhibiteurs de PCR de l'échantillon par les étapes de préparation initiales, l'utilisation de réactifs de PCR robustes aux inhibiteurs ou de produits facilitateurs de PCR peut être envisagée comme alternative (Uchii et al., 2019).

### **Facilitateurs de PCR**

L'une des substances les plus utilisées contrecarrant les effets des principaux inhibiteurs environnementaux est l'albumine de sérum bovin (BSA) dont les premiers usages de ce type sont décrits en 1996 (Kreader 1996), et étudiés encore récemment (Sidstedt et al. 2020). Il faut cependant garder à l'esprit que certaines polymérases peuvent voir leur fonctionnement perturbé par l'ajout de BSA (Albers et al. 2013). De plus il a été montré que la BSA lève l'inhibition de la polymérisation mais pas de la fluorescence, c'est pourquoi il est suggéré de vérifier l'inhibition par électrophorèse également (Sidstedt et al. 2020).

### **Réactifs de PCR**

Une autre pierre angulaire de la lutte contre les effets des inhibiteurs de PCR serait l'usage de réactifs résistants aux effets de ces molécules. L'intérêt majeur de l'utilisation de réactifs résistants aux inhibiteurs est de permettre l'exploitation de prélèvements environnementaux présentant une concentration trop importante en inhibiteurs pour être suffisamment purifiés tout en conservant qualité et quantité d'ADNe durant l'extraction.

Des produits sont disponibles dans le commerce, et notamment l'Environmental master mix 2.0 en qPCR (Thermofischer®) (Jane et al. 2015) dont l'usage est décrit dans de nombreuses publications (Doi et al. 2017 ; Harper et al. 2019 ; Levi et al. 2019). Il combine l'usage de tampons et d'enzymes résistants aux inhibiteurs.

On observe une disparité importante des performances des polymérases en présence d'inhibiteurs du sol (Albers et al. 2013). En 2010 une étude a obtenu des résultats intéressants en alliant deux polymérases différentes (PicoMaxx HF et ExTaq HS), l'étude suggérant un travail en synergie des enzymes et non une simple complémentarité des effets (Hedman et al. 2010). Des Taq polymérases modifiées ont aussi montré des propriétés intéressantes de résistance aux inhibiteurs du sol (et du sang), qui pourraient être associées à une affinité plus élevée de ces enzymes pour la séquence d'ADN (Kermekchiev et al. 2009 ; Zhang et al. 2010). Outre les Taq polymérases, la polymérase 2D9 (Baar et al. 2011) mise au point pour ses capacités de résistance à la présence d'acide humique se révèle efficace (Sidstedt et al. 2020).

La fluorescence, quant à elle, est inhibée par l'acide humique quel que soit le fluorophore utilisé (SYBR green®, Eva green® ou Rox®). Il y a ainsi un risque de défaut de détection. Des études sur Sybr green® montrent que le sang et l'acide humique ont pu altérer les seuils de détection et donc les conclusions des travaux (Sidstedt et al. 2015).

Enfin des études ont montré un impact de la technologie de PCR utilisée, les PCR digitales récemment développées étant moins sensibles aux inhibiteurs que les qPCR (Sedlak et al. 2014 ; Hoshino, Inagaki 2012).

### **Diminuer les effets des inhibiteurs par dilution**

La dilution des échantillons extraits peut permettre de réduire la quantité d'inhibiteurs dans le mélange analysé en PCR. Cependant en contrepartie il y a un risque de passer sous le seuil de sensibilité rendant cette méthode discutable dans le cas où la disponibilité en matériel génétique est limitée (Juen, Traugott 2006 ; Jane et al. 2015). Afin d'évaluer la perte éventuelle en sensibilité, il y aurait un intérêt à faire des gammes de dilution sur des échantillons riches en matière organique (Al-Soud, Nsson, 2000). Il a été montré qu'une dilution jusqu'à 100 fois suffisait à obtenir une détection par PCR avec la majeure partie des polymérases testées (Albers et al. 2013). Une étude antérieure fait état d'une dilution plus importante au 10 000ième montrant les progrès réalisés sur les méthodes d'extraction (Tebbe, Vahjen 1993). Il convient cependant de préciser que dans ces deux études les résultats sont comparés d'un échantillon à un autre (Desai, Madamwar 2007). Il est aussi possible de diluer les échantillons à fort potentiel d'inhibition après l'amplification par PCR et avant d'être envoyés au séquençage afin de minimiser l'effet des inhibiteurs pour cette étape encore plus délicate (Sidstedt et al. 2020).

### **2.4.2.3. Contrôler la présence d'inhibiteurs**

Afin de valider les étapes précédant une PCR ou un séquençage, il peut être intéressant de contrôler la présence d'inhibiteurs et ainsi d'évaluer le risque d'échec. Pour ce faire, il peut être intéressant d'ajouter un contrôle positif d'extraction aux échantillons afin de vérifier l'efficacité de cette étape (Smets et al. 2016 ; Hartman et al. 2005).

Une méthode aussi utilisée dans certaines études est l'ajout d'un contrôle positif interne (IAC : internal amplification control). Cela consiste en l'intégration d'un nombre connu de copies d'ADN au sein de chaque réaction PCR afin d'évaluer l'inhibition par la matrice par comparaison à des résultats en milieu pur. On pourra ainsi vérifier si l'amplification attendue est amoindrie et donc inhibée (Hartman et al. 2005 ; Volkmann et al. 2004b). Il s'agit aussi d'un moyen pertinent de contrôler la qualité de l'ADN extrait avant un séquençage (Hata et al. 2011 ; Courtney et al. 1999 ; Hoorfar et al. 2004 ; Reiss, Rutz 1999 ; Sidstedt et al. 2020).

Une autre méthode utilisée en complément au contrôle interne (IAC) est l'étude de cinétique d'amplification, associée à l'évaluation des seuils d'amplification. L'étude de la forme des courbes cinétiques d'amplification (KOD ou kinetic outlier detection) permet de suspecter un effet inhibiteur (Sidstedt et al. 2020 ; Bar et al. 2003).

L'inconvénient dans l'usage d'un contrôle interne positif est la complexification des protocoles induite par l'ajout de matériel génétique et de réactifs susceptibles d'interférer avec les réactions d'amplification de l'ADN cible.

### **2.4.3. Bilan**

L'ajout d'étape de purification, de dilution de produits facilitateurs de PCR et d'enrichissement à l'extraction peut conduire invariablement et inéluctablement à une perte d'ADN ce qui, dans notre étude, peut être très préjudiciable. L'optimisation passe donc surtout par le choix des réactifs (tampons et ADN polymérase). Les processus appliqués à l'échantillons doivent être rapide afin d'éviter l'altération du matériel génétique (Sidstedt et al. 2020). Une étude suggère même une amplification directement (sans étape d'extraction) à partir de l'échantillon de base afin de minimiser toute perte d'ADN de qualité (Cavanaugh, Bathrick 2018).

### **3. Du barcoding au metabarcoding**

#### **3.1. Le barcoding pour référencer génétiquement la biodiversité**

Le barcoding fait référence à un système d'identification d'espèces par des séquences comparables mais variables de leur ADN. Cette méthode avait initialement pour dessein une meilleure compréhension des relations taxonomiques entre les espèces, en réalisant une comparaison génétique plus fine que les méthodes phénotypiques classiques.

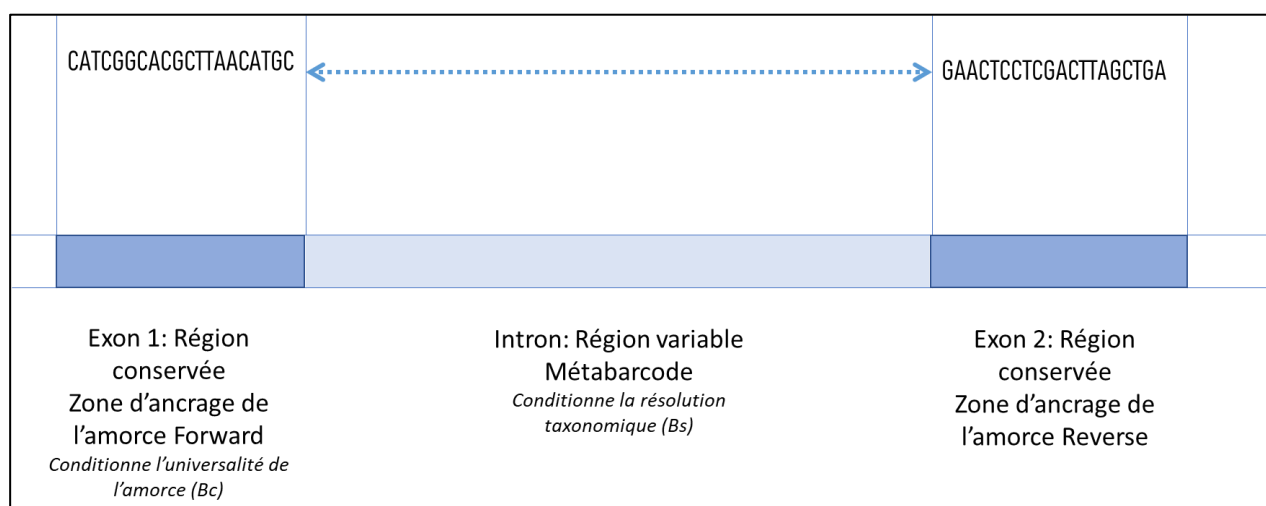
Les barcodes, séquences ainsi ciblées, sont des marqueurs génétiques courts, sur des régions particulièrement conservées de l'ADN et incluant des portions à mutations fréquentes et donc variables d'une espèce à une autre, à la manière d'un code barre (fig. 2) (Elbrecht, Leese 2015 ; Taberlet et al. 2018).

Un certain nombre de critères doivent être vérifiés. Ils sont listés ci-dessous (Taberlet et al. 2018) :

1. Séquence courte (50-150 paires de base) afin de permettre l'amplification de séquences dégradées d'ADNe.
2. Séquence très variable mais flanquée de deux séquences très conservées afin de voir la paire d'amorce s'y attacher.
3. Séquence identique entre les individus d'une même espèce mais variable entre espèces différentes. La section variable déterminera la résolution taxonomique, la discrimination de toutes les espèces cibles et une bonne spécificité. Ainsi on évitera le choix de régions codant pour des protéines, les séquences étant similaires due à la redondance du code génétique.
4. Séquences standardisées selon les groupes taxonomiques.
5. Séquence suffisamment conservée et robuste afin de s'assurer de l'universalité du barcode pour l'identification de plusieurs espèces et assurer l'ancrage des amorces à la séquence.

Initialement, la cible génétique utilisée comme barcode pour l'identification des animaux a été une portion du gène mitochondrial de sous-unité I de la cytochrome oxydase C (COI), définie par le *Consortium for the barcode of life CBOL* (Paul D.N. Hebert et al., 2003).

Les séquences ciblées chez les macro-organismes sont pour beaucoup issues du génome mitochondrial car il s'agit d'un matériel génétique présent en plus grande quantité dans les cellules eucaryotes et plus stable car circulaire (Rees et al. 2014 ; Turner et al. 2014 ; Hebert, Gregory 2005 ; Ma et al. 2016). Les marqueurs utilisés sont sélectionnés selon le panel d'espèces visées, certaines régions du génome étant plus adaptées pour l'identification d'un groupe d'espèces données.



**Figure 2 : Schéma représentant une séquence cible type de barcoding (inspiré de (Taberlet et al. 2018))**

Une critique est souvent soulevée cependant quant à l'usage d'un seul locus pour la réalisation de barcoding. Il s'agit de la capacité à discriminer des espèces appartenant à des clades voisins dont les séquences génétiques sont très similaires (notamment lors de l'étude des microorganismes). On utilise un gène certes autosomal (gène d'origine non sexuel, d'origine maternel) dont les mutations fréquentes sont plus facilement transmises à la descendance et définissent des clades précocement mais l'inconvénient majeur est qu'un seul locus est étudié, moins discriminant que lorsque plusieurs gènes nucléaires sont utilisés (Tavares, Baker 2008). Ainsi de nouvelles cibles génétiques ont été proposées voire combinées afin d'obtenir des protocoles davantage adaptés selon les taxons et études. Cependant ces cibles doivent être limitées dans un objectif de standardisation de la méthode (Ficetola et al. 2010).

Concernant la taille des séquences cibles, un barcode de 4<sup>n</sup> nucléotides variables permet théoriquement l'identification de 4<sup>n</sup> espèces, donc 10 nucléotides suffiraient à identifier 1 048 576 espèces. D'après une étude (Bienert et al. 2012), 30 nucléotides issus d'une séquence d'ARNr 16S suffiraient à discriminer toutes les espèces de lombrics.

En pratique, il faut pouvoir faire un compromis selon les objectifs fixés de l'étude entre la variabilité des régions périphériques et le manque de résolution taxonomique du barcode choisi.

Par ailleurs, des marqueurs de faible taille sont plus sensibles pour la détection d'ADN dégradé et inversement des amplicons de grande taille favorisent l'identification des espèces et améliore la résolution taxonomique. Cependant ces principes sont discutables et ne s'appliquent sans doute que pour des différences de plusieurs centaines de paires de bases entre amplicons. On peut noter de plus que dans la littérature, une étude comparant la sensibilité de détection de 12 paires d'amorces différentes (ciblant des amplicons de 76 à 249 pb) a démontré une très grande disparité de détection selon l'âge des échantillons (de quelques heures à 3 jours) sans pour autant mettre en évidence de lien significatif entre la taille des amplicons et les différences de sensibilité de détection (Ma et al. 2016). Le choix est ainsi principalement basé sur la spécificité et la sensibilité permises par les amorces (détaillés plus loin) ainsi que les espèces ciblées et la richesse des bases de données.

### ***3.2. Le séquençage et les bases de données de références***

La pierre angulaire du barcoding est la confrontation d'une séquence trouvée à partir d'un prélèvement quelconque à une base de données de référence permettant l'identification de cette séquence. Ainsi est-il essentiel de disposer d'une banque de données la plus complète qui soit et de la meilleure qualité possible. À ce jour toutes les espèces n'ont pas pu être référencées mais l'accessibilité grandissante des méthodes de séquençage rend le séquençage du vivant dans son ensemble moins utopique.

L'établissement des barcodes de référence sur les différentes espèces connues se fait généralement par prélèvement dans les musées d'histoire naturelle disposant d'un grand nombre de références de biodiversité. Au fil du temps ces données de référence sont complétées entre collections de différents musées et par des prélèvements sur individus vivants, afin de disposer de la plus grande représentativité possible de la biodiversité étudiée. Sur ces prélèvements individuels, on peut utiliser la méthode de séquençage Sanger qui est une méthode conduisant à peu d'erreurs de lecture mais ne permettant pas l'analyse de mélanges de séquences.

Les premiers recensements de séquences génétiques ont débuté dans les années 1980 par l'European Molecular Biology Laboratory (EMBL), GenBank du National Center of Biotechnology Information (NCBI) et le DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Ces bases ont sauvé la majorité des séquences publiées par le monde scientifique.



Ces organismes ont formé depuis 2017 l'International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) afin de synchroniser les différentes données.

### 3.3. *Le métabarcoding pour identifier par des méthodes haut débit les espèces en présence*

Le métabarcoding quant à lui est un terme récent, employé pour la première fois en 2011 (Pompanon et al. 2011). Il désigne l'application du barcoding afin de détecter et identifier un ensemble d'espèces (macro-organismes ou micro-organismes) présentes au sein d'un même échantillon (Taberlet et al. 2018). Le métabarcoding en tant que discipline récente fait appel à de nombreux domaines de la biologie moléculaire, depuis des techniques classiques d'analyse de l'ADN par amplification PCR à des techniques de séquençage de nouvelle génération à haut débit (NGS) suivies d'analyses bio-informatiques complexes. Depuis la commercialisation du premier séquenceur haut débit en 2005, les études de métabarcoding n'ont cessé d'augmenter exponentiellement (fig. 3)

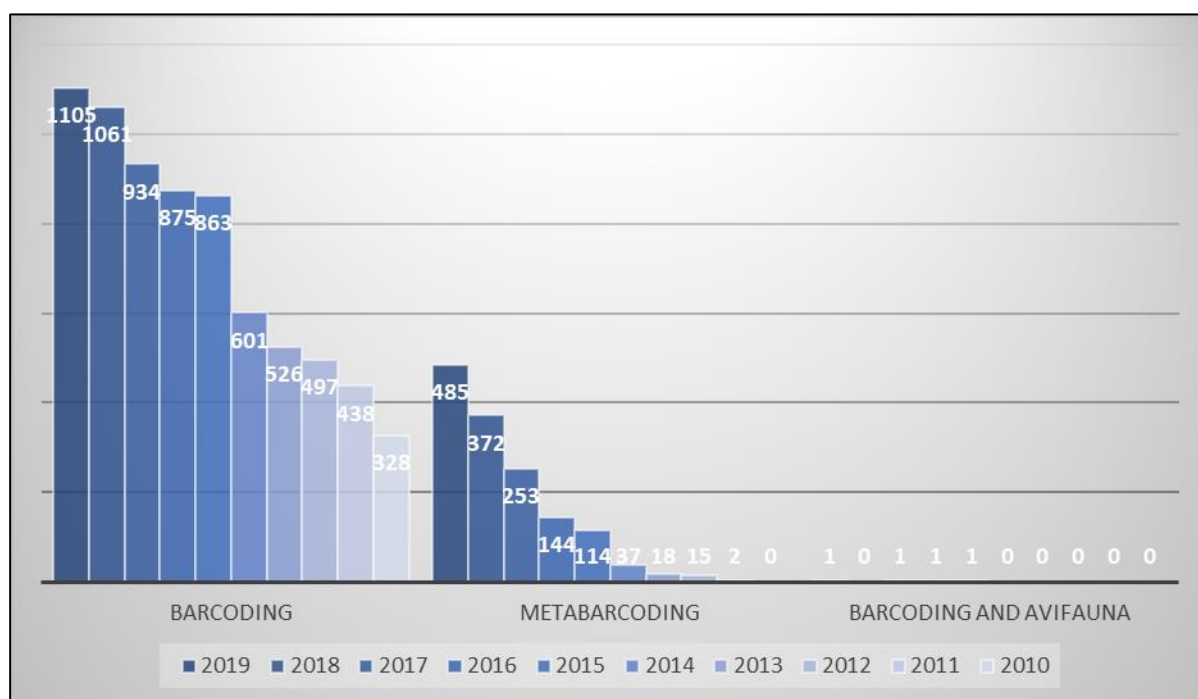


Figure 3 : Nombre de publications (en ordonnée) selon le mot clé sur les 10 dernières années sur le moteur de recherche Pubmed®

### **3.3.1. Les applications du barcoding et du métabarcoding**

#### **3.3.1.1. Le barcoding au service de la compréhension de la biodiversité passée**

Une des applications majeures du métabarcoding est l'étude de l'évolution de la biodiversité. Utilisé en paléo-écologie, ce système a permis de déterminer les espèces présentes aux différentes ères et de mieux identifier la biodiversité passée (Thomsen, Kielgast, Iversen, Wiuf, Rasmussen, M. Thomas P Gilbert, et al. 2012 ; Thomsen, Willerslev 2015b). La cinétique de l'apparition et de la disparition des espèces peut ainsi être étudiée.

Il a pu être mis en évidence le constat alarmant d'un déclin 100 à 1000 fois plus rapide actuellement qu'en période préhumaine. (Barnosky et al. 2011 ; Pimm 1995).

#### **3.3.1.2. Le métabarcoding au service de la conservation et de l'étude de la biodiversité**

Le barcoding permet de classer phylogénétiquement les espèces de manière plus fine. Il s'agit donc d'une méthode particulièrement intéressante chez les insectes dont la diversité et les ressemblances anatomiques rendent difficile la classification (Kisand et al. 2012), ou de manière moins évidente chez les parasites dont l'intérêt à identification précise est indispensable d'un point de vue sanitaire (Morand 2018 ; Gómez, Nichols 2013).

Le métabarcoding possède également une application majeure dans l'étude de la biodiversité notamment dans les milieux marins où l'utilisation de méthodes conventionnelles de recensement est particulièrement limitée et coûteuse (Kumar et al. 2019 ; Kelly et al. 2014 ; Thomsen, Kielgast, Iversen, Møller, Rasmussen, Eske Willerslev 2012 ; Sard et al. 2019).

En conservation, la détection précoce d'espèces invasives est essentielle. Le métabarcoding permet ainsi de suivre l'apparition et l'évolution de ces populations afin d'anticiper et d'éventuellement réagir en mettant en place des mesures de gestion (Piper et al. 2019 ; Osathanunkul 2019 ; Piaggio et al. 2014a ; Armstrong, Ball 2005).

Le métabarcoding a eu beaucoup d'applications dans l'étude de la diététique chez les macro-organismes. Il s'agit d'une application majeure car ces données utiles en écologie sont souvent difficiles à obtenir par des méthodes conventionnelles (Lopes et al. 2015 ; 2015 ; De Barba et al. 2014 ; Kumari et al. 2019 ; Andriollo et al. 2019 ; Pompanon et al. 2012).

On peut encore citer des exemples d'applications dans l'étude des conflits entre l'Homme et la faune sauvage. Par exemple la présence d'oiseaux sur les aéroports, représente une menace pour la sécurité aérienne en étant susceptible de causer des dégâts importants en cas de collision.

Le barcoding a permis d'identifier les espèces impliquées directement dans ces accidents tandis que les méthodes conventionnelles étaient peu efficaces (60% des espèces impliquées étaient non identifiées). En complément, le métabarcoding a été utilisé pour l'étude de la diététique de ces oiseaux afin de trouver des solutions permettant d'empêcher les oiseaux de nicher sur les tarmacs (Waugh et al. 2011 ; Dove et al. 2008 ; 2009 ; Coghlan et al. 2013).

### **3.3.2. Confrontation aux méthodes conventionnelles d'étude des interfaces avec la faune sauvage**

Utilisé pour le recensement de la biodiversité présente dans un espace donné, notamment dans un contexte d'interface entre faune sauvage et animaux domestiques ou Hommes, le métabarcoding complète ou se substitue aux méthodes conventionnelles. Ces dernières peuvent être invasives comme la capture, ou non invasives à l'instar de la détection visuelle directe, des pièges photographiques (Kukielka et al. 2013 ; Elbers, Gonzales 2020), ou bien de la détection auditive (Hamede et al., 2009 ; Courtenay et al., 2001).

Malgré l'expertise des écologistes de terrain, des limites existent à ces méthodes conventionnelles et une description exhaustive et rapide de la biodiversité est difficile. Ces difficultés résident dans l'identification de l'espèce observée, notamment la discrimination de phénotypes similaires entre espèces voisines, particulièrement selon les stades physiologiques (juvéniles), mais également dans la détection concernant des espèces peu visibles car rares, cryptiques ou encore nocturnes, ou bien en cas de mauvaises conditions de visibilité (densité de végétation, etc) (Gu, Swihart 2004 ; Barnes et al. 2014). De plus, ces méthodes ont un coût élevé de par la mise en place de moyens humains et parfois logistiques conséquents, justifiant le développement de méthodes alternatives ou complémentaires telle que pourrait l'être l'analyse par métabarcoding de l'ADNe laissé par les espèces présentes. Dans un contexte d'interface faune sauvage/animaux domestiques, des études se sont penchées spécifiquement sur la compréhension de la transmission d'agents pathogènes, et des méthodes ont été proposées. Des méthodes combinant observation directe des populations et suivi télémétrique de quelques individus sauvages en Afrique ont été étudiées (Cappelle et al. 2011). Cependant aucune ne s'est intéressée à l'analyse par métabarcoding de l'ADNe comme indice de présence pouvant révéler des contacts potentiels entre la faune sauvage et les animaux d'élevage ou les zones anthropisées. Il faut garder à l'esprit que ces méthodes innovantes ne sont pas encore parfaites dans la discrimination et la détection des espèces en toutes circonstances, ce qui en font encore des stratégies complémentaires qui doivent être idéalement confrontées à des méthodes plus classiques d'écologie *in situ*.

## **4. Étude de l'ADNe à l'interface entre avifaune et élevages avicoles**

### **4.1. Les travaux sur l'étude des interfaces entre avifaune et élevages avicoles à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse**

L'étude des interfaces entre la faune sauvage et les animaux d'élevage a démontré son intérêt en épidémiologie pour la compréhension des mécanismes de circulation et de transmission d'agents pathogènes responsables des grandes épizooties. Parmi celles-ci, l'influenza aviaire est un bon exemple de maladie infectieuse transmise entre compartiments et pour laquelle l'avifaune a un rôle certain dans la persistance et la diffusion spatio-temporelle du virus (The Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses 2016). De par son positionnement en première ligne dans la gestion des crises d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) de 2015-2016 et 2016-2017 dans le Sud-Ouest de la France, l'unité IHAP (Interactions Hôtes-Agents Pathogènes) de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse s'est investie à étudier entre autres les interfaces sanitaires entre avifaune et élevages avicoles.

Ainsi, en 2018 une thèse d'exercice de l'école Nationale Vétérinaire de Toulouse (Phouratsamay, 2018) s'est intéressée à l'implication des hérons garde-bœufs dans le portage d'agents pathogènes d'intérêt en élevages avicoles : virus influenza, chlamydia et mycoplasmes. Un stage de Master 1 début 2018 réalisé par Chloé Le Gall-Ladevèze a aussi permis d'exploiter les prélèvements biologiques issus de l'avifaune commensale des foyers d'IAHP de 2016-2017, fournissant ainsi des réponses préliminaires au rôle suspecté de ces espèces dans l'épidémiologie du virus. À partir de décembre 2019, la thèse doctorale du docteur Chloé Le Gall-Ladevèze a démarré pour prolonger ces investigations en étudiant plus finement le pathobiome et les contacts inter-compartiments au niveau des interfaces entre avifaune et élevages avicoles. La présente étude s'intègre dans ce projet doctoral.

### **4.2. Contexte de l'étude**

Suite aux crises d'IAHP 2015-2016 et 2016-2017, et dans un contexte de forte suspicion d'une diffusion locale par l'avifaune des virus influenza dans le Sud-Ouest de la France, des mesures réglementaires de biosécurité ont été mises en place en élevages avicoles. Ces mesures sont jugées coûteuses et contraignantes par les éleveurs, allant à l'encontre des systèmes d'élevage locaux. En effet, les zones impactées sont des zones d'élevage de palmipèdes gras et de galliformes en plein air (souvent labélisés et bénéficiant d'une Indication Géographique Protégée IGP) et de ce fait à fort risque de contacts potentiellement infectieux avec l'avifaune.

Ne connaissant pas objectivement le rôle épidémiologique vis-à-vis des virus d'IAHP des espèces de l'avifaune commensale des élevages, contrairement à celui de réservoirs avérés représentés par l'avifaune aquatique migratrice, une volonté de caractériser les modalités fines de contacts à l'interface volailles-avifaune est née afin d'adapter la biosécurité préventive et la réduire au minimum nécessaire.

C'est dans cette optique que le projet de thèse doctorale s'est fondé, visant à étudier finement l'interface avec l'avifaune dans un élevage typique de la filière canards gras. Les méthodes utilisées combinent des procédés courants et des innovations de biologie moléculaire, notamment l'analyse par métabarcoding de l'ADNe. La présente thèse vétérinaire vise ainsi à mettre au point une méthode de détection moléculaire des espèces de l'avifaune présentes sur les parcours extérieurs des canards d'élevage, par l'intermédiaire de l'ADNe. Cette nouvelle méthode sera complétée par des méthodes plus classiques de recensement et d'observation directe (comptages visuels, captures, observations comportementales) afin que les forces de chaque méthode compensent les faiblesses des autres.

### **4.3. Avantages et défis de la méthode à mettre au point**

L'utilisation de l'outil de détection de l'ADNe dans notre cas est particulièrement indiquée de par l'exhaustivité de détection nécessaire dans un environnement particulier, le coût du travail de terrain traditionnel, l'expertise et l'équipement en biologie moléculaire existant dans l'équipe et la complémentarité avec les autres méthodes utilisées (finesse spatio-temporelle, sensibilité, caractère non invasif).

Comme cela a été présenté en introduction, la mise en place d'une étude préliminaire est fondamentale lors d'analyse d'ADNe. En effet, de nombreux paramètres doivent être pris en compte selon le contexte et les objectifs. Des choix doivent être faits en fonction des matrices étudiées (eau, sols, fèces...), de la présence plus ou moins importantes d'inhibiteurs et des espèces ciblées. Ces spécificités rendent très difficile la standardisation des méthodes et justifient la conception d'une méthode adaptée à l'étude (Clarke et al. 2014). Ainsi est-il nécessaire de mettre en place un protocole spécifique depuis l'échantillonnage, en passant par la préparation et l'extraction d'ADNe, et jusqu'à l'amplification PCR et le séquençage.

Le séquençage et le métabarcoding ciblent l'avifaune sauvage locale. Étant donné qu'il s'agit d'une interface entre oiseaux domestiques (canards mulards) et sauvages, une difficulté sera la grande quantité d'ADN de palmipèdes risquant de masquer le matériel génétique d'autres espèces ciblées, probablement minoritaire.

Ces contraintes techniques devront être surmontées dans un équilibre de moyens et de temps disponibles, tout en garantissant l'obtention d'analyses de qualité.

#### **4.4. Méthode et stratégie de travail**

Des étapes clés à mettre au point ont été déterminées préalablement selon le schéma suivant :

- Extraction d'ADN
- Amplification des ADN extraits par PCR
- Séquençage et identification des fragments génétiques amplifiés

## Partie B : Etude expérimentale

### 5. Matériel et méthode

#### 5.1. Description du site de l'étude

Le site pour lequel cette étude de mise au point est un élevage de canards mulards du Gers. Les canards sont destinés à la filière foie gras et élevés sur site depuis l'âge de un jour jusqu'à l'abattage autour de 13-15 semaines d'âge. On s'intéresse en particulier à la phase d'élevage en plein air qui dure 3-4 semaines à 11-13 semaines d'âge.

Les parcours en plein air sont arborés et entourés de haies d'arbres fruitiers selon les principes de l'agroforesterie, ce qui attire une avifaune abondante en toutes saisons : nicheurs, migrateurs en halte, hivernants. La proximité avec les corps de ferme, hangars et bâtiments d'habitation de style ancien attire également une avifaune sédentaire péri-domestique importante comme des moineaux, des hirondelles et des tourterelles.

Chaque parcours fait environ 1 à 2 ha et dispose d'abreuvoirs métalliques type auge ouverte, et d'au moins une mangeoire métallique ouverte par le bas (fig.4) La majeure partie de l'année (en dehors de l'été) des flaques de boue sont présentes sur une partie de chaque parcours, autour et en aval des abreuvoirs en particulier.



Figure 4 : zones de parcours et de prélèvement des échantillons sur le terrain (photo C.Legall Ladeveze ©)

#### 5.2. Choix de la matrice et collecte des échantillons

##### 5.2.1. Matrices d'ADNe sur le site d'étude

Les diverses zones d'intérêt pour l'échantillonnage sont constituées de différents types de matrices : milieu aqueux/boueux (de turbidité variable), fèces, surfaces sèches (toits de mangeoires, sol en béton). De par la capacité drainante de l'eau de ruissellement, le fort attrait de l'eau pour l'avifaune et les canards d'élevage (toilette, abreuvement, insectes...), et la meilleure résistance de nombreux agents infectieux dans les milieux humides, les matrices aqueuses ont été ciblées en priorité comme zones de contacts importants.

Des tubes stériles sont directement plongés dans l'eau ou la boue en divers endroits de chaque parcours afin de récolter un échantillon homogène et représentatif. Les volumes collectés par échantillons sont de 50mL. Acheminés au laboratoire de microbiologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, ils sont stockés à basse température dans des congélateurs thermostatés à -20°C. Afin de compléter cet échantillonnage pour éventuellement détecter des espèces moins hydrophiles, les surfaces sèches font également l'objet de prélèvements par chiffonnette (compresse imbibée de solution tampon stérile).

Sur tous les parcours fréquentés par des canards les points d'eau stagnante (flaques et abreuvoirs) sont prélevés et les surfaces telles que les toits des mangeoires ont été prélevés à l'aide d'une compresse stérile en coton humidifiée dans du tampon phosphaté (PBS) stérile.

Cette étude s'est essentiellement consacrée au traitement des matrices de fèces boueuses, leur traitement étant un double défi lié à la turbidité ainsi qu'à la contamination par les inhibiteurs de PCR. Pour ce faire, des matrices similaires à celles d'intérêt ont ainsi été reconstituées artificiellement par mélanges connus de fèces et/ou de sol dans des volumes d'eau stérile.

### **5.2.2. Collecte d'espèces aviaires de référence**

Afin de constituer une base de référence d'ADN total sans inhibiteurs issu d'espèces pouvant être détectées sur le site d'élevage de canards, des échantillons de muscles ont été collectés sur des oiseaux morts au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT.

Des échantillons de fèces frais ont aussi été collectés sur des espèces communes au site d'étude pour tester les différents kits commerciaux. Les fèces fraîches proviennent du centre de soins.

### **5.2.3. Préparation et concentration des échantillons**

Pour la suite du protocole, l'ensemble des manipulations expérimentales ont eu lieu au sein du laboratoire de microbiologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse selon les normes de biosécurité en vigueur. Les différentes étapes sont réalisées dans les salles spécifiques prévues à cet effet. Les étapes de pré-PCR, PCR et post-PCR notamment sont séparées physiquement ; le manipulateur est tenu de changer de blouse et de gants systématiquement. La paillasse et le matériel utilisés ont été nettoyés et stérilisés au préalable afin d'éviter toute contamination extérieure.



La méthode de concentration des échantillons choisie a été celle de filtration. Comme vue en introduction il s'agit de la méthode semblant la plus adaptée étant donné le matériel disponible et les échantillons susceptibles d'être rencontrés (boues), ainsi que leur volume et la forme d'ADN ciblée (extra-cellulaire). Le filtre a été choisi en se basant sur des résultats d'études montrant une aptitude supérieure des filtres en matière PES et avec des pores de 0,2µm de diamètre à capter des molécules d'ADN (Moushomi et al. 2019 ; Majaneva et al. 2018). Nous avons donc testé un système de filtre stérile à usage unique PES (polyéthersulfone) 0,2µm de marque Corning®.

Les filtres ont été d'abord testés sur matrice reconstituée de fèces uniquement, c'est à dire mélangées à de l'eau sans turbidité, pour plusieurs concentrations de matériel biologique. Le but de cette phase était de tester la capacité des filtres choisis à retenir l'ADN cible, et des protocoles d'extraction à extraire correctement à l'ADN à partir d'échantillons ainsi filtrés. Une dilution mère a été faite en transférant 3,8mg de fiente de tourterelle turque (*Streptopelia decaocto*) dans 40mL d'eau stérile soit une concentration de fèces de 95mg/L. Une homogénéisation sur agitateur en chambre froide pendant une nuit s'en est suivie. Trois sous-dilutions ont été effectuées en diluant respectivement 1mL, 100µL et 10µL de solution mère dans 40mL d'eau stérile soit des concentrations finales de fèces de 2,37mg/L, 0,23mg/L et 0,02mg/L. Une filtration de chaque matrice a ensuite été effectuée à l'aide d'une pompe électrique activant le flux au travers d'un filtre stérile. La membrane du filtre est ensuite conservée pour la suite du processus, ainsi que le liquide filtré, afin d'en comparer les concentrations en ADN extraites.

Dans une seconde phase de l'étude, afin d'évaluer la capacité de filtration et d'extraction à partir de matrice boueuse, des matrices artificielles combinant fèces en quantité connue et échantillon de sol ont été reconstituées dans de l'eau. Une étape préalable à la filtration a été testée afin d'optimiser l'extraction d'ADN sur matrice turbide, consistant en l'ajout d'un tampon à base de sels phosphatés et en une lyse mécanique par des billes de céramique. En effet, il semble possible d'améliorer la séparation de l'ADN adsorbé sur des particules en exploitant la charge ionique négative de l'ADN, ceci grâce à un tampon saturé en phosphate et en cations (Taberlet et al. 2018). A la matrice artificielle sont donc ajoutés des sels phosphatés  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à une concentration de 1,96 g/L et de  $\text{NaHPO}_4$  à 14,7g/L. La matrice est ensuite mélangée puis centrifugée. Le surnageant est conservé pour filtration. Comme pour le test sur matrice non turbide, la filtration a ensuite été effectuée puis le filtre et le liquide filtré ont été conservés pour comparaison des concentrations d'ADN extrait.

### *Protocole détaillé*

- L'ensemble des manipulations est réalisé sous une hotte de type Sorbonne à flux laminaire, le matériel utilisé est stérile et les surfaces de travail nettoyées et stérilisées afin d'éviter toute contamination exogène.
- Dilution de 250 mg de fèces de Tourterelle turque *Streptopelia decaocto*, ajout de 2g de sol (humus riche en débris végétaux) et 50mL d'eau stérile. Préparation de 2 échantillons dans 2 tubes Falcon®. Les tubes sont placés sur un agitateur à raison de 60 mouvements par minute durant une nuit (afin de mimer une homogénéisation par le piétinement des animaux présents sur place).
- Le lendemain les tubes Falcon sont laissés à agiter pendant 15 minutes après ajout de 98,5mg de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et de 735 mg NaHPO<sub>4</sub> à l'échantillon.
- Les tubes sont centrifugés à une vitesse de 4 000 tours par minute pendant 5 minutes.
- Les surnageant des 2 tubes (soit 45mL environ) sont filtrés sur 2 filtres (Corning® 0.22 PES) différents connectés à une pompe à vide.
- Les hémifiltres sont placés dans des tubes à billes d'argile ajouté à 1mL d'eau stérile puis sont passés dans un Precellys® (2 cycles de 30s à 5500rpm à 15s d'intervalle). Des duplicats sont réalisés avant l'amplification par PCR des échantillons (notés respectivement 1 et 2).

## **5.3. Extraction et purification de l'ADN**

### **5.3.1. Fèces fraîches**

Le protocole utilisé dans la comparaison de ces différents kits s'est fait en réalisant des dilutions initiales à partir de prélèvement de 50mg de fèces fraîches de Tourterelle turque mélangé dans 1ml d'eau stérile puis broyé par des billes de céramique au Precellys® (protocole 2x15s à 5500rpm). Chaque dilution a été précédée d'un passage au Vortex® pendant 1 min afin d'homogénéiser le mélange. Les échantillons ont ensuite été extraits avec le kit One4all Genomic DNA mini-prep de Biobasics Canada INC® (selon le protocole du fabricant décrit en annexe 2) ou le kit QIAamp® Fast DNA Stool (selon le protocole du fabricant décrit en annexe 3).

### 5.3.2. Muscle

L'ADN a été extrait en utilisant le kit d'extraction One4all Genomic DNA mini-prep® de Biobasics Canada INC© et en utilisant le protocole du fabricant (purification d'ADN génomique à partir de tissu frais ou congelé) décrit en annexe.

### 5.4. Filtrations de solutions aqueuses

Chacun des hémifiltres découpés stérilement a été mélangé à 1mL de solution PBS dans un tube à billes céramiques, puis broyé sur un Precellys© (2 cycles de 30s à 5500mpm). L'extraction s'est ensuite faite à partir du surnageant en utilisant le kit One4all Genomic DNA mini-prep® (Biobasics Canada INC) selon le protocole du fabricant décrit en annexe 2.

### 5.5. Amplification des séquences par PCR

#### 5.5.1. Sélection des couples d'amorces

Le choix des amorces a été dans un premier temps basé sur leur spécificité, celles-ci devant être capables de s'hybrider spécifiquement à des séquences d'espèces aviaires usuellement rencontrées en Europe.

Tableau 1 Amorces spécifiques à l'identification d'espèces aviaires utilisables en PCR conventionnelle

Amorces	Amorce forward	Amorce reverse	Taille	Gène cible	Référence biblio.
<b>LTyr-COI907aH2</b>	<b>PCR nichée</b> <b>PCR 1</b> LTyr : TGTA AAAAGGWCTACAGCCTA ACGC <b>PCR 2</b> COIaRt : AACAAACCACAAAGATATCGG	COI907aH2 : GTRGCNGAYGTRAARTA TGCTCG  COI748Ht : TGGGARATAATTCCRAA GCCTGG	Env. 650 pb	Mitochondrial cytochrome oxydase subunit 1 (COI)	(Cheung et al. 2009) (Tavares, Baker 2008)
<b>PasserF1-PasserR1</b>	PasserF1 : CCAACCACAAAGACATCGGAA CC	PasserR1 GTAAACTTCTGGGTGAC CAAAGAATC	Env. 650 pb	Mitochondrial cytochrome oxydase subunit 1 (COI)	(Lohman et al. 2009),(Lijtmaer et al. 2012)
<b>BirdF1-COIBirdR2</b>	BirdF1 TTCTCCAACCACAAAGACATTG GCAC	BirdR1 ACGTGGGAGATAATTCC AAATCCTG	Env. 650 pb	Mitochondrial cytochrome oxydase subunit 1 (COI)	(Lohman et al. 2009), (Lijtmaer et al. 2012)
<b>AVES01</b>	GATTAGATACCCCACTATGC	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG	52 pb [39-63]	12S rDNA mitochondrial	(Epp et al. 2012)
<b>AVES02</b>	GAAAATGTAGCCCATTTCTTCC	CATACCGCCGTCGCCAG	80 pb [66-86]	12S rDNA mitochondrial	(Taberlet et al. 2018)
<b>AVES03</b>	TATGATAAAGTGAACATRGAG G	GGTTCRAYTCCTRCTTT TCTA	31pb [22-46]	ADN mitochondrial tRNA ile-gln	(Taberlet et al. 2018)

Des couples d'amorces ont ainsi été choisis dans la littérature (Tableaux 1). Par la suite, leur spécificité a été vérifiée *in silico* via le module BLAST du NCBI afin de s'assurer que les amorces ciblent les espèces choisies et présentent le moins de compatibilités possibles avec des séquences homologues d'autres organismes non recherchés.

Trois couples d'amorces (Tableau 2) ont été comparés dans un premier temps, ciblant tous trois des séquences du gène mitochondrial COI sur des fragments relativement longs et disposant d'un nombre important de séquences de référence disponibles.

Dans un second temps, trois paires d'amorces (Tableau 3) ont été ajoutées, permettant d'amplifier par qPCR.

Remarques concernant les amorces AVES 01,02 et 03 (Taberlet et al. 2018):

- AVES 01 : Résolution taxonomique limitée (53,9%) mais reste très spécifique des oiseaux (98,29% ; 460/468 espèces amplifiées *in silico*).
- AVES 02 : Bonne résolution taxonomique (73.1%) pour un metabarcodage court. Pas aussi spécifiques que AVES 01 (98,93% ; 463/468 espèces amplifiées *in silico*), non testé expérimentalement.
- AVES 03 : Metabarcodage très court mais une bonne résolution taxonomique. Très spécifique des oiseaux (100% ; 468/468 espèces amplifiées *in silico*), non testé expérimentalement.

### **5.5.2. PCR conventionnelle**

Pour ces PCR, nous avons utilisé le kit Kappa taq ®. Chaque puits contient 17,9µL d'eau, 25µL de buffer A, 0,5µL de dNTP mix à 10 µmol/L, 1µL des amorces forward et reverse (à 10nmol/L), 0,1 µL d'enzyme KAPA taq DNApol ® (5U/L) et 2 µL d'éluat d'ADN extrait.

Une PCR simple est effectuée sur les amorces Ltyr et COI selon le programme de PCR suivant : une préincubation à 95°C pendant 1 min suivie de 45 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 95°C pendant 30s, une fixation des amorces à respectivement pour l'amorce Ltyr et COI à 50 et 55°C pendant 30s puis une extension à 72°C pendant 1 minute

Une PCR nichée est effectuée également lorsque l'amorce Ltyr est testée. La première PCR consiste en : une préincubation à 95°C pendant 1 min suivie de 45 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 95°C pendant 30s, une fixation des amorces à 58 °C pendant 30s puis une extension à 72°C pendant 1 minute. Une extension finale à 72°C pendant 1 minute est ajoutée. La seconde PCR comprend les étapes suivantes : une préincubation à 95°C pendant 1 min suivie de 35 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 95°C pendant 30s, une fixation des amorces à 55 °C pendant 30s puis une extension à 72°C pendant 1 minute. Une extension finale à 72°C pendant 1 minute est ajoutée.

Une migration par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,5%, (additionné de 50 µL/L de SYBR green®) est ensuite réalisée.

Un contrôle négatif (2µL d'eau pure) a été utilisé pour chaque PCR.

### **5.5.3. PCR quantitative**

Les qPCR ont été réalisées avec le kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche®) sur un thermocycleur LightCycler®96.

De la même manière que pour la PCR conventionnelle, les cycles utilisés sont calculés selon les recommandations du kit utilisé et des données issues des publications de chaque couple d'amorces.

Chaque puits de PCR comprend 7,2µL d'eau pure, 10µL de Master mix, 0,4 µL de chaque amorce du couple (à 10µmol/L) et 2µL d'ADN extrait, pour un volume total de 20µL. Un contrôle négatif (2µL d'eau pure) a été utilisé pour chaque PCR.

Les qPCR se déroulent selon le programme suivant : un cycle de dénaturation à 95°C pendant 5 min, 40 cycles d'amplification (95°C - 10s, 55°C - 15s, 72°C - 15s) puis un cycle de fusion à 95°C pendant 10 secondes, 65°C pendant une minute et 97°C pendant une seconde, et enfin un cycle de refroidissement progressif jusqu'à 37°C en 30 secondes.

### **5.5.4. Contrôles positifs**

Comme évoqué en introduction, il est important d'ajouter un contrôle positif aux échantillons dès l'étape d'extraction afin de vérifier l'efficacité de l'ensemble du processus (Smets et al. 2016 ; Hartman et al. 2005). Des kits de contrôle positifs sont évoqués dans la littérature permettant l'évaluation de la présence d'inhibiteurs.

Pour notre étude, il a été choisi de générer un contrôle positif spécifique des amorces sélectionnées, servant à évaluer l'efficacité de l'étape de PCR. Ce contrôle a été produit par une méthode de transfection en plasmide bactérien d'un fragment cible d'ADN amplifié préalablement. En plus d'estimer l'impact des inhibiteurs sur la PCR, ceci permettra la fabrication d'une gamme de quantités connues en copies d'ADN cible permettant d'évaluer la sensibilité des résultats.

## **5.6. Purification et séquençage**

Afin de vérifier la spécificité et la qualité de la séquence amplifiée par PCR (conventionnelle ou en temps réel), les produits ont été purifiés puis séquencés. La purification des produits de PCR a été réalisée suivant la procédure suivante :

1. Migration par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) additionné de SYBR Safe®, à 80 mV pendant 2h, afin de séparer les produits selon leur taille.
2. Découpe de la bande d'intérêt sur gel, et purification du matériel génétique contenu à l'aide du kit Qiagen QIAQuick Gel Extraction® en suivant le protocole du fabricant.
3. Assemblage des réactifs pour envoi en séquençage Sanger sur une plateforme prestataire de services (Eurofins Genomics ©). Chaque échantillon envoyé contient 7,5µL d'ADN purifié à séquencer et 2,5µL de l'amorce à 10 µmol/L.

Dans l'étude il n'a été utilisé qu'une technologie Sanger et non NGS car il s'agissait d'une étude préliminaire avec un nombre d'échantillons limité.

Pour chaque produit de PCR, le séquençage a été réalisé avec les deux amorces, afin d'obtenir les séquences les plus complètes possible ceci à l'aide du logiciel d'édition Bioedit®.

Pour cela, une première observation du chromatogramme permet de déterminer si la séquence est exploitable. Un résultat correct doit posséder des pics distincts et suffisamment marqués (fig.5). Les 2 séquences sont ensuite superposées afin de valider la cohérence des résultats sur les parties en superposition et d'obtenir la séquence complète. En cas de différence, une vérification du chromatogramme est faite afin de chercher une erreur de lecture et d'effectuer la correction manuelle de la séquence. (fig 6).

La séquence de barcode ainsi produite et vérifiée est alors entrée dans le module BLAST® afin d'identifier et de valider l'espèce source.

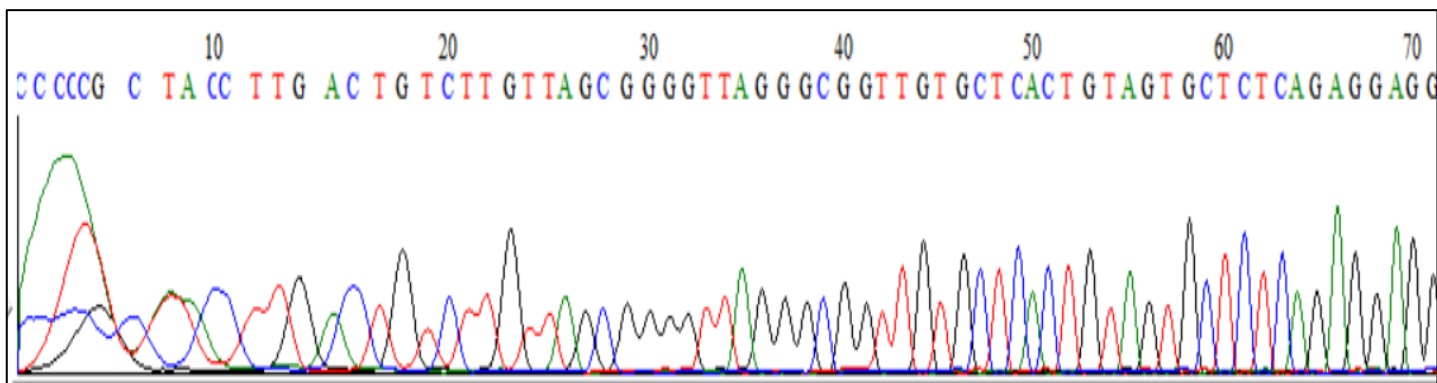


Figure 5 : Exemple de chromatogramme exploitable.

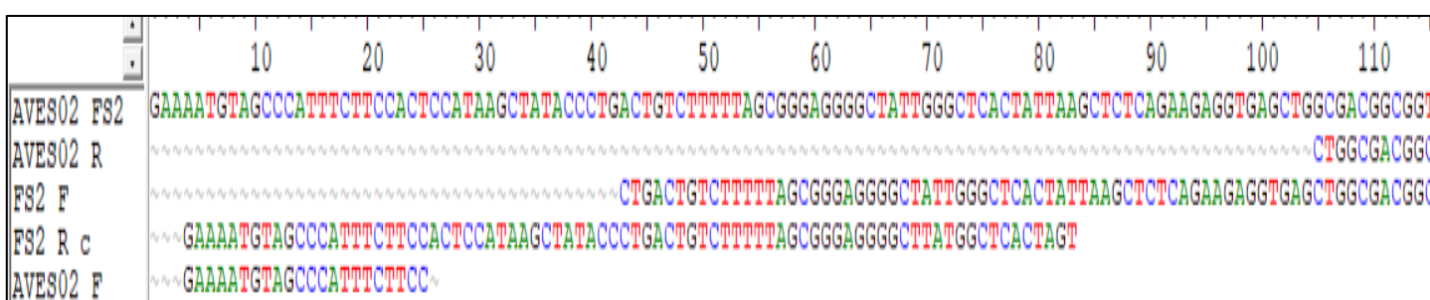


Figure 6 : Exemple de reconstruction d'une séquence (FS2- buse variable) à partir des séquences brutes.

### 5.7. Sélection des espèces de référence

Les premières visites préliminaires du site d'élevage par un ornithologue collaborateur du projet ont permis de faire une liste des principales espèces et familles d'oiseaux commensales de l'élevage.

Des échantillons de fientes ont été prélevés dans un premier temps au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT sur plusieurs mois en ciblant des espèces identiques ou proches de celles observées sur le site d'étude (Tableau 2).

Tableau 2 Liste des espèces ciblées dans l'étude (bleu: échantillons issus de fèces ; rouge: échantillons issus de tissus musculaires) pour tester la méthode.

Espèce (Nom vernaculaire)	Nom latin	Famille	Référence (Centre de soin)
Tourterelle turque	<i>Streptopelia decaocto</i>	Colombidés	T18-0152/FS5
Pigeon biset	<i>Columba livia</i>	Colombidés	FS3
Milan noir	<i>Milvus migrans</i>	Accipitridés	
Buse variable	<i>Buteo buteo</i>	Accipitridés	FS2
Corneille noire	<i>Corvus corone</i>	Corvidés	T18-0550
Goéland Leucophée	<i>Larus michahellis</i>	Laridés	T18-0177
Canard colvert	<i>Anas platyrhynchos</i>	Anatidés	T18-0206
Merle noir	<i>Turdus merula</i>	Turdidés	T18-0227/ FS4
Moineau domestique	<i>Passer domesticus</i>	Passéridés	T18-0537

À l'issue de la collecte, sept espèces cibles de familles d'intérêt ont été choisies (cf. tableau 2). Des prélèvements musculaires d'espèces d'intérêt ont également été effectués afin d'obtenir après extraction un ADN en grande quantité et de bonne qualité utilisé afin de tester les amorces et comme témoins positifs.

### 5.8. Production d'une gamme de contrôles positifs

Afin de disposer d'un contrôle positif fiable de PCR, et de quantifier les produits de PCR et ainsi comparer les méthodes entre elles, une gamme quantifiée de séquences cibles a été produite par transfection et clonage de bactéries compétentes. L'ensemble de la transformation et de la production de bactéries s'est faite avec le protocole et les réactifs du kit StrataCloning PCR Cloning kit©. Les colonies bactériennes ayant bien incorporé les séquences cibles de nos PCR dans leurs plasmides ont ensuite été purifiées à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid EasyPure© (Macherey-Nagel). Les plasmides purifiés ont ensuite été dosés en nombre de copies de séquence par microlitre, puis dilués en gamme décimale.



L'ADN à intégrer dans le plasmide a dans un premier temps été amplifié par PCR conventionnelle utilisant une enzyme Taq polymérase (Taqman dans notre cas). L'espèce utilisée est une Conure de Molina (*Pyrrhura molinae*). C'est une espèce exotique, absente en France à l'état sauvage, et taxonomiquement éloignée des espèces attendues sur le terrain et donc peu susceptible de générer un faux positif par la suite.

## 5.9. Optimisation de la méthode PCR

### 5.9.1. Analyse de la spécificité

Un aspect déterminant de l'étude est la capacité des amorces à détecter et discriminer des fragments d'ADN issus des espèces d'intérêt de l'avifaune locale. Pour ce faire, des espèces types appartenant à des familles susceptibles d'être rencontrées sur l'élevage (cf tableau 4) ont été testées pour chaque amorce. Des dilutions ont également été réalisées sur les prélèvements afin de vérifier les différences de détection de chaque amorce entre les espèces.

Une étude de la spécificité des amorces a été faite *in silico*, et *in vitro* en complément des résultats déjà disponibles dans la bibliographie ou en cas d'absence de données. Les séquences ont été confrontées aux bases de données GenBank® via le module BLAST afin de confirmer que les séquences correspondent aux espèces ciblées (Cf fig 7, 8 et 9) et de vérifier l'absence de séquences homologues appartenant à des organismes non ciblés mais présents sur l'élevage (mammifères par exemple).

<b>Buteo buteo mitochondrion, partial genome</b>					
Sequence ID: <a href="#">MN122916.1</a> Length: 13998 Number of Matches: 1					
Range 1: 699 to 817 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>				▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
196 bits(106)	2e-46	115/119(97%)	1/119(0%)	Plus/Minus	
Query	1	GAAAATGTAGCCCATTCTTCCACTCCATAAGCTATAACCCTGAC-TGTCTTTT TAGCGGG			59
Sbjct	817	GAAAATGTAGCCCATTCTGCCACTCCATAAGCTATACCTTGACCTGTCTTTT TAGCGGG			758
Query	60	AGGGGCTATTGGGCTCACTATTAAGCTCTCAGAAGAGGTGAGCTGGCGACGGCGGTATG			118
Sbjct	757	AGGGGCTATTGGGCTCACTATTAAGCTCTCAGAAGAGGTGAGCTGGAGACGGCGGTATG			699

Figure 7 Séquence de Buse variable (*Buteo buteo*) obtenues avec les amorces AVES 02 et comparée données de GenBank©

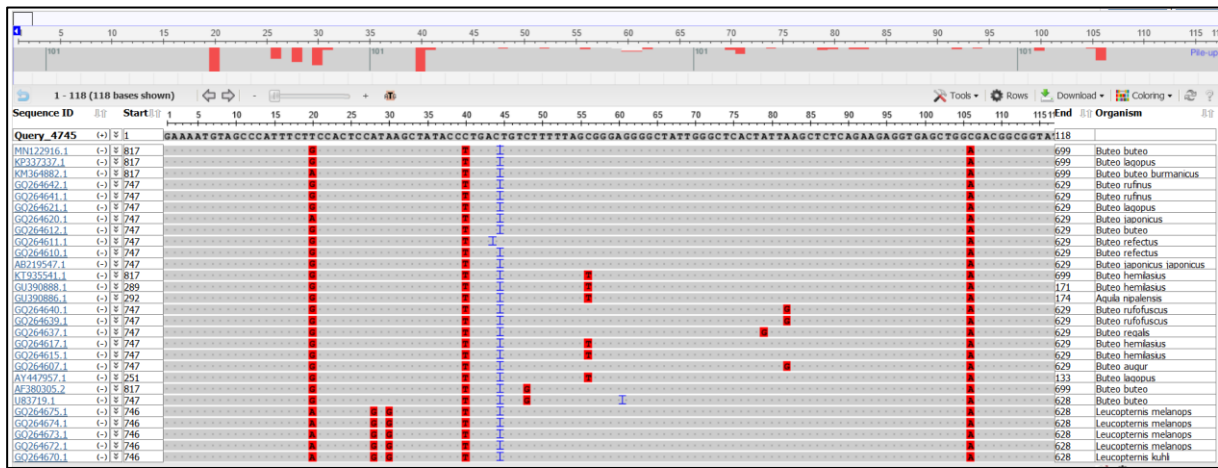


Figure 8: Figure 5 Différences entre une séquence obtenues et les séquences présentes dans GenBank©

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo buteo mitochondrion, partial genome</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">MN122916.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo lagopus voucher AHNU:A0381 mitochondrion, complete genome</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">KP337337.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo buteo burmanicus mitochondrion, complete genome</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">KM364882.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo rufinus voucher NMW-ML Bruf4 12S ribosomal RNA gene, complete sequence, mitochondrial</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">GQ264642.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo rufinus voucher NMW-ML Bruf3 12S ribosomal RNA gene, complete sequence, mitochondrial</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">GQ264641.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo lagopus voucher LSUZMZ B45908 12S ribosomal RNA, tRNA-Val, and 16S ribosomal RNA genes, complete sequence, mitochondrial</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">GQ264621.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo japonicus voucher NMW-ML Bbutjap10 12S ribosomal RNA gene, complete sequence, mitochondrial</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">GQ264620.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo buteo voucher NMW-ML Bbutvul7 12S ribosomal RNA gene, complete sequence, mitochondrial</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">GQ264612.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo reflectus voucher NMW-ML Bbutref4 12S ribosomal RNA gene, complete sequence, mitochondrial</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">GQ264611.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo reflectus voucher NMW-ML Bbutref11 12S ribosomal RNA gene, complete sequence, mitochondrial</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">GQ264610.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo japonicus japonicus mitochondrial gene for 12S ribosomal RNA, partial sequence</a>	196	196	100%	2e-46	96.64%	<a href="#">AB219547.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Buteo hemilasius mitochondrion, complete genome</a>	191	191	100%	7e-45	95.80%	<a href="#">KT935541.1</a>

Figure 9 : Classement des séquences par pourcentage d'identité avec la séquence testée avec Blast© de NCBI

Lorsque les séquences de plusieurs espèces semblent classées de manière équivalente, il est nécessaire de discriminer l'espèce cible par une recherche bibliographique quant à sa répartition géographique.

### 5.9.2. Analyse de la sensibilité

Une évaluation et une optimisation de la sensibilité de la méthode est nécessaire afin d'avoir une idée de l'applicabilité de la méthode sur le terrain, permettant une détection la plus sensible possible des espèces présentes.

Le seuil de sensibilité des PCR conventionnelles et en temps réel a été évalué par amplification d'une gamme de dilutions décimales d'un ADN extrait dont la quantité (dilution) était connue.

### **5.9.3. Quantification/détermination de la qualité de l'ADN**

Le dosage des échantillons d'ADN extrait et l'estimation de leur qualité s'est fait par spectrophotométrie sur un appareil CLARIOstar®. Afin de s'assurer de la robustesse des mesures, des duplicats de 2µL d'échantillons sont effectués puis une moyenne des 2 valeurs est calculée.

Ces mesures ont été faites en particulier pour évaluer la qualité des produits d'amplification PCR avant séquençage.

## 6. Résultats

### 6.1. Performance des extractions selon la matrice utilisée

Les amplifications par PCR quantitative suite à l'extraction d'ADN à partir de divers matrices brutes (c'est-à-dire non diluées dans de l'eau ou de la boue) ont permis d'obtenir des signaux à chaque fois. Les résultats ont été confirmés par séquençage validant ainsi les amorces et les protocoles de PCR choisis (cf. fig. 10).

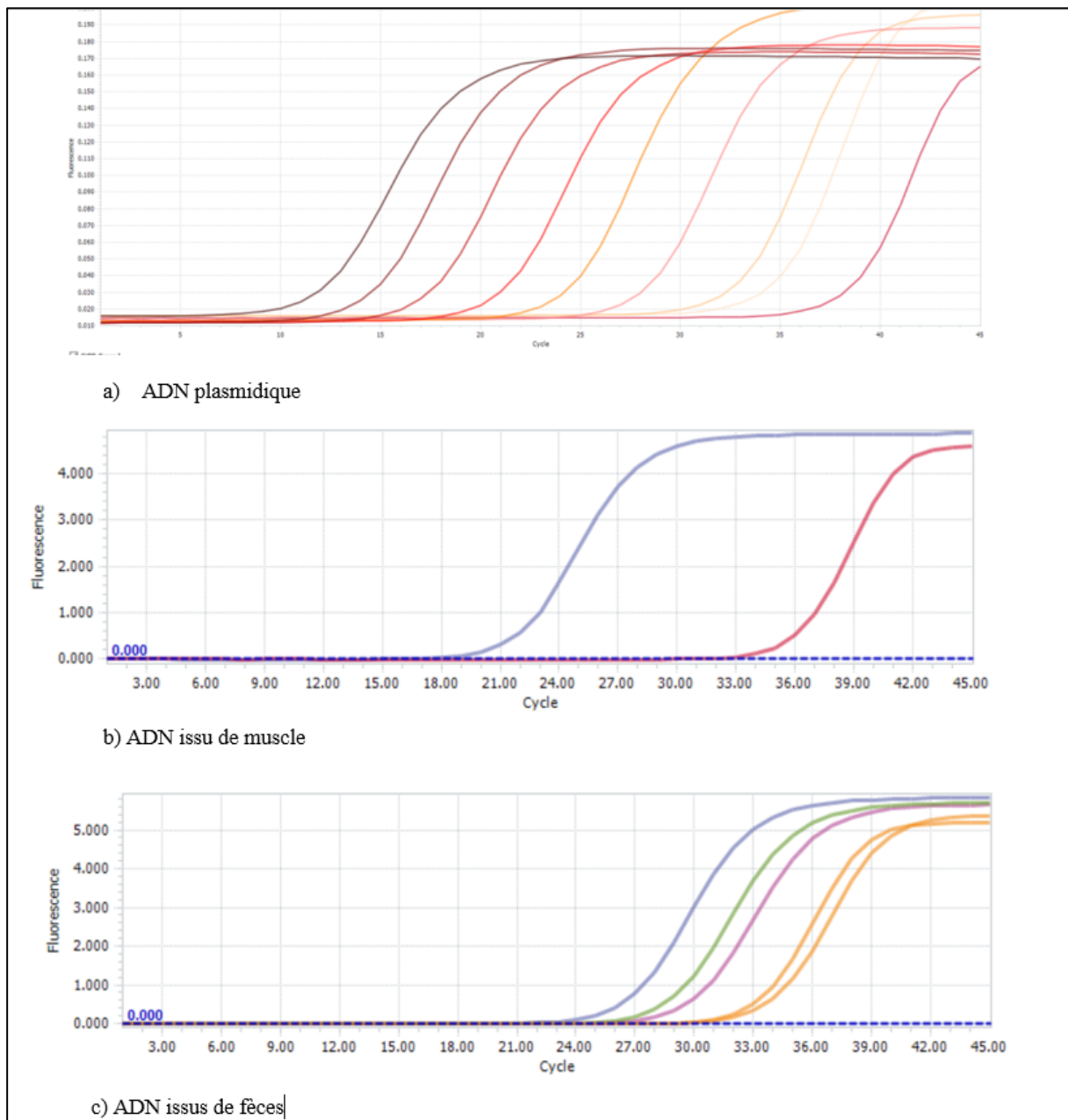


Figure 10 : Exemple de courbes d'amplification obtenues par PCR quantitative (amorces AVES 02) à partir d'ADN issu de différentes matrices.

## 6.2. Préparation et concentration des matrices

### 6.2.1. Tests des filtres sur fèces diluées

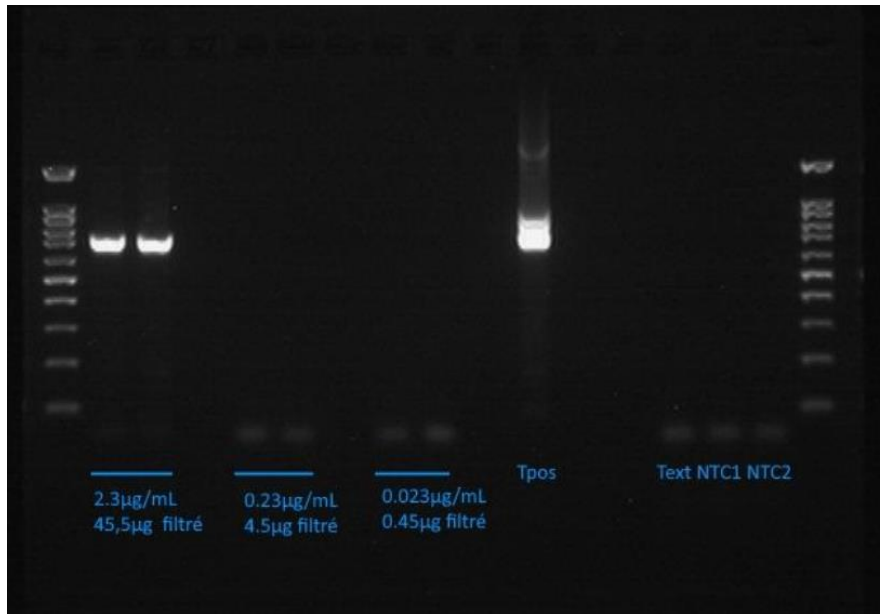


Figure 11 : Résultat des PCR réalisées sur différentes dilutions filtrées avant extraction de fèces réalisés en duplicats (amorce Ltyr).

Tpos : Témoin positif ; Text : témoin négatif d'extraction ; NTC1 : témoin négatif de première PCR ; NTC2 : témoins négatifs de seconde PCR.

Les résultats comparant la filtration de concentrations variables de fèces ont montré que seule la première dilution (2,3µg/mL) a permis une détection par PCR (Cf fig11).

Si on compare ces résultats avec ceux obtenus par PCR conventionnelles sans filtration, les seuils de détection sont similaires (entre 5 et 0.5µg de fèces/mL en PCR conventionnelle).

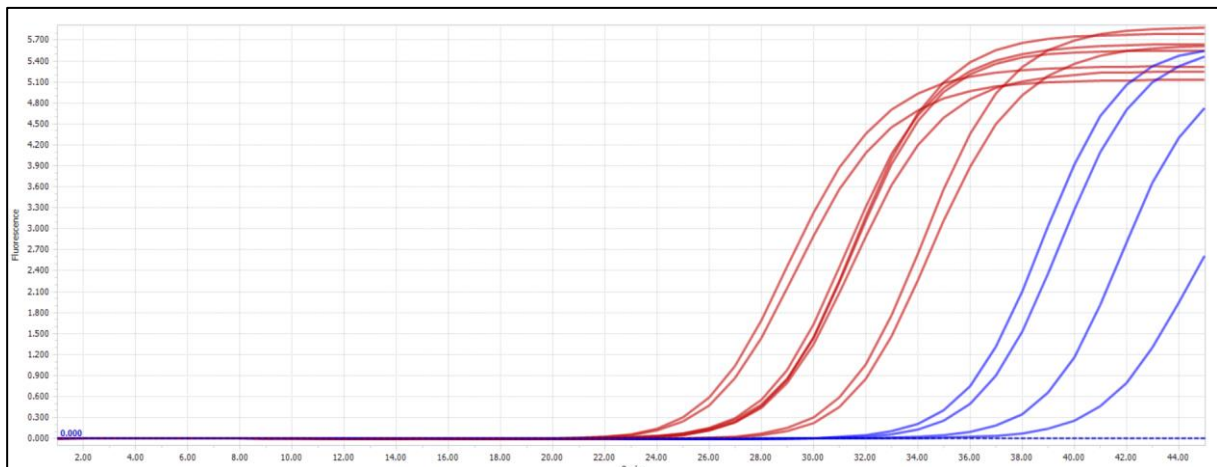


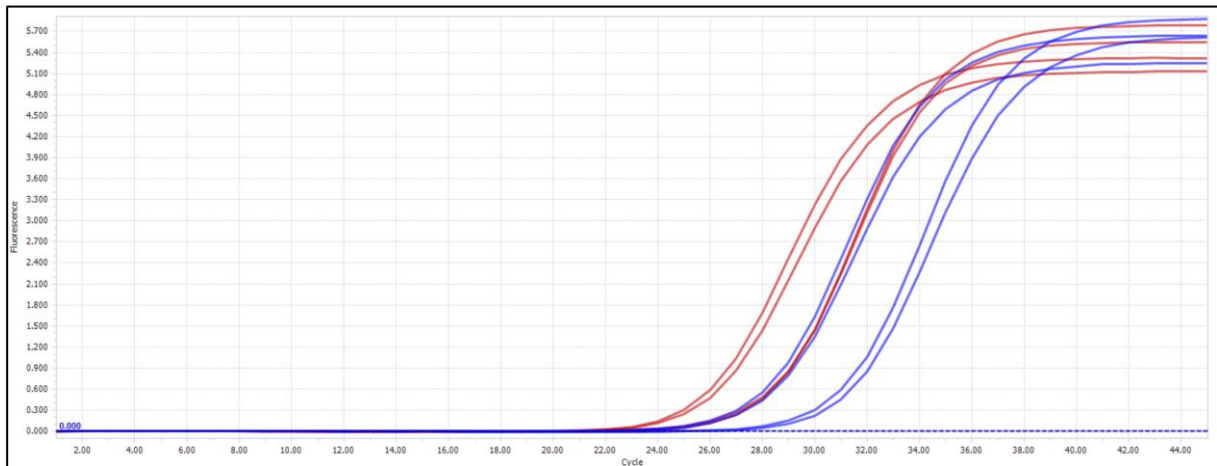
Figure 12 comparaison de l'efficacité d'extraction d'un filtre (courbes d'amplification : rouge extraction à partir de filtre, bleus sur filtrat) -chaque courbe correspond à un degré de dilution (en duplicat), résultats d'amplification par PCR quantitative

Utilisation de la paire d'amorce AVES 02 (Sur filtre : Ct :26,83 ;29,98 ;26,48 ;29,5 moyCt :28.19 cycles, sur filtrat :34,68, 37,19 ; 34,04 ; 39.06 moy Ct : 36.24 cycles).

Une seconde série de tests comparant les concentrations d'ADN après filtration sur les filtres et dans les filtrats (fig.15) a montré que les quantités détectées étaient plus grandes dans les filtres comparés aux filtrats.

### **6.2.2. Test des filtres sur fèces en boue artificielle**

La manipulation sur échantillons boueux et de fèces dilués a permis de valider ces matrices et d'évaluer l'intérêt d'un enrichissement avec un tampon phosphaté.

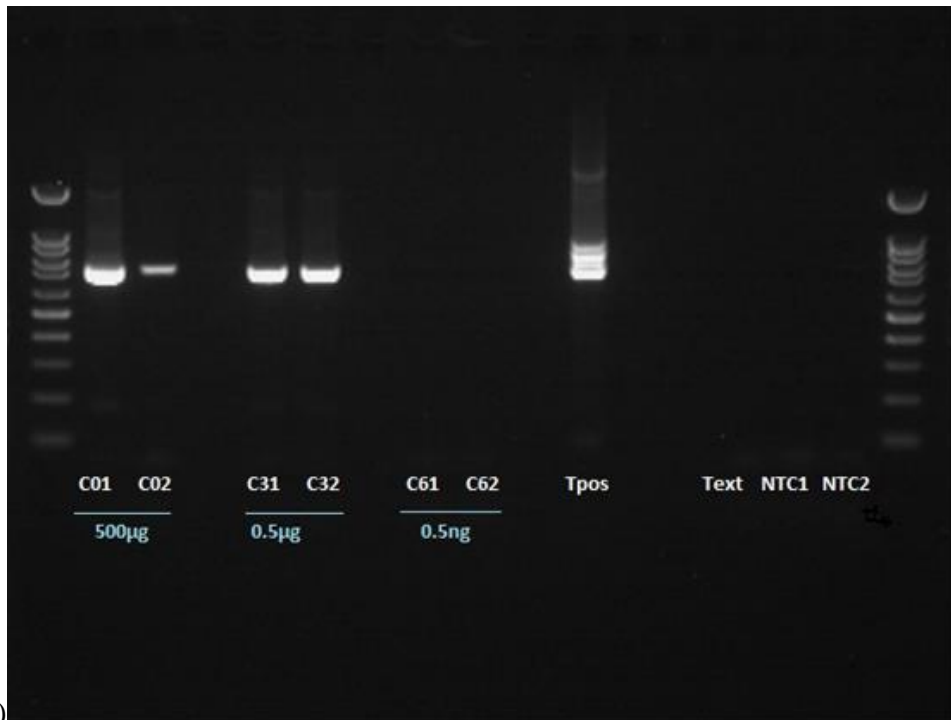


**Figure 13 : Comparaison des seuils d'amplification (rouge avec tampon phosphaté, bleu sans tampon phosphaté), les courbes correspondant au résultats de PCR quantitative en utilisant l'amorce AVES 02 à partir d'échantillons boueux contenant 50 mg de fèces de Tourterelle turque après filtration et extraction et plus ou moins enrichissement, des duplicats ont été réalisés, chaque courbes correspondant à l'amplification d'un héli-filtre (Sur filtre sans enrichissement au phosphate : : moyCt :28,19 cycles, moy Ct avec enrichissement phosphate moyCt :25,71 cycles)**

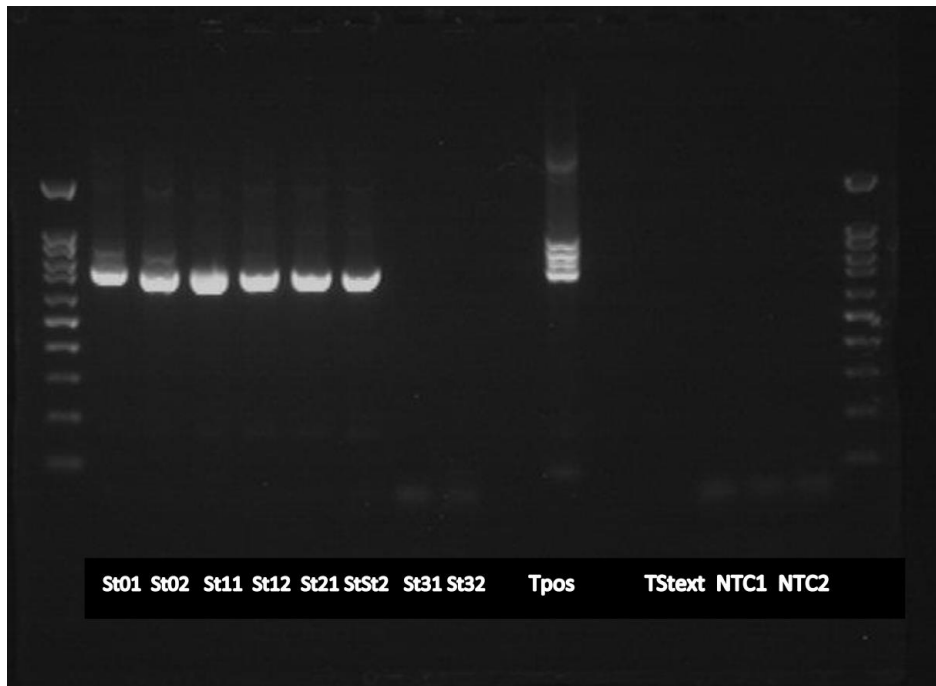
Les résultats extraits de la manipulation (cf. fig.13) suggèrent une légère amélioration de la sensibilité de détection en PCR conventionnelle par enrichissement à l'aide d'un tampon phosphaté (fig.13). La moyenne de seuils d'amplification est en effet plus faible avec ajout de solution saturée en phosphate.

### **6.3. Purification et extraction des ADN**

Les kits QIAamp® Fast DNA Stool et One4all Genomic DNA mini-prep® ont été comparés pour l'extraction d'ADN issus de fèces de Tourterelle turque à des dilutions décimales. La comparaison s'est basée sur la sensibilité de détection par PCR conventionnelle en utilisant l'un ou l'autre kit par l'usage de différents niveaux de dilution d'un échantillon de départ.



a)



b)

**Figure 14: Résultat de PCR visualisés sur gel d'électrophorèse pour la comparaison des seuils de détection selon le kit d'extraction utilisé. Tpos : témoin positif (ADN extrait de muscles), chaque échantillons est traité en duplicat et amplifiés par PCR conventionnel nihé à l'aide de la paire d'amrce Ltyr: a) kit one-4-all de biobasics® sans dilutn (C01 et C02) aux dilutions  $10^{-3}$  (C31 et C32) et  $10^{-6}$  (C61 et C62) ; b) kit Qüiamp fast DNA stool® sans dilution (St01 et St02) aux dilution  $10^{-1}$  (St11 et St12),  $10^{-2}$  (St21 et St22) et  $10^{-3}$  (St31 et St32)**

*Tpos : Témoin positif ; Text : témoin négatif d'extraction ; NTC1 : témoin négatif de première PCR ; NTC2 témoins négatifs de seconde PCR*

Les résultats issus de cette série de manipulations (Cf fig 14) ont montré une sensibilité supérieure du kit One4all Genomic DNA mini-prep© par rapport au kit QIAamp© Fast DNA Stool. Un rapport de dilution d'un facteur 10 différencie les deux kits d'extraction.

#### **6.4. Choix des amorces et évaluation de leur spécificités sur les espèces d'intérêt**

Lors des tests effectués en PCR quantitative, parmi les trois paires d'amorces (Aves 01,02 et 03), les amorces AVES 03 ont rapidement été éliminées à cause de la taille des amplicons générés plus élevée et induisant le risque d'une perte de sensibilité. Dans un second temps les amorces AVES 01 et AVES 02 ont été testées en amplifiant l'ADN extrait à partir de tissus musculaires. D'après la littérature et les tests *in silico* la paire d'amorce Aves 01 possède une meilleure spécificité mais une résolution taxonomique moindre par rapport à Aves 02. La résolution taxonomique étant cruciale dans notre étude, la paire d'amorce AVES 02 a été testée en priorité bien que la paire d'amorces ne soit pas totalement écarté pour une application future sur le terrain en cas de tests sur plusieurs loci.

Les résultats de séquençage issus de l'amplification par la paire d'amorces Aves 02 sont listés ci-dessous (les séquences en rouge correspondent aux amorces).

##### ***Accipitridae* - FS2 : Buse variable**

---

Séquences obtenues à partir du logiciel Bioedit© et des séquences brutes :

**GAAAATGTAGCCCATTTCTTCC**ACTCCATAAGCTATACCCTGACTGTCTTTTTAGC  
GGGAGGGGCTATTGGGCTCACTATTAAGCTCTCAGAAGAGGTGAG**CTGGCGACG**  
**GCGGTATG**

Après consultation de la base de données Genbank via le module Blast©, cinq espèces ont été associées de manière équivalente à cette séquence. Mais leur répartition géographique permet de les discriminer.

<i>Buteo buteo</i>	Buse variable
<i>Buteo lagopus</i>	Buse pattue, rare en France, Nord de l'Europe
<i>Buteo rufinus</i>	Buse féroce, rare en France
<i>Buteo japonicus</i>	Japon, Asie, Russie, Etats unis, Alaska, Inde



### ***Passeridae* - 537 : Moineau domestique**

---

Séquences obtenues à partir du logiciel Bioedit© et des séquences brutes :

**GAAAATGTAGCCATTCTTCC**ATTCCATAGGCTATACCTAGACCTGTCTAGTTAG  
CGTGGTGAGGCTATTGCGCCCACTGTTGGGCTTTCAGTGTAGGTGGG**CTGGCGAC**  
**GGCGGTATG**

Après consultation de la base de données Genbank via le module Blast© NCBI, deux espèces ont été associées à la séquence.

<i>Passer montanus</i>	Moineau friquet
<i>Passer domesticus</i>	Moineau domestique

### ***Anatidae* - 206 : Canard colvert**

---

Séquences obtenues à partir du logiciel Bioedit© et des séquences brutes :

**GAAAATGTAGCCATTCTTCC**GTCCCATAGGCTATACCTATGACCTGTCTTATT  
AGCGGGGTGCTGTGCGCCCACTGTTGCGCTCTCATTTCGAGGTGGG**CTGGCGACGG**  
**CGGTATG**

Après consultation de la base de données Genbank via le module Blast© NCBI, cinq espèces sont associées à la séquence dont trois partageant la même zone géographique et parmi elles une espèce appartenant à une famille différente (colombidés).

<i>Anas platyrhynchos</i>	Canard colvert
<i>Anas poecilorhyncha</i>	Canard à bec tacheté. Asie, Russie
<i>Anas superciliosa</i>	Canard à sourcils ; Australie
<i>Tadorna tadorna</i>	Tadorne de belon
<i>Colombia livia</i>	Pigeon biset

### ***Accipritidae* - Milan noir**

---

Séquences obtenues à partir du logiciel Bioedit© et des séquences brutes :

**GAAAATGTAGCCCGTTCTTCC**ACTTCGTGAGCTATACCCAGACCTTCTTTTTAGC  
GGGGAGAAGCGAATGTGCTTCACTGGTGA ACTCTCAGGAGAGGTGAG**CTGGCGA**  
**CGGCGGTATG**

Après consultation de la base de données Genbank via le module Blast© NCBI, deux espèces sont associées à la séquence, toutes deux présentent en France et sur la zone d'étude en particulier.

<i>Milvus milvus</i>	Milan royal
<i>Milvus migrans</i>	Milan noir

### ***Colombidae* - FS3 Pigeon biset**

---

Séquences obtenues à partir du logiciel Bioedit© et des séquences brutes :

**GAAAATGTAGCCCATTTCTTCC**ACTTCATAAGCTATACCTTGACTGTCTTGTTAGC  
GGGGTTAGGGCGGTTGTGCTCACTGTAGTGCTCTCAGAGGAGGTGAG**CTGGCGAC**  
**GGCGGTATG**

Après consultation de la base de données Genbank via le module Blast© NCBI, deux espèces proches sont associées à la séquence mais elle ne partage pas la même zone géographique.

<i>Colomba rupestris</i>	Pigeon des rochers, espèce présente principalement en Asie.
<i>Colomba livia</i>	Pigeon biset

### ***Turdidae* - FS4 Merle noir**

---

Séquences obtenues à partir du logiciel Bioedit© et des séquences brutes :

**GAAAATGTAGCCCATTTCTTCC**ATTCCGTGGGCTATACCTTGACTGTCTTGCTAGC  
GGGTAGGCTATTGCGTCCACTGTTGGGCTATCAGGAAAGGTGGG**CTGGCGACGG**  
**CGGTATG**

Après consultation de la base de données Genbank via le module Blast© NCBI, trois espèces sont associées à la séquence mais sont distinguables de par leur répartition géographique.

<i>Turdus merula</i>	Merle noir
<i>Turdus obscurus</i>	Grive obscure, rare en France
<i>Turdus bewsheri</i>	Merle des Comores

### ***Colombidae* - FS5 Tourterelle turque**

---

Séquences obtenues à partir du logiciel Bioedit© et des séquences brutes :

**GAAAATGTAGCCCATTTCTTCC**ACTTCATAGGCTATACCTTGACTGTCTTGTTAGC  
GGGGTTAGGGCGATTGTGCTCACTGTGGCACTCTCAGAAGAGGTGAG**CTGGCGAC**  
**GGCGGTATG**

Après consultation de la base de données Genbank via le module Blast© NCBI, quatre espèces sont associées à la séquence mais discriminable à partir de leur distribution géographique.

<i>Streptopelia capicola</i>	Tourterelle du cap, Sud de l'Afrique
<i>Streptopelia chinensis</i>	Tourterelle tigrine, Asie, Etats Unis, Australie
<i>Streptopelia decaocto</i>	Tourterelle turque
<i>Columba joiyi</i>	Pigeon à col d'argent, Japon

## 6.5. Optimisation de la sensibilité du protocole PCR

Les qPCR réalisées avec les amorces Aves 01, 02 et 03 ont été optimisées en testant des gradients de température compris entre 50 et 60 °C sur un échantillon d'ADN extrait à partir de muscle pectoral de perruche à collier (référence FS1) dont les résultats sont exposés ci-dessous.

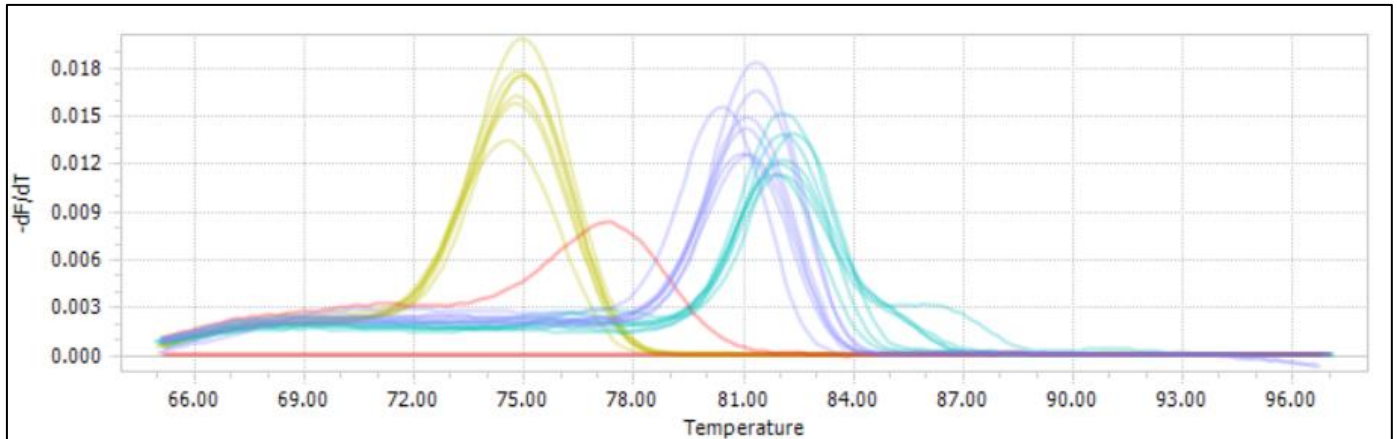
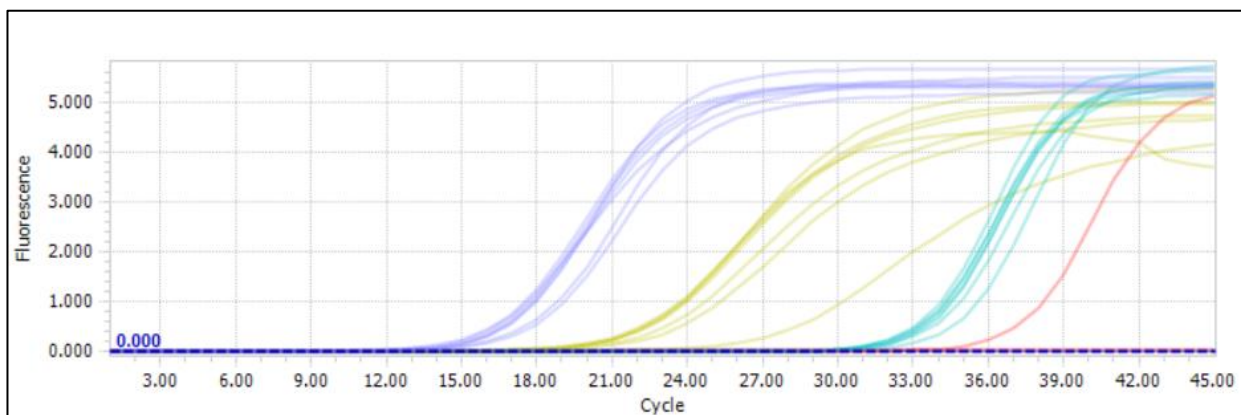


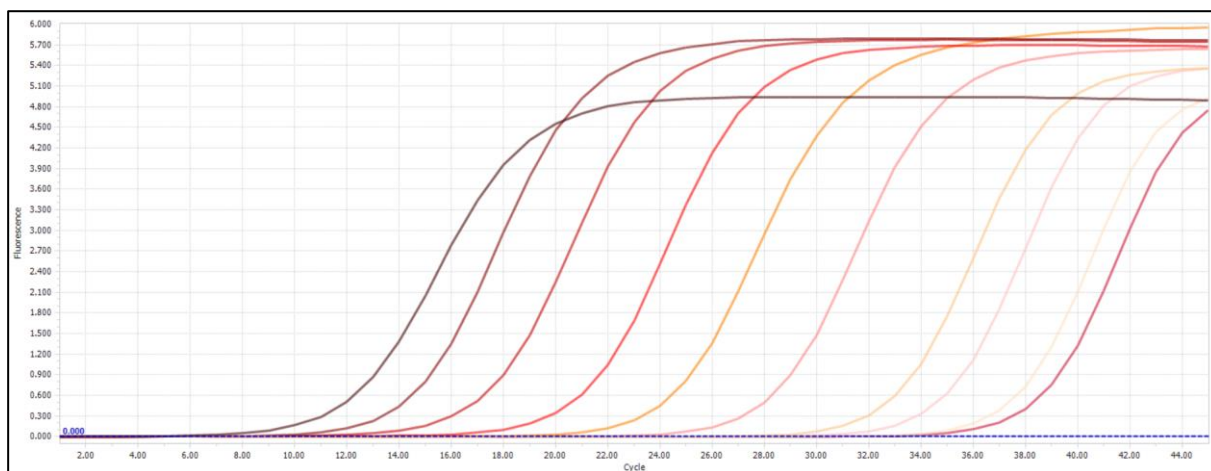
Figure 15 : Gamme de température d'hybridation ( $T_m$ ) sur les paires d'amorces Aves 01,02 et 03 à partir d'échantillons musculaires de perruche. (Bleu: Aves 01, jaune Aves 02 ; vert Aves 03 ; rouge : témoin négatif avec dimère d'amorce) chaque courbe correspond à une température d'hybridation différente

Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes températures sur les courbes de fusion et d'amplification, et le choix s'est fixé sur une température de fusion à 55°C.

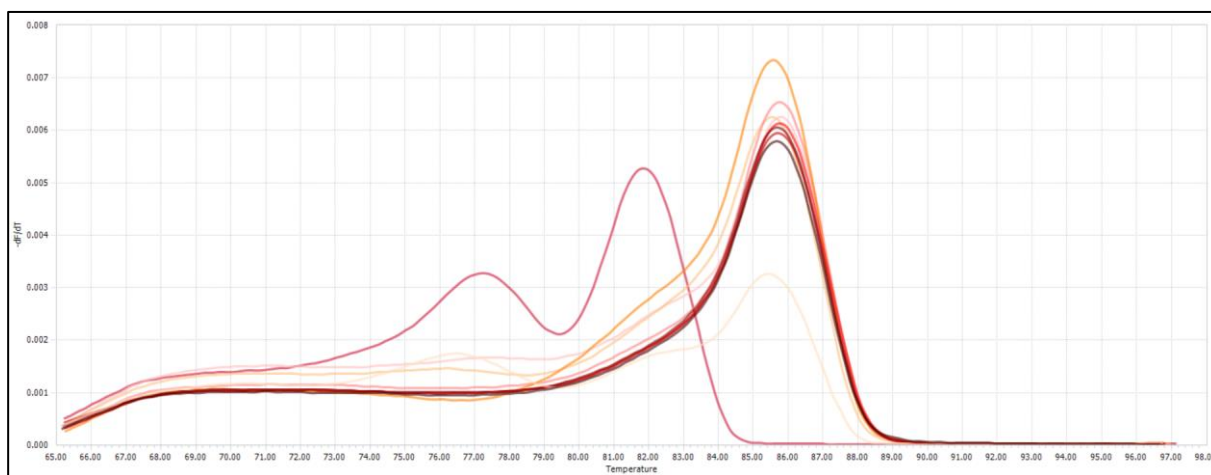
Pour cette température d'hybridation avec les amorces Aves02, le seuil de sensibilité a été évalué à l'aide d'une gamme de plasmides. Le résultat d'amplification des différentes dilutions est présenté en figure 15.



a)



b)



c)

**Figure 16 : Courbe d'amplification (a) et courbe de fusion (b) obtenu par amplification de la gamme plasmidique. Chaque courbe (du plus foncé au plus claire) correspondant à une dilution 10 fois (de 1 à  $10^8$  copies d'ADN par  $\mu\text{L}$ ).**

Tableau 3 Tableau 3 : Ct obtenu après amplification d'une gamme plasmidique à l'aide de l'amorce Aves 02

Nom	Nombre de copies par $\mu\text{L}$	Ct (cycles)
PIC0	$10^8$	10,26
PIC1	$10^7$	12,84
PIC2	$10^6$	15,3
PIC3	$10^5$	19,03
PIC4	$10^4$	22,74
PIC5	$10^3$	26,61
PIC6	$10^2$	31,47
PIC7	$10^1$	33,41
PIC8	1	36,17

La courbe de fusion difforme (deux pics) sur la figure 16 correspond au témoin négatif et vraisemblablement à des dimères d'amorces.

## **7. Discussion**

### **7.1. Méthode**

#### **7.1.1. Préparation des échantillons, purifications et extractions**

La méthode d'extraction est validée par la manipulation. Les filtres se sont montrés efficaces puisqu'on obtient une moyenne de seuil de détection plus élevée sur filtre que sur filtrat (moyennes Ct de 26.94 cycles avec filtre contre 36,37 cycles sur filtrat).

Concernant l'extraction, deux kits de référence pour l'ADNe sont évoqués dans la littérature : les kit PowerSoil DNA Isolation® et Nucleospin Soil®. Ils incluent des procédures de destruction des particules, la lyse des cellules microbiennes et la diminution des concentrations en acide humique (Wagner et al., 2015). Cependant ces kits bien qu'ils soient intéressants pour étudier des microorganismes le sont beaucoup moins pour étudier des macroorganismes (Andersen et al., 2012). D'autres kits existent pour des quantités plus importantes de matériel mais sont significativement plus coûteux.

Le kit One-4-all DNA de Qiagen® convient à l'extraction en routine d'ADN intra-cellulaire.

Le kit QIAamp Fast DNA Stool de Qiagen® est plus spécifique de prélèvements riches en inhibiteurs fécaux.

Le kit DNeasy blood and tissue (Qiagen) obtient souvent des résultats très satisfaisants notamment dans l'extraction de matrices riches en particules, bien que potentiellement sensible à la présence d'inhibiteurs. Ainsi les échantillons nécessitent parfois une dilution au 1:5 avant extraction pour lever l'inhibition (contre au 1:2 pour d'autres kits). De nombreuses études en metabarcoding utilisent ce kit sur des échantillons environnementaux pour des résultats exploitables (Huggins et al. 2020 ; Moushomi et al. 2019 ; Schäffer et al. 2017).

Dans notre étude parmi les deux kits d'extraction commerciaux testés, le kit conventionnel One-4-All semble le plus efficace alors que l'autre test (Qiaamp fast DNA stool®) est supposé plus spécifique et susceptible d'éliminer les inhibiteurs potentiels de PCR. On peut décemment supposer que ce test est conçu pour éliminer les inhibiteurs retrouvés en grande quantité dans des fèces (acides phytique, polysaccharides, bilirubine) mais pas ceux retrouvés dans nos échantillons environnementaux qui ne contiennent pas que des fèces mais également de l'humus contenant des inhibiteurs spécifiques bien connus (acides humique, acides fulviques, phenol) (Hedman et al. 2013 ; Sidstedt et al. 2019).

### **7.1.2. Amplification des séquences par PCR**

Les résultats de manipulations préliminaires non présentés ici ont montré une supériorité en termes de sensibilité de la PCR nichée par rapport à la PCR simple. Dans l'étude menée en 2009 par Peter Cheung, il a été montré que la PCR simple n'amplifiait l'ADN que de 57% des 47 échantillons fécaux et 76% des 45 écouvillons cloacaux, alors que la PCR nichée avait permis de tout amplifier.

D'après la littérature, la PCR conventionnelle est plus spécifique que la qPCR moins couteuse mais également moins sensible, il s'agit d'une méthode utile sur des populations abondantes et convient à l'étude des taxons (plus grandes séquences, meilleures différenciations de espèces) et comme outil complémentaire. Cependant il s'agit d'une méthode très chronophage, d'autant plus qu'une PCR nichée est nécessaire pour atteindre une sensibilité acceptable, ce qui ajoute des étapes supplémentaires impliquant un risque de contaminations croisées considérablement majoré. En revanche, la taille supérieure et la localisation différente des séquences obtenues comparé à celles obtenues par qPCR fait que l'on peut envisager ces PCR conventionnelles nichées en second plan pour la vérification d'identifications insuffisantes à partir des séquences de qPCR.

On peut également discuter le choix des amorces. En effet dans notre étude le choix s'est porté sur des amorces déjà décrites. Cela permet de respecter l'uniformité et d'aller dans le sens d'une standardisation des méthodes.

Cependant de nombreuses études créent des méthodes sur mesure en développant leurs propres amorces à partir des espèces cibles (avec les logiciels Obitools® et EcoPCR©, par exemple). L'avantage est l'optimisation de la spécificité et de l'universalité des amorces vis-à-vis de l'étude. Ici il était difficile d'utiliser cette méthode car elle nécessitait la connaissance des séquences cibles de l'ensemble des espèces d'intérêt, ce qui n'était pas le cas.

### **7.1.3. Séquençage de l'ADN amplifié et spécificité**

Concernant la spécificité, chaque espèce a pu être amplifiée à l'aide de la paire d'amorces Aves 02 excepté un échantillon. Cependant il s'agissait de l'échantillon ayant le plus mauvais résultat lors du dosage spectrophotométrique, le mauvais résultat est donc probablement imputable à la mauvaise qualité de l'échantillon de base et à sa faible quantité. Les séquences issues de fèces de Corneille noire et de Perruche à collier étaient illisibles après séquençage. Après amplification avec d'autres amorces (Ltyr) en PCR niché, ces séquences n'ont pas non plus été obtenues, peut-être à cause de la mauvaise qualité de l'échantillon de départ.

Dans cette étude de mise au point prioritairement centrée sur les étapes initiales de préparation des matrices et d'extraction ADN, il a été décidé de faire des séquençages Sanger dans un premier temps plutôt que d'utiliser d'office une technologie de séquençage haut débit plus onéreuse et nécessitant un nombre conséquent d'échantillons. Il est assumé que des biais inhérents au type de séquençage sont possibles (identification de la seule séquence majoritaire si un mélange est présent), mais ceux-ci sont mineurs dans la configuration monospécifique de ces travaux de mise au point.

Le test de la spécificité des séquences est limité par le nombre d'échantillons, mais également par le fait que la méthode de séquençage qui sera utilisée à terme sera différente. Dans le cas d'analyses individuelles et pour l'étape préliminaire l'utilisation d'un séquençage haut débit n'était pas adapté ou du moins nécessaire. Les erreurs de séquençage sont plus fréquentes avec les séquenceurs haut débit et la spécificité pourra être diminuée lors de leur utilisation par rapport à celle obtenue ici.

Les résultats obtenus à partir du séquençage des échantillons amplifiés par qPCR à l'aide de la paire d'amorces AVES 02 sont satisfaisants et les données obtenues s'avéreront précieuses et complémentaires à celles obtenues par les autres méthodes mises en place sur le terrain (identification visuelle notamment). Bien que plusieurs espèces possèdent des séquences indistinguables, parfois appartenant à des familles différentes (ex : Canard colvert et Pigeon biset) une grande partie des espèces a pu être discriminée en tenant compte des répartitions géographiques des espèces identiques sur la base des séquences étudiées.

## **7.2. Optimisation de la méthode**

### **7.2.1. Ajout d'un contrôle positif et fabrication d'une gamme plasmidique**

Le biais de cette méthode et sa limite principale est le seuil de sensibilité équivalent aux autres séquences. En effet afin de détecter des inhibiteurs et ses impacts sur la PCR (retard d'amplification ou absence) un inhibiteur positif devrait avoir pour caractéristique d'avoir un seuil de sensibilité à la PCR plus faible que les autres. Ceci étant rendu possible par des kits commerciaux grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques pour des cibles génétiques différentes de celles étudiées.

Cependant en connaissance de ce défaut, l'usage de la gamme revêt un avantage indéniable comme contrôle positif de PCR introduit en quantités connues.

### **7.2.2. S'affranchir des ADN de canard surnuméraires**

Une contrainte du terrain qui n'a pas été prise en compte dans cette étude est la présence très probable et de manière majoritaire de matériel génétique des canards de l'élevage dans les échantillons qui seront testés à terme. Le séquençage par méthode Sanger ne permet pas en effet de prendre en compte la diversité de séquences présentes dans les produits de PCR.

Les échantillons sont prélevés dans des zones en contact étroit avec les canards. Les canards étant ciblés de la même manière que l'avifaune par les amorces utilisées, spécifiques des oiseaux, la présence de leur d'ADN surnuméraire par rapport à celui du reste des espèces représente un risque majeur de masquer l'amplification des séquences d'intérêt.

Si au moment du traitement des échantillons de terrain par séquençage haut débit un masquage des espèces sauvages est observé, une solution pourrait être appliquée pour limiter ces amplifications indésirables. En effet, l'usage d'oligonucléotides bloquant est une méthode utilisée notamment lors d'étude sur la diététique ou le parasitisme par le barcoding et lorsqu'une compétition avec l'ADN de l'hôte est trop importante et empêche la détection des séquences d'intérêt. La séquence s'hybride lors de la PCR à la portion spécifique de la séquence de l'espèce que l'on veut masquer empêchant l'élongation des amplicons de cette espèce (Boessenkool et al. 2012 ; Vestheim, Jarman 2008 ; Shehzad et al. 2012 ; Barba et al. 2014).

Un article publié en 2020 a mis au point une méthode de détection des pathogènes canins portés par des vecteurs par l'association d'une extraction efficace de l'ADN et un blocage de l'ADN hôte canin par des oligonucléotides. Les résultats ont montré une plus grande diversité de bactéries détectées en présence des oligonucléotides bloquants (Huggins et al. 2020).



Les résultats obtenus allaient de 2,2% à 100% de blocage par l'amorce. Il faut garder à l'esprit la grande variabilité d'efficacité (en moyenne 18% mais allant de 0 à 64%). De plus, il existe un risque d'interaction des séquences bloquantes avec les séquences d'ADN cibles et plus particulièrement d'espèces voisines comme de canards sauvages dans notre cas, dont la détection peut s'avérer importante.

On peut légitimement penser qu'un moyen de diminuer le risque consisterait aussi dans l'échantillonnage à choisir les lieux à proximité des parcours mais les moins susceptibles de contenir un matériel génétique de canard en trop grande quantité. Une méthode par échantillonnage par chiffonnette comme évoquée dans la partie matériel et méthode permettrait de cibler ces zones mais en contrepartie diminuerait la diversité en matériel génétique (perte de l'effet de drainage et de brassage autorisé par un échantillon aquatique).

### ***7.3. Résultats et biais possibles***

La limite principale de la thèse et de l'étude est probablement la faiblesse de robustesse et l'absence d'analyse statistique des résultats. La thèse s'est appuyée essentiellement sur les données bibliographiques disponibles et en constante évolution. Les manipulations ont visé à tester l'ensemble des étapes pour estimer l'applicabilité de la méthode sur le terrain à l'aide du matériel et des moyens disponibles au laboratoire de microbiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Dans l'étude une seule paire d'amorces a été utilisée à la fois induisant des risques de faux positifs. Ceux-ci pourraient être diminués par la multiplication des réplicas et l'utilisation de plusieurs paires d'amorces différentes (Pagenkopp Lohan 2019).

Un des kits d'extraction choisis l'a été pour sa capacité à traiter des échantillons riches en fèces mais il s'est avéré, d'après les résultats, que les dilutions importantes ont conduit à une performance moindre de ce kit. De plus les échantillons cibles récoltés sur le terrain sont finalement peu riches en inhibiteur de fèces mais plutôt en inhibiteurs environnementaux issus du sol et de la dégradation des végétaux. Un kit classique, davantage ubiquiste, s'est finalement révélé supérieur. Dans des différentes études il est souvent fait état de kits spécialisés dans l'extraction de sol qui auraient sans doute été plus adaptés ici mais également significativement plus coûteux (Taberlet et al. 2018).

Un autre biais possible pourrait venir de la méthode de séquençage dont les performances pourraient être affectées par la présence d'inhibiteurs notamment. Des résultats différents pourraient être possibles lors de l'application de séquençage haut débit (Sidstedt et al. 2019).

Un autre point clé, permis *in vitro* mais potentiellement problématique sur le terrain, est le risque de dégradation des ADN liée à la température. Comme évoqué précédemment, il est possible d'ajouter des étapes subsidiaires et des produits stabilisant l'ADN ou bloquant l'activité des microorganismes. Il s'agit d'autant d'étapes augmentant les risques de contamination liés aux manipulations et susceptibles d'interférer avec les étapes suivantes (inhibiteurs/interaction avec les protocoles de PCR, par exemple lors de stabilisation à l'aide d'éthanol). Ainsi il faut souligner l'importance d'une extraction rapide des échantillons afin de stabiliser le plus possible le matériel génétique dans des solutions tampon.

#### **7.4. Conclusion et perspectives**

Au cours de la thèse, une mise en perspective et une prise de recul ont pu être réalisées afin de mieux cerner les tenants et aboutissants de l'application d'une méthode de barcoding dans le cadre de l'étude d'une interface avifaune sauvage/animaux d'élevage. En étudiant la littérature disponible et en évolution permanente, j'ai pu faire l'état des lieux des écueils et des possibilités de diminution du risque d'interférence et me rendre compte de l'importance d'une étude préliminaire. J'ai notamment pu me rendre compte que certains risques ne peuvent pas être totalement éliminés. Les difficultés nombreuses et un certain nombre de challenges restent à relever. Il s'agit d'une méthode cependant prometteuse et qui se veut en premier lieu complémentaire aux méthodes classiques d'étude des interfaces avec la faune sauvage.

La méthode pourra subir des ajustements selon la confrontation aux expérimentations sur le terrain et notamment selon les échantillons choisis (aqueux turbides, surfaces par chiffonnette, échantillon de sol). C'est pour cette raison que plusieurs méthodes sont parfois envisagées même si pas nécessairement testées *in vivo*.

Les résultats obtenus sont encourageants et montrent qu'à partir du matériel disponible au laboratoire de microbiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, l'utilisation et l'application du metabarcoding est possible. La thèse constitue une étude préliminaire dont les résultats satisfaisants permettent d'envisager de mettre en application la méthode sur le terrain pour l'étude de l'interface entre avifaune sauvage et élevage de palmipèdes. L'étude bibliographique large permet d'envisager des pistes d'amélioration et d'adaptation des méthodes à d'autres situations comme par exemples l'usage de matrices différentes (échantillon aqueux de volume important, boue, sol, échantillons organiques...) ou encore la recherche concomitante d'agents pathogènes.

# Bibliographie

---

ACHARYA, Krishna Prasad, PAUDEL, Prakash Kumar, NEUPANE, Prem Raj et KÖHL, Michael, 2016. Human-Wildlife Conflicts in Nepal: Patterns of Human Fatalities and Injuries Caused by Large Mammals. In : YUE, Bi-Song (éd.), *PLOS ONE*. 9 septembre 2016. Vol. 11, n° 9, pp. e0161717. DOI 10.1371/journal.pone.0161717.

ADAMOWICZ, Sarah J., 2015. International Barcode of Life: Evolution of a global research community. In : SCOLES, Graham J. (éd.), *Genome*. mai 2015. Vol. 58, n° 5, pp. 151-162. DOI 10.1139/gen-2015-0094.

ALBERS, Christian Nyrop, JENSEN, Anders, BÆLUM, Jacob et JACOBSEN, Carsten Suhr, 2013. Inhibition of DNA Polymerases Used in Q-PCR by Structurally Different Soil-Derived Humic Substances. In : *Geomicrobiology Journal*. 14 septembre 2013. Vol. 30, n° 8, pp. 675-681. DOI 10.1080/01490451.2012.758193.

ALEXANDER, Kathleen A. et SANDERSON, Claire E., 2017. Battling the illegal wildlife trade. In : *Nature Ecology & Evolution*. 23 mars 2017. Vol. 1, n° 4, pp. 1-1. DOI 10.1038/s41559-017-0090.

AL-SOUD, Waleed Abu et NSSON, Leif J Jo, 2000. Identification and Characterization of Immunoglobulin G in Blood as a Major Inhibitor of Diagnostic PCR. In : *J. CLIN. MICROBIOL*. 2000. Vol. 38, pp. 6.

ANDRIOLLO, Tommy, GILLET, François, MICHAUX, Johan R. et RUEDI, Manuel, 2019. The menu varies with metabarcoding practices: A case study with the bat *Plecotus auritus*. In : GOROKHOVA, Elena (éd.), *PLOS ONE*. 5 juillet 2019. Vol. 14, n° 7, pp. e0219135. DOI 10.1371/journal.pone.0219135.

ARMSTRONG, K.F et BALL, S.L, 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. In : *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 29 octobre 2005. Vol. 360, n° 1462, pp. 1813-1823. DOI 10.1098/rstb.2005.1713.

ASIS, Angelli Marie Jacynth M., LACSAMANA, Joanne Krisha M. et SANTOS, Mudjekeewis D., 2016. Illegal trade of regulated and protected aquatic species in the Philippines detected by DNA barcoding. In : *Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis*. 2016. Vol. 27, n° 1, pp. 659-666. DOI 10.3109/19401736.2014.913138.

AYLWARD, Bruce, 2014. Ebola Virus Disease in West Africa — The First 9 Months of the Epidemic and Forward Projections. In : *New England Journal of Medicine*. 16 octobre 2014. Vol. 371, n° 16, pp. 1481-1495. DOI 10.1056/NEJMoa1411100.

BAAR, Claudia, D'ABBADIE, Marc, VAISMAN, Alexandra, ARANA, Mercedes E., HOFREITER, Michael, WOODGATE, Roger, KUNKEL, Thomas A. et HOLLIGER, Philipp, 2011. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. In : *Nucleic Acids Research*. avril 2011. Vol. 39, n° 8, pp. e51-e51. DOI 10.1093/nar/gkq1360.

BĄCZKIEWICZ, Alina, SZCZECIŃSKA, Monika, SAWICKI, Jakub, STEBEL, Adam et BUCZKOWSKA, Katarzyna, 2017. DNA barcoding, ecology and geography of the cryptic

species of *Aneura pinguis* and their relationships with *Aneura maxima* and *Aneura mirabilis* (Metzgeriales, Marchantiophyta). In : WONG, William Oki (éd.), *PLOS ONE*. 5 décembre 2017. Vol. 12, n° 12, pp. e0188837. DOI 10.1371/journal.pone.0188837.

BAKER, Frederick S., MILLER, Charles E., REPIK, Albert J. et TOLLES, E. Donald, 2003. Carbon, Activated. In : *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* [en ligne]. S.l. : American Cancer Society. [Consulté le 22 avril 2020]. ISBN 978-0-471-23896-6. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471238961.0103200902011105.a01.pub2>.

BAR, Tzachi, STÅHLBERG, Anders, MUSZTA, Anders et KUBISTA, Mikael, 2003. Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR. In : *Nucleic Acids Research*. 1 septembre 2003. Vol. 31, n° 17, pp. e105. DOI 10.1093/nar/gng106.

BARBA, M. De, MIQUEL, C., BOYER, F., MERCIER, C., RIOUX, D., COISSAC, E. et TABERLET, P., 2014. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. In : *Molecular Ecology Resources*. 2014. Vol. 14, n° 2, pp. 306-323. DOI 10.1111/1755-0998.12188.

BARNES, Matthew A., TURNER, Cameron R., JERDE, Christopher L., RENSHAW, Mark A., CHADDERTON, W. Lindsay et LODGE, David M., 2014. Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. In : *Environmental Science & Technology*. 4 février 2014. Vol. 48, n° 3, pp. 1819-1827. DOI 10.1021/es404734p.

BARNOSKY, Anthony D., MATZKE, Nicholas, TOMIYA, Susumu, WOGAN, Guinevere O. U., SWARTZ, Brian, QUENTAL, Tiago B., MARSHALL, Charles, MCGUIRE, Jenny L., LINDSEY, Emily L., MAGUIRE, Kaitlin C., MERSEY, Ben et FERRER, Elizabeth A., 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? In : *Nature*. mars 2011. Vol. 471, n° 7336, pp. 51-57. DOI 10.1038/nature09678.

BEN JEBARA, Karim, RIPANI, Alessandro et POPOVIC, Marija, 2016. WAHIS-Wild and its interface: the OIE worldwide monitoring system for wild animal diseases. In : *Veterinaria Italiana*. 2016. n° 52(2), pp. 91-100. DOI 10.12834/VetIt.235.779.3.

BIENERT, Friederike, DANIELI, Sébastien De, MIQUEL, Christian, COISSAC, Eric, POILLOT, Carole, BRUN, Jean-Jacques et TABERLET, Pierre, 2012. Tracking earthworm communities from soil DNA. In : *Molecular Ecology*. 2012. Vol. 21, n° 8, pp. 2017-2030. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05407.x.

BOESSENKOOL, Sanne, EPP, Laura S., HAILE, James, BELLEMAIN, Eva, EDWARDS, Mary, COISSAC, Eric, WILLERSLEV, Eske et BROCHMANN, Christian, 2012. Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. In : *Molecular Ecology*. avril 2012. Vol. 21, n° 8, pp. 1806-1815. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05306.x.

BOWMAN, Sorelle, ROFFEY, Paul, MCNEVIN, Dennis et GAHAN, Michelle E., 2016. Evaluation of commercial DNA extraction methods for biosecurity applications. In : *Australian Journal of Forensic Sciences*. 3 juillet 2016. Vol. 48, n° 4, pp. 407-420. DOI 10.1080/00450618.2015.1106585.

BRAID, Michael D, DANIELS, Laura M et KITTS, Christopher L, 2003. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. In : *Journal of Microbiological Methods*. mars 2003. Vol. 52, n° 3, pp. 389-393. DOI 10.1016/S0167-7012(02)00210-5.

- BÜRGMANN, Helmut, PESARO, Manuel, WIDMER, Franco et ZEYER, Josef, 2001. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. In : *Journal of Microbiological Methods*. 1 mai 2001. Vol. 45, n° 1, pp. 7-20. DOI 10.1016/S0167-7012(01)00213-5.
- CAPPELLE, Julien, GAIDET, Nicolas, IVERSON, Samuel A, TAKEKAWA, John Y, NEWMAN, Scott H, FOFANA, Bouba et GILBERT, Marius, 2011. Characterizing the interface between wild ducks and poultry to evaluate the potential of transmission of avian pathogens. In : *International Journal of Health Geographics*. 2011. Vol. 10, n° 1, pp. 60. DOI 10.1186/1476-072X-10-60.
- CAVANAUGH, Sarah E. et BATHRICK, Abigail S., 2018. Direct PCR amplification of forensic touch and other challenging DNA samples: A review. In : *Forensic Science International: Genetics*. janvier 2018. Vol. 32, pp. 40-49. DOI 10.1016/j.fsigen.2017.10.005.
- CHEUNG, Peter P., LEUNG, Y.H. Connie, CHOW, Chun-Kin, NG, Chi-Fung, TSANG, Chun-Lok, WU, Yu-On, MA, Siu-Kit, SIA, Sin-Fun, GUAN, Yi et PEIRIS, J.S.M., 2009. Identifying the species-origin of faecal droppings used for avian influenza virus surveillance in wild-birds. In : *Journal of Clinical Virology*. septembre 2009. Vol. 46, n° 1, pp. 90-93. DOI 10.1016/j.jcv.2009.06.016.
- CLARKE, Laurence J., SOUBRIER, Julien, WEYRICH, Laura S. et COOPER, Alan, 2014. Environmental metabarcodes for insects: in silico PCR reveals potential for taxonomic bias. In : *Molecular Ecology Resources*. 2014. Vol. 14, n° 6, pp. 1160-1170. DOI 10.1111/1755-0998.12265.
- CLEAVELAND, S., LAURENSEN, M.K. et TAYLOR, L.H., 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. In : WOOLHOUSE, M. E. J. et DYE, C. (éd.), *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 29 juillet 2001. Vol. 356, n° 1411, pp. 991-999. DOI 10.1098/rstb.2001.0889.
- COGHLAN, Megan L, WHITE, Nicole E, MURRAY, Dáithí C, HOUSTON, Jayne, RUTHERFORD, William, BELLGARD, Matthew I, HAILE, James et BUNCE, Michael, 2013. Metabarcoding avian diets at airports: implications for birdstrike hazard management planning. In : *Investigative Genetics*. 11 décembre 2013. Vol. 4, pp. 27. DOI 10.1186/2041-2223-4-27.
- COOK, Robert A, 2005. Emerging Diseases at the Interface of People, Domestic Animals, and Wildlife. The Role of Wildlife in our Understanding of Highly Pathogenic Avian Influenza. In : . 2005. pp. 11.
- COURTENAY, O, QUINNELL, R. J et CHALMERS, W. S. K, 2001. Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes. In : *Veterinary Microbiology*. 3 juillet 2001. Vol. 81, n° 1, pp. 9-19. DOI 10.1016/S0378-1135(01)00326-1.
- COURTNEY, Bernard C., SMITH, Malcolm M. et HENCHAL, Erik A., 1999. Development of Internal Controls for Probe-Based Nucleic Acid Diagnostic Assays. In : *Analytical Biochemistry*. juin 1999. Vol. 270, n° 2, pp. 249-256. DOI 10.1006/abio.1999.4099.
- DASZAK, Peter, CUNNINGHAM, Andrew A. et HYATT, Alex D., 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. In : *Science*. 21 janvier 2000. Vol. 287, n° 5452, pp. 443-449. DOI 10.1126/science.287.5452.443.

DE BARBA, M., MIQUEL, C., BOYER, F., MERCIER, C., RIOUX, D., COISSAC, E. et TABERLET, P., 2014. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. In : *Molecular Ecology Resources*. 1 mars 2014. Vol. 14, n° 2, pp. 306-323. DOI 10.1111/1755-0998.12188.

DE GARINE-WICHATITSKY, Michel, 2014. *Approches pluridisciplinaires des interaces faune-bétail dans les socio-écosystèmes de savane*. S.l. : s.n.

DEAGLE, Bruce E, EVESON, J Paige et JARMAN, Simon N, 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces. In : *Frontiers in Zoology*. 16 août 2006. Vol. 3, pp. 11. DOI 10.1186/1742-9994-3-11.

DECKER, D. J., EVENSEN, D. T. N., SIEMER, W. F., LEONG, K. M., RILEY, S. J., WILD, M. A., CASTLE, K. T. et HIGGINS, C. L., 2010. Understanding Risk Perceptions to Enhance Communication about Human-Wildlife Interactions and the Impacts of Zoonotic Disease. In : *ILAR Journal*. 1 janvier 2010. Vol. 51, n° 3, pp. 255-261. DOI 10.1093/ilar.51.3.255.

DEINER, Kristy, WALSER, Jean-Claude, MÄCHLER, Elvira et ALTERMATT, Florian, 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. In : *Biological Conservation*. mars 2015. Vol. 183, pp. 53-63. DOI 10.1016/j.biocon.2014.11.018.

DEJEAN, Tony, VALENTINI, Alice, DUPARC, Antoine, PELLIER-CUIT, Stéphanie, POMPANON, François, TABERLET, Pierre et MIAUD, Claude, 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. In : GILBERT, Jack Anthony (éd.), *PLoS ONE*. 8 août 2011. Vol. 6, n° 8, pp. e23398. DOI 10.1371/journal.pone.0023398.

DEJEAN, Tony, VALENTINI, Alice, MIQUEL, Christian, TABERLET, Pierre, BELLEMAIN, Eva et MIAUD, Claude, 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. In : *Journal of Applied Ecology*. 2012. Vol. 49, n° 4, pp. 953-959. DOI 10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x.

DEMAISON, Catherine, 2017. *Les acteurs économiques et l'environnement*. 2017. S.l. : INSEE.

DESAI, C et MADAMWAR, D, 2007. Extraction of inhibitor-free metagenomic DNA from polluted sediments, compatible with molecular diversity analysis using adsorption and ion-exchange treatments. In : *Bioresource Technology*. mars 2007. Vol. 98, n° 4, pp. 761-768. DOI 10.1016/j.biortech.2006.04.004.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, Delphine, MAVINGUI, Patrick, BOETSCH, Gilles, BOISSIER, Jérôme, DARRIET, Frédéric, DUBOZ, Priscilla, FRITSCH, Clémentine, GIRAUDOUX, Patrick, LE ROUX, Frédérique, MORAND, Serge, PAILLARD, Christine, PONTIER, Dominique, SUEUR, Cédric et VOITURON, Yann, 2018. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. In : *Frontiers in Veterinary Science* [en ligne]. 2018. Vol. 5. [Consulté le 30 août 2020]. DOI 10.3389/fvets.2018.00014. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2018.00014/full>.

DOI, Hideyuki, KATANO, Izumi, SAKATA, Yusuke, SOUMA, Rio, KOSUGE, Toshihiro, NAGANO, Mariko, IKEDA, Kousuke, YANO, Koki et TOJO, Koji, 2017. Detection of an endangered aquatic heteropteran using environmental DNA in a wetland ecosystem. In : *Royal Society Open Science*. juillet 2017. Vol. 4, n° 7, pp. 170568. DOI 10.1098/rsos.170568.

DOVE, Carla J, BOX, P O, DAHLAN, Nor Faridah, HEACKER, Marcy et BOX, P O, 2009. techniques used in an accident investigation at Wiley Post Airport, Oklahoma, 2008. In : . 2009. pp. 7.

DOVE, Carla J., ROTZEL, Nancy C., HEACKER, Marcy et WEIGT, Lee A., 2008. Using DNA Barcodes to Identify Bird Species Involved in Birdstrikes. In : *Journal of Wildlife Management*. juillet 2008. Vol. 72, n° 5, pp. 1231-1236. DOI 10.2193/2007-272.

EICHMILLER, Jessica J., MILLER, Loren M. et SORENSEN, Peter W., 2016. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. In : *Molecular Ecology Resources*. 2016. Vol. 16, n° 1, pp. 56-68. DOI 10.1111/1755-0998.12421.

ELBERS, Armin R. W. et GONZALES, José L., 2020. Quantification of visits of wild fauna to a commercial free-range layer farm in the Netherlands located in an avian influenza hot-spot area assessed by video-camera monitoring. In : *Transboundary and Emerging Diseases*. mars 2020. Vol. 67, n° 2, pp. 661-677. DOI 10.1111/tbed.13382.

ELBRECHT, Vasco et LEESE, Florian, 2015. Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass—Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol. In : *PLOS ONE*. 8 juillet 2015. Vol. 10, n° 7, pp. e0130324. DOI 10.1371/journal.pone.0130324.

FERGUSON, Neil M., DONNELLY, Christl A. et ANDERSON, Roy M., 2001. The Foot-and-Mouth Epidemic in Great Britain: Pattern of Spread and Impact of Interventions. In : *Science*. 11 mai 2001. Vol. 292, n° 5519, pp. 1155-1160. DOI 10.1126/science.1061020.

FICETOLA, Gentile Francesco, COISSAC, Eric, ZUNDEL, Stéphanie, RIAZ, Tiayyba, SHEHZAD, Wasim, BESSIÈRE, Julien, TABERLET, Pierre et POMPANON, François, 2010. An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. In : *BMC Genomics*. 16 juillet 2010. Vol. 11, pp. 434. DOI 10.1186/1471-2164-11-434.

FICETOLA, Gentile Francesco, MIAUD, Claude, POMPANON, François et TABERLET, Pierre, 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. In : *Biology Letters*. 23 août 2008. Vol. 4, n° 4, pp. 423-425. DOI 10.1098/rsbl.2008.0118.

FLACKE, G., BECKER, P., COOPER, D., SZYKMAN GUNTHER, M., ROBERTSON, I., HOLYOAKE, C., DONALDSON, R. et WARREN, K., 2013. An Infectious Disease and Mortality Survey in a Population of Free-Ranging African Wild Dogs and Sympatric Domestic Dogs. In : *International Journal of Biodiversity* [en ligne]. 31 mars 2013. [Consulté le 28 juillet 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.hindawi.com/journals/ijbd/2013/497623/>.

FOOTE, Andrew D., THOMSEN, Philip Francis, SVEEGAARD, Signe, WAHLBERG, Magnus, KIELGAST, Jos, KYHN, Line A., SALLING, Andreas B., GALATIUS, Anders, ORLANDO, Ludovic et GILBERT, M. Thomas P., 2012. Investigating the Potential Use of Environmental DNA (eDNA) for Genetic Monitoring of Marine Mammals. In : LIN, Senjie (éd.), *PLoS ONE*. 29 août 2012. Vol. 7, n° 8, pp. e41781. DOI 10.1371/journal.pone.0041781.

FORTIN, Nathalie, BEAUMIER, Danielle, LEE, Kenneth et GREER, Charles W, 2004. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. In : *Journal of Microbiological Methods*. février 2004. Vol. 56, n° 2, pp. 181-191. DOI 10.1016/j.mimet.2003.10.006.

GOLDBERG, Caren S., PILLIOD, David S., ARKLE, Robert S. et WAITS, Lisette P., 2011. Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. In : GRATWICKE, Brian (éd.), *PLoS ONE*. 26 juillet 2011. Vol. 6, n° 7, pp. e22746. DOI 10.1371/journal.pone.0022746.

GOLDBERG, Caren S., STRICKLER, Katherine M. et FREMIER, Alexander K., 2018. Degradation and dispersion limit environmental DNA detection of rare amphibians in wetlands: Increasing efficacy of sampling designs. In : *Science of The Total Environment*. 15 août 2018. Vol. 633, pp. 695-703. DOI 10.1016/j.scitotenv.2018.02.295.

GÓMEZ, Andrés et NICHOLS, Elizabeth, 2013. Neglected wild life: Parasitic biodiversity as a conservation target. In : *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*. décembre 2013. Vol. 2, pp. 222-227. DOI 10.1016/j.ijppaw.2013.07.002.

GONÇALVES, Priscila F. M., OLIVEIRA-MARQUES, Adriana R., MATSUMOTO, Tania E. et MIYAKI, Cristina Y., 2015. DNA Barcoding Identifies Illegal Parrot Trade. In : *The Journal of Heredity*. 2015. Vol. 106 Suppl 1, pp. 560-564. DOI 10.1093/jhered/esv035.

GORTAZAR, Christian, DIEZ-DELGADO, Iratxe, BARASONA, Jose Angel, VICENTE, Joaquin, DE LA FUENTE, Jose et BOADELLA, Mariana, 2015. The Wild Side of Disease Control at the Wildlife-Livestock-Human Interface: A Review. In : *Frontiers in Veterinary Science* [en ligne]. 14 janvier 2015. Vol. 1. [Consulté le 28 juillet 2020]. DOI 10.3389/fvets.2014.00027. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2014.00027/abstract>.

GRANDE, Juan M., ZULUAGA, Santiago et MARCHINI, Silvio, 2018. Casualties of human-wildlife conflict. In : *Science*. 22 juin 2018. Vol. 360, n° 6395, pp. 1309-1309. DOI 10.1126/science.aau2465.

GU, Weidong et SWIHART, Robert K, 2004. Absent or undetected? Effects of non-detection of species occurrence on wildlife-habitat models. In : *Biological Conservation*. avril 2004. Vol. 116, n° 2, pp. 195-203. DOI 10.1016/S0006-3207(03)00190-3.

HAMEDE, Rodrigo K., BASHFORD, Jim, MCCALLUM, Hamish et JONES, Menna, 2009. Contact networks in a wild Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*) population: using social network analysis to reveal seasonal variability in social behaviour and its implications for transmission of devil facial tumour disease. In : *Ecology Letters*. 2009. Vol. 12, n° 11, pp. 1147-1157. DOI 10.1111/j.1461-0248.2009.01370.x.

HARPER, Lynsey R., GRIFFITHS, Nathan P., HANDLEY, Lori Lawson, SAYER, Carl D., READ, Daniel S., HARPER, Kirsten J., BLACKMAN, Rosetta C., LI, Jianlong et HÄNFLING, Bernd, 2019. Development and application of environmental DNA surveillance for the threatened crucian carp (*Carassius carassius*). In : *Freshwater Biology*. 2019. Vol. 64, n° 1, pp. 93-107. DOI 10.1111/fwb.13197.

HARRY, M., GAMBIER, B., BOUREZGUI, Y. et GARNIER-SILLAM, E., 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from rich organic samples: interference with humic substances. In : *Analisis*. juin 1999. Vol. 27, n° 5, pp. 439-441. DOI 10.1051/analisis:1999270439.

HARTMAN, Laurie J., COYNE, Susan R. et NORWOOD, David A., 2005. Development of a novel internal positive control for Taqman® based assays. In : *Molecular and Cellular Probes*. février 2005. Vol. 19, n° 1, pp. 51-59. DOI 10.1016/j.mcp.2004.07.006.



HASSELL, James M., BEGON, Michael, WARD, Melissa J. et FÈVRE, Eric M., 2017. Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. In : *Trends in Ecology & Evolution*. janvier 2017. Vol. 32, n° 1, pp. 55-67. DOI 10.1016/j.tree.2016.09.012.

HATA, Akihiko, KATAYAMA, Hiroyuki, KITAJIMA, Masaaki, VISVANATHAN, Chettiyappan, NOL, Chea et FURUMAI, Hiroaki, 2011. Validation of Internal Controls for Extraction and Amplification of Nucleic Acids from Enteric Viruses in Water Samples ▽. In : *Applied and Environmental Microbiology*. juillet 2011. Vol. 77, n° 13, pp. 4336-4343. DOI 10.1128/AEM.00077-11.

HEBERT, Paul D. N., CYWINSKA, Alina, BALL, Shelley L. et DEWAARD, Jeremy R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. In : *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 7 février 2003. Vol. 270, n° 1512, pp. 313-321. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.

HEBERT, Paul D. N. et GREGORY, T. Ryan, 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. In : SAVOLAINEN, Vincent (éd.), *Systematic Biology*. 1 octobre 2005. Vol. 54, n° 5, pp. 852-859. DOI 10.1080/10635150500354886.

HEBERT, Paul D.N., RATNASINGHAM, Sujeevan et DE WAARD, Jeremy R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. In : *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [en ligne]. 7 août 2003. Vol. 270, n° suppl\_1. [Consulté le 30 juillet 2020]. DOI 10.1098/rsbl.2003.0025. Disponible à l'adresse : <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2003.0025>.

HEDMAN, Johannes, KNUTSSON, Rickard, ANSELL, Ricky, RÅDSTRÖM, Peter et RASMUSSEN, Birgitta, 2013. Pre-PCR Processing in Bioterrorism Preparedness: Improved Diagnostic Capabilities for Laboratory Response Networks. In : *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science*. 24 août 2013. Vol. 11, n° S1, pp. S87-S101. DOI 10.1089/bsp.2012.0090.

HEDMAN, Johannes, NORDGAARD, Anders, DUFVA, Charlotte, RASMUSSEN, Birgitta, ANSELL, Ricky et RÅDSTRÖM, Peter, 2010. Synergy between DNA polymerases increases polymerase chain reaction inhibitor tolerance in forensic DNA analysis. In : *Analytical Biochemistry*. octobre 2010. Vol. 405, n° 2, pp. 192-200. DOI 10.1016/j.ab.2010.06.028.

HERMES, R, GÖRITZ, F, STREICH, Wj et HILDEBRANDT, Tb, 2007. Assisted Reproduction in Female Rhinoceros and Elephants ? Current Status and Future Perspective. In : *Reproduction in Domestic Animals*. septembre 2007. Vol. 42, n° s2, pp. 33-44. DOI 10.1111/j.1439-0531.2007.00924.x.

HOORFAR, J., MALORNY, B., ABDULMAWJOOD, A., COOK, N., WAGNER, M. et FACH, P., 2004. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. In : *Journal of Clinical Microbiology*. mai 2004. Vol. 42, n° 5, pp. 1863-1868. DOI 10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004.

HOSHINO, Tatsuhiko et INAGAKI, Fumio, 2012. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. In : *Systematic and Applied Microbiology*. septembre 2012. Vol. 35, n° 6, pp. 390-395. DOI 10.1016/j.syapm.2012.06.006.

HUGGINS, Lucas G., KOEHLER, Anson V., SCHUNACK, Bettina, INPANKAEW, Tawin et TRAUB, Rebecca J., 2020. A Host-Specific Blocking Primer Combined with Optimal

DNA Extraction Improves the Detection Capability of a Metabarcoding Protocol for Canine Vector-Borne Bacteria. In : *Pathogens*. 1 avril 2020. Vol. 9, n° 4, pp. 258.  
DOI 10.3390/pathogens9040258.

HUNTER, Margaret E., OYLER-MCCANCE, Sara J., DORAZIO, Robert M., FIKE, Jennifer A., SMITH, Brian J., HUNTER, Charles T., REED, Robert N. et HART, Kristen M., 2015. Environmental DNA (eDNA) Sampling Improves Occurrence and Detection Estimates of Invasive Burmese Pythons. In : *PLoS ONE* [en ligne]. 15 avril 2015. Vol. 10, n° 4. [Consulté le 17 avril 2020]. DOI 10.1371/journal.pone.0121655. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4398459/>.

JANE, Stephen F., WILCOX, Taylor M., MCKELVEY, Kevin S., YOUNG, Michael K., SCHWARTZ, Michael K., LOWE, Winsor H., LETCHER, Benjamin H. et WHITELEY, Andrew R., 2015. Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. In : *Molecular Ecology Resources*. janvier 2015. Vol. 15, n° 1, pp. 216-227.  
DOI 10.1111/1755-0998.12285.

JERDE, Christopher L., MAHON, Andrew R., CHADDERTON, W. Lindsay et LODGE, David M., 2011a. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA: eDNA surveillance of rare aquatic species. In : *Conservation Letters*. avril 2011. Vol. 4, n° 2, pp. 150-157. DOI 10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x.

JERDE, Christopher L., MAHON, Andrew R., CHADDERTON, W. Lindsay et LODGE, David M., 2011b. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. In : *Conservation Letters*. 2011. Vol. 4, n° 2, pp. 150-157. DOI 10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x.

JO, Toshiaki, MURAKAMI, Hiroaki, YAMAMOTO, Satoshi, MASUDA, Reiji et MINAMOTO, Toshifumi, 2019. Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. In : *Ecology and Evolution*. 21 janvier 2019. Vol. 9, n° 3, pp. 1135-1146. DOI 10.1002/ece3.4802.

JONES, Kate E., PATEL, Nikkita G., LEVY, Marc A., STOREYGARD, Adam, BALK, Deborah, GITTLEMAN, John L. et DASZAK, Peter, 2008. Global trends in emerging infectious diseases. In : *Nature*. février 2008. Vol. 451, n° 7181, pp. 990-993.  
DOI 10.1038/nature06536.

JUEN, Anita et TRAUGOTT, Michael, 2006. Amplification facilitators and multiplex PCR: Tools to overcome PCR-inhibition in DNA-gut-content analysis of soil-living invertebrates. In : *Soil Biology and Biochemistry*. juillet 2006. Vol. 38, n° 7, pp. 1872-1879.  
DOI 10.1016/j.soilbio.2005.11.034.

KELLY, Ryan P., PORT, Jesse A., YAMAHARA, Kevan M. et CROWDER, Larry B., 2014. Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. In : HOFMANN, Gretchen E. (éd.), *PLoS ONE*. 15 janvier 2014. Vol. 9, n° 1, pp. e86175.  
DOI 10.1371/journal.pone.0086175.

KERMEKCHIEV, M. B., KIRILOVA, L. I., VAIL, E. E. et BARNES, W. M., 2009. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. In : *Nucleic Acids Research*. 9 janvier 2009. Vol. 37, n° 5, pp. e40-e40. DOI 10.1093/nar/gkn1055.

KISAND, Veljo, VALENTE, Angelica, LAHM, Armin, TANET, Gerard et LETTIERI, Teresa, 2012. Phylogenetic and Functional Metagenomic Profiling for Assessing Microbial

Biodiversity in Environmental Monitoring. In : *PLOS ONE*. 27 août 2012. Vol. 7, n° 8, pp. e43630. DOI 10.1371/journal.pone.0043630.

KREADER, C A, 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. In : *Applied and environmental microbiology*. 1996. Vol. 62, n° 3, pp. 1102-1106. DOI 10.1128/AEM.62.3.1102-1106.1996.

KRESS, W. John, GARCÍA-ROBLEDO, Carlos, URIARTE, Maria et ERICKSON, David L., 2015. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. In : *Trends in Ecology & Evolution*. 1 janvier 2015. Vol. 30, n° 1, pp. 25-35. DOI 10.1016/j.tree.2014.10.008.

KRUSE, Hilde, KIRKEMO, Anne-Mette et HANDELAND, Kjell, 2004. Wildlife as Source of Zoonotic Infections. In : *Emerging Infectious Diseases*. décembre 2004. Vol. 10, n° 12, pp. 2067-2072. DOI 10.3201/eid1012.040707.

KUKIELKA, E., BARASONA, J.A., COWIE, C.E., DREWE, J.A., GORTAZAR, C., COTARELO, I. et VICENTE, J., 2013. Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. In : *Preventive Veterinary Medicine*. novembre 2013. Vol. 112, n° 3-4, pp. 213-221. DOI 10.1016/j.prevetmed.2013.08.008.

KUKIELKA, Esther A., JORI, Ferran, MARTÍNEZ-LÓPEZ, Beatriz, CHENAIS, Erika, MASEMBE, Charles, CHAVERNAC, David et STÅHL, Karl, 2016. Wild and Domestic Pig Interactions at the Wildlife–Livestock Interface of Murchison Falls National Park, Uganda, and the Potential Association with African Swine Fever Outbreaks. In : *Frontiers in Veterinary Science* [en ligne]. 14 avril 2016. Vol. 3. [Consulté le 28 juillet 2020]. DOI 10.3389/fvets.2016.00031. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fvets.2016.00031/abstract>.

KUMAR, Girish, EBLE, Jeff E. et GAITHER, Michelle R., 2019. A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. In : *Molecular Ecology Resources*. 12 novembre 2019. pp. 1755- 0998.13107. DOI 10.1111/1755-0998.13107.

KUMARI, Priyanka, DONG, Ke, EO, Kyung Yeon, LEE, Woo-Shin, KIMURA, Junpei et YAMAMOTO, Naomichi, 2019. DNA metabarcoding-based diet survey for the Eurasian otter (*Lutra lutra*): Development of a Eurasian otter-specific blocking oligonucleotide for 12S rRNA gene sequencing for vertebrates. In : *PLoS ONE* [en ligne]. 12 décembre 2019. Vol. 14, n° 12. [Consulté le 14 janvier 2020]. DOI 10.1371/journal.pone.0226253. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6907848/>.

LAKAY, F. M., BOTHA, A. et PRIOR, B. A., 2007. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. In : *Journal of Applied Microbiology*. 2007. Vol. 102, n° 1, pp. 265-273. DOI 10.1111/j.1365-2672.2006.03052.x.

LAMB, Philip D., HUNTER, Ewan, PINNEGAR, John K., CREER, Simon, DAVIES, Richard G. et TAYLOR, Martin I., 2019. How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. In : *Molecular Ecology*. janvier 2019. Vol. 28, n° 2, pp. 420-430. DOI 10.1111/mec.14920.

LANGE, Nicolien Schoneveld-de, MEIJAARD, Erik et LÖHR, Ansje, 2016. South to south learning in great ape conservation. In : *American Journal of Primatology*. 2016. Vol. 78, n° 6, pp. 669-678. DOI 10.1002/ajp.22531.

LEE, Nelson, HUI, David, WU, Alan, CHAN, Paul, CAMERON, Peter, JOYNT, Gavin M., AHUJA, Anil, YUNG, Man Yee, LEUNG, C.B., TO, K.F., LUI, S.F., SZETO, C.C., CHUNG, Sydney et SUNG, Joseph J.Y., 2003. A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. In : *New England Journal of Medicine*. 15 mai 2003. Vol. 348, n° 20, pp. 1986-1994. DOI 10.1056/NEJMoa030685.

LEVI, Taal, ALLEN, Jennifer M., BELL, Donovan, JOYCE, John, RUSSELL, Joshua R., TALLMON, David A., VULSTEK, Scott C., YANG, Chunyan et YU, Douglas W., 2019. Environmental DNA for the enumeration and management of Pacific salmon. In : *Molecular Ecology Resources*. 2019. Vol. 19, n° 3, pp. 597-608. DOI 10.1111/1755-0998.12987.

LEVY-BOOTH, David J., CAMPBELL, Rachel G., GULDEN, Robert H., HART, Miranda M., POWELL, Jeff R., KLIRONOMOS, John N., PAULS, K. Peter, SWANTON, Clarence J., TREVORS, Jack T. et DUNFIELD, Kari E., 2007. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. In : *Soil Biology and Biochemistry*. 1 décembre 2007. Vol. 39, n° 12, pp. 2977-2991. DOI 10.1016/j.soilbio.2007.06.020.

LIJTMAR, Darío A., KERR, Kevin C. R., STOECKLE, Mark Y. et TUBARO, Pablo L., 2012. DNA Barcoding Birds: From Field Collection to Data Analysis. In : KRESS, W. John et ERICKSON, David L. (éd.), *DNA Barcodes* [en ligne]. Totowa, NJ : Humana Press. pp. 127-152. [Consulté le 13 septembre 2019]. ISBN 978-1-61779-590-9. Disponible à l'adresse : [http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-591-6\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-591-6_7).

LOGAN, E. M., PULFORD, I. D., COOK, G. T. et MACKENZIE, A. B., 1997. Complexation of Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> by peat and humic acid. In : *European Journal of Soil Science*. 1997. Vol. 48, n° 4, pp. 685-696. DOI 10.1111/j.1365-2389.1997.tb00568.x.

LOHMAN, David J., PRAWIRADILAGA, Dewi M. et MEIER, Rudolf, 2009. Improved COI barcoding primers for Southeast Asian perching birds (Aves: Passeriformes). In : *Molecular Ecology Resources*. janvier 2009. Vol. 9, n° 1, pp. 37-40. DOI 10.1111/j.1755-0998.2008.02221.x.

LOPES, Cm, DE BARBA, Marta, BOYER, Frédéric, MERCIER, C, DA, Pjs, SILVA DA SILVA FILHO, Pedro, HEIDTMANN, Lm, GALIANO, Daniel, KUBIAK, Bruno, LANGONE, Patrícia, GARCÍAS, Fm, GIELLY, Ludovic, COISSAC, Éric, FREITAS, Tro et TABERLET, Pierre, 2015. DNA metabarcoding diet analysis for species with parapatric vs sympatric distribution: A case study on subterranean rodents. In : *Heredity*. 4 février 2015. Vol. 114. DOI 10.1038/hdy.2014.109.

LUTE, Michelle L., NAVARRETE, Carlos David, NELSON, Michael Paul et GORE, Meredith L., 2016. Moral dimensions of human-wildlife conflict. In : *Conservation Biology*. 1 décembre 2016. Vol. 30, n° 6, pp. 1200-1211. DOI 10.1111/cobi.12731.

MA, Hongjuan, STEWART, Kathryn, LOUGHEED, Stephen, ZHENG, Jinsong, WANG, Yuxiang et ZHAO, Jianfu, 2016. Characterization, optimization, and validation of environmental DNA (eDNA) markers to detect an endangered aquatic mammal. In : *Conservation Genetics Resources*. décembre 2016. Vol. 8, n° 4, pp. 561-568. DOI 10.1007/s12686-016-0597-9.

MAHARDIKA, Gusti Ngurah, SUARTHA, Nyoman I., KENCANA, Gusti A. Y., SUARDANA, Ida B. K., MAHARDIKA, Wisnu W. et BUDAYANTI, Nyoman S., 2019. Biochemistry and computer-generated graph comparison of the structural and nonstructural proteins of Spanish-1918 Influenza, pandemic-2009, and bird flu viruses. In : *Acta*

*Biochimica Polonica*. 24 juillet 2019. Vol. 66, n° 3, pp. 329-336.  
DOI 10.18388/abp.2019\_2795.

MAJANEVA, Markus, DISERUD, Ola H., EAGLE, Shannon H. C., BOSTRÖM, Erik, HAJIBABAEI, Mehrdad et EKREM, Torbjørn, 2018. Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. In : *Scientific Reports*. décembre 2018. Vol. 8, n° 1, pp. 4682. DOI 10.1038/s41598-018-23052-8.

MCCALLUM, Hamish et DOBSON, Andy, 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. In : *Trends in Ecology & Evolution*. 1 mai 1995. Vol. 10, n° 5, pp. 190-194. DOI 10.1016/S0169-5347(00)89050-3.

MILLER, Ryan S., FARNSWORTH, Matthew L. et MALMBERG, Jennifer L., 2013. Diseases at the livestock–wildlife interface: Status, challenges, and opportunities in the United States. In : *Preventive Veterinary Medicine*. juin 2013. Vol. 110, n° 2, pp. 119-132. DOI 10.1016/j.prevetmed.2012.11.021.

MIYAKAWA, Isamu, 2017. Organization and dynamics of yeast mitochondrial nucleoids. In : *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2017. Vol. 93, n° 5, pp. 339-359. DOI 10.2183/pjab.93.021.

MORAND, Serge, 2018. Advances and challenges in barcoding of microbes, parasites, and their vectors and reservoirs. In : *Parasitology*. avril 2018. Vol. 145, n° 5, pp. 537-542. DOI 10.1017/S0031182018000884.

MORSE, Stephen S, 1995. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. In : *Emerging Infectious Diseases*. 1995. Vol. 1, n° 1, pp. 9.

MOUSHOMI, Rashnat, WILGAR, Gregory, CARVALHO, Gary, CREER, Simon et SEYMOUR, Mathew, 2019. Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of *Daphnia magna* mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. In : *Scientific Reports* [en ligne]. 29 août 2019. Vol. 9. [Consulté le 25 novembre 2019]. DOI 10.1038/s41598-019-48984-7. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6715800/>.

MURGIA, M., PIZZO, P., SANDONÁ, D., ZANOVELLO, P., RIZZUTO, R. et VIRGILIO, F. Di, 1992. Mitochondrial DNA is not fragmented during apoptosis. In : *Journal of Biological Chemistry*. 6 mai 1992. Vol. 267, n° 16, pp. 10939-10941.

NAGLER, Magdalena, INSAM, Heribert, PIETRAMELLARA, Giacomo et ASCHER-JENULL, Judith, 2018. Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Vol. 102, n° 15, pp. 6343-6356. DOI 10.1007/s00253-018-9120-4.

NAGUIB, Mahmoud M., VERHAGEN, Josanne H., SAMY, Ahmed, ERIKSSON, Per, FIFE, Mark, LUNDKVIST, Åke, ELLSTRÖM, Patrik et JÄRHULT, Josef D., 2019. Avian influenza viruses at the wild–domestic bird interface in Egypt. In : *Infection Ecology & Epidemiology*. 1 janvier 2019. Vol. 9, n° 1, pp. 1575687. DOI 10.1080/20008686.2019.1575687.

OGRAM, Andrew, SAYLER, Gary S. et BARKAY, Tamar, 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. In : *Journal of Microbiological Methods*. décembre 1987. Vol. 7, n° 2-3, pp. 57-66. DOI 10.1016/0167-7012(87)90025-X.

OPEL, Kerry L., CHUNG, Denise et MCCORD, Bruce R., 2010. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR\*,†. In : *Journal of Forensic Sciences*. 2010. Vol. 55, n° 1, pp. 25-33. DOI 10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x.

ORDAZ-NÉMETH, Isabel, ARANDJELOVIC, Mimi, BOESCH, Lukas, GATISO, Tsegaye, GRIMES, Trokon, KUEHL, Hjalmar S., LORMIE, Menladi, STEPHENS, Colleen, TWEH, Clement et JUNKER, Jessica, 2017. The socio-economic drivers of bushmeat consumption during the West African Ebola crisis. In : *PLoS neglected tropical diseases*. 2017. Vol. 11, n° 3, pp. e0005450. DOI 10.1371/journal.pntd.0005450.

OSATHANUNKUL, Maslin, 2019. eDNA-based monitoring of parasitic plant (*Sapria himalayana*). In : *Scientific Reports* [en ligne]. 24 juin 2019. Vol. 9. [Consulté le 14 janvier 2020]. DOI 10.1038/s41598-019-45647-5. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6591406/>.

PAGENKOPP LOHAN, Katrina, 2019. Intact vs. homogenized subsampling: testing impacts of pre-extraction processing of multi-species samples on invasive species detection. In : *Management of Biological Invasions*. 2019. Vol. 10, n° 2, pp. 324-341. DOI 10.3391/mbi.2019.10.2.08.

PARLAYICI, Serife, ESKIZEYBEK, Volkan, AVCI, Ahmet et PEHLIVAN, Erol, 2015. Removal of chromium (VI) using activated carbon-supported-functionalized carbon nanotubes. In : *Journal of Nanostructure in Chemistry*. septembre 2015. Vol. 5, n° 3, pp. 255-263. DOI 10.1007/s40097-015-0156-z.

PAUTARD, Eric, 2016. Opinions et pratiques environnementales des Français en 2015. In : . 2016. pp. 11.

PHOURATSAMAY, Albert, 2018. Précision du statut sanitaire des hérons garde-boeufs (*Bubulcus ibis*) présents dans le Sud-Ouest de la France en 2016 et 2017 vis à vis des virus de l'influenza aviaire, des virus de la maladie de Newcastle, de *Mycoplasma gallisepticum* et de *Chlamydia* spp. In : . 2018. pp. 112.

PIAGGIO, Antoinette J., ENGEMAN, Richard M., HOPKEN, Matthew W., HUMPHREY, John S., KEACHER, Kandy L., BRUCE, William E. et AVERY, Michael L., 2014a. Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. In : *Molecular Ecology Resources*. mars 2014. Vol. 14, n° 2, pp. 374-380. DOI 10.1111/1755-0998.12180.

PIAGGIO, Antoinette J., ENGEMAN, Richard M., HOPKEN, Matthew W., HUMPHREY, John S., KEACHER, Kandy L., BRUCE, William E. et AVERY, Michael L., 2014b. Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. In : *Molecular Ecology Resources*. mars 2014. Vol. 14, n° 2, pp. 374-380. DOI 10.1111/1755-0998.12180.

PIETRAMELLARA, Giacomo, ASCHER-JENULL, Judith, BORGOGNI, Federica, CECCHERINI, Maria Teresa, GUERRI, G. et NANNIPIERI, P., 2008. Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. In : *Biol Fertil Soils*. 1 février 2008. Vol. 45, pp. 219-235. DOI 10.1007/s00374-008-0345-8.

PIMM, L, 1995. The Future of Biodiversity. In : . 1995. Vol. 269, pp. 4.

PIPER, Alexander M, BATOVSKA, Jana, COGAN, Noel O I, WEISS, John, CUNNINGHAM, John Paul, RODONI, Brendan C et BLACKET, Mark J, 2019. Prospects

and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. In : *GigaScience* [en ligne]. 30 juillet 2019. Vol. 8, n° 8. [Consulté le 14 janvier 2020]. DOI 10.1093/gigascience/giz092. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6667344/>.

POMPANON, François, COISSAC, Éric et TABERLET, Pierre, 2011. *Metabarcoding, a new way of analysing biodiversity*. S.l. : s.n.

POMPANON, Francois, DEAGLE, Bruce E., SYMONDSON, William O. C., BROWN, David S., JARMAN, Simon N. et TABERLET, Pierre, 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. In : *Molecular Ecology*. avril 2012. Vol. 21, n° 8, pp. 1931-1950. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x.

PORTEOUS, L. Arlene et ARMSTRONG, John L., 1991. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. In : *Current Microbiology*. juin 1991. Vol. 22, n° 6, pp. 345-348. DOI 10.1007/BF02092152.

POULETTE, Brigitte, 2018. Enquête sur la structure des exploitations agricoles. In : . 2018. pp. 6.

PROSSER, James I., 2010. Replicate or lie. In : *Environmental Microbiology*. 2010. Vol. 12, n° 7, pp. 1806-1810. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02201.x.

REES, Helen C., MADDISON, Ben C., MIDDLEDITCH, David J., PATMORE, James R.M. et GOUGH, Kevin C., 2014. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. In : CRISPO, Erika (éd.), *Journal of Applied Ecology*. octobre 2014. Vol. 51, n° 5, pp. 1450-1459. DOI 10.1111/1365-2664.12306.

REISS, Rebecca A. et RUTZ, Bridget, 1999. Quality Control PCR: A Method for Detecting Inhibitors of *Taq* DNA Polymerase. In : *BioTechniques*. novembre 1999. Vol. 27, n° 5, pp. 920-926. DOI 10.2144/99275bm09.

RICHOMME, C., GAUTHIER, D. et FROMONT, E., 2006. Contact rates and exposure to inter-species disease transmission in mountain ungulates. In : *Epidemiology and Infection*. février 2006. Vol. 134, n° 1, pp. 21-30. DOI 10.1017/S0950268805004693.

RICKWOOD, D. et CHAMBERS, J. a. A., 1981. Evidence for protected regions of DNA in the mitochondrial nucleoid of *Saccharomyces cerevisiae*. In : *FEMS Microbiology Letters*. 1 octobre 1981. Vol. 12, n° 2, pp. 187-190. DOI 10.1111/j.1574-6968.1981.tb07639.x.

ROSSI, Luca, TIZZANI, Paolo, RAMBOZZI, Luisa, MORONI, Barbara et MENEGUZ, Pier Giuseppe, 2019. Sanitary Emergencies at the Wild/Domestic Caprines Interface in Europe. In : *Animals*. 5 novembre 2019. Vol. 9, n° 11, pp. 922. DOI 10.3390/ani9110922.

SAGAR, Kalpana, SINGH, Salam Pradeep, GOUTAM, Kapil Kumar et KONWAR, Bolin Kumar, 2014. Assessment of five soil DNA extraction methods and a rapid laboratory-developed method for quality soil DNA extraction for 16S rDNA-based amplification and library construction. In : *Journal of Microbiological Methods*. février 2014. Vol. 97, pp. 68-73. DOI 10.1016/j.mimet.2013.11.008.

SARD, Nicholas M., HERBST, Seth J., NATHAN, Lucas, UHRIG, Genelle, KANEFSKY, Jeannette, ROBINSON, John D. et SCRIBNER, Kim T., 2019. Comparison of fish detections, community diversity, and relative abundance using environmental DNA metabarcoding and

traditional gears. In : *Environmental DNA*. 9 octobre 2019. pp. edn3.38.  
DOI 10.1002/edn3.38.

SCHÄFFER, Sylvia, ZACHOS, Frank E. et KOBLMÜLLER, Stephan, 2017. Opening the treasure chest: A DNA-barcoding primer set for most higher taxa of Central European birds and mammals from museum collections. In : *PloS One*. 2017. Vol. 12, n° 3, pp. e0174449.  
DOI 10.1371/journal.pone.0174449.

SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L. et JOHNE, R., 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. In : *Journal of Applied Microbiology*. 2012. Vol. 113, n° 5, pp. 1014-1026. DOI 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.

SCHWARTZ, T. R., SCHWARTZ, E. A., MIESZERSKI, L., MCNALLY, L. et KOBILINSKY, L., 1991. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. In : *Journal of Forensic Sciences*. juillet 1991. Vol. 36, n° 4, pp. 979-990.

SEDLAK, Ruth Hall, KUYPERS, Jane et JEROME, Keith R., 2014. A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples. In : *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. décembre 2014. Vol. 80, n° 4, pp. 285-286.  
DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.004.

SEO, G. T. et OHGAKI, S., 2001. Evaluation of refractory organic removal in combined biological powdered activated carbon - microfiltration for advanced wastewater treatment. In : *Water Science and Technology*. 1 juin 2001. Vol. 43, n° 11, pp. 67-74.  
DOI 10.2166/wst.2001.0668.

SHEHZAD, Wasim, RIAZ, Tiayyba, NAWAZ, Muhammad A., MIQUEL, Christian, POILLOT, Carole, SHAH, Safdar A., POMPANON, François, COISSAC, Eric et TABERLET, Pierre, 2012. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. In : *Molecular Ecology*. 2012. Vol. 21, n° 8, pp. 1951-1965. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05424.x.

SIDSTEDT, Maja, JANSSON, Linda, NILSSON, Elin, NOPPA, Laila, FORSMAN, Mats, RÅDSTRÖM, Peter et HEDMAN, Johannes, 2015. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. In : *Analytical Biochemistry*. 15 octobre 2015. Vol. 487, pp. 30-37. DOI 10.1016/j.ab.2015.07.002.

SIDSTEDT, Maja, RÅDSTRÖM, Peter et HEDMAN, Johannes, 2020. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. In : *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 1 avril 2020. Vol. 412, n° 9, pp. 2009-2023. DOI 10.1007/s00216-020-02490-2.

SIDSTEDT, Maja, STEFFEN, Carolyn R., KIESLER, Kevin M., VALLONE, Peter M., RÅDSTRÖM, Peter et HEDMAN, Johannes, 2019. The impact of common PCR inhibitors on forensic MPS analysis. In : *Forensic Science International: Genetics*. 1 mai 2019. Vol. 40, pp. 182-191. DOI 10.1016/j.fsigen.2019.03.001.

SIEMBIEDA, J. L., KOCK, R. A., MCCRACKEN, T. A. et NEWMAN, S. H., 2011. The role of wildlife in transboundary animal diseases. In : *Animal Health Research Reviews*. juin 2011. Vol. 12, n° 1, pp. 95-111. DOI 10.1017/S1466252311000041.

SIUDA, W et CHRÓST, Rj, 2000. Concentration and susceptibility of dissolved DNA for enzyme degradation in lake water-some methodological remarks. In : *Aquatic Microbial Ecology*. 2000. Vol. 21, pp. 195-201. DOI 10.3354/ame021195.



SMART, Adam S., WEEKS, Andrew R., VAN ROOYEN, Anthony R., MOORE, Alana, MCCARTHY, Michael A. et TINGLEY, Reid, 2016. Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling. In : YOCCOZ, Nigel (éd.), *Methods in Ecology and Evolution*. novembre 2016. Vol. 7, n° 11, pp. 1291-1298. DOI 10.1111/2041-210X.12598.

SMETS, Wenke, LEFF, Jonathan W., BRADFORD, Mark A., MCCULLEY, Rebecca L., LEBEER, Sarah et FIERER, Noah, 2016. A method for simultaneous measurement of soil bacterial abundances and community composition via 16S rRNA gene sequencing. In : *Soil Biology and Biochemistry*. mai 2016. Vol. 96, pp. 145-151. DOI 10.1016/j.soilbio.2016.02.003.

SORIA, M. C., SORIA, M. A., BUENO, D. J., GODANO, E. I., GÓMEZ, S. C., VIABUTRON, I. A., PADIN, V. M. et ROGÉ, A. D., 2017. Salmonella spp. contamination in commercial layer hen farms using different types of samples and detection methods. In : *Poultry Science*. 1 août 2017. Vol. 96, n° 8, pp. 2820-2830. DOI 10.3382/ps/pex053.

SPENS, Johan, EVANS, Alice R., HALFMAERTEN, David, KNUDSEN, Steen W., SENGUPTA, Mita E., MAK, Sarah S. T., SIGSGAARD, Eva E. et HELLSTRÖM, Micaela, 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. In : *Methods in Ecology and Evolution*. 2017. Vol. 8, n° 5, pp. 635-645. DOI 10.1111/2041-210X.12683.

STRICKLER, Katherine M., FREMIER, Alexander K. et GOLDBERG, Caren S., 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. In : *Biological Conservation*. 1 mars 2015. Vol. 183, pp. 85-92. DOI 10.1016/j.biocon.2014.11.038.

SUTLOVIC, Davorka, GAMULIN, Stjepan, DEFINIS-GOJANOVIC, Marija, GUGIC, Dijana et ANDJELINOVIC, Simun, 2008. Interaction of humic acids with human DNA: Proposed mechanisms and kinetics. In : *ELECTROPHORESIS*. 2008. Vol. 29, n° 7, pp. 1467-1472. DOI 10.1002/elps.200700699.

TABERLET, Pierre, BONIN, Aurélie, ZINGER, Lucie et COISSAC, Eric, 2018. *Environmental DNA* [en ligne]. S.l. : Oxford University Press. [Consulté le 27 octobre 2019]. ISBN 978-0-19-876722-0. Disponible à l'adresse : <http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/oso/9780198767220.001.0001/oso-9780198767220>.

TABERLET, Pierre, COISSAC, Eric, HAJIBABAEI, Mehrdad et RIESEBERG, Loren H., 2012. Environmental DNA: ENVIRONMENTAL DNA. In : *Molecular Ecology*. avril 2012. Vol. 21, n° 8, pp. 1789-1793. DOI 10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x.

TAVARES, Erika S et BAKER, Allan J, 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. In : *BMC Evolutionary Biology*. 2008. Vol. 8, n° 1, pp. 81. DOI 10.1186/1471-2148-8-81.

TEBBE, C C et VAHJEN, W, 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1993. Vol. 59, n° 8, pp. 2657-2665. DOI 10.1128/AEM.59.8.2657-2665.1993.

THE GLOBAL CONSORTIUM FOR H5N8 AND RELATED INFLUENZA VIRUSES, 2016. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8. In : *Science*. 14 octobre 2016. Vol. 354, n° 6309, pp. 213-217. DOI 10.1126/science.aaf8852.

THOMSEN, Philip Francis, KIELGAST, Jos, IVERSEN, Lars L., WIUF, Carsten, RASMUSSEN, Morten, GILBERT, M. Thomas P., ORLANDO, Ludovic et WILLERSLEV, Eske, 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. In : *Molecular Ecology*. 2012. Vol. 21, n° 11, pp. 2565-2573. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.

THOMSEN, Philip Francis, KIELGAST, Jos, IVERSEN, Lars L., WIUF, Carsten, RASMUSSEN, Morten, GILBERT, M. Thomas P., ORLANDO, Ludovic et WILLERSLEV, Eske, 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA: SPECIES MONITORING BY ENVIRONMENTAL DNA. In : *Molecular Ecology*. juin 2012. Vol. 21, n° 11, pp. 2565-2573. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.

THOMSEN, Philip Francis, KIELGAST, Jos, IVERSEN, Lars Lønsmann, MØLLER, Peter Rask, RASMUSSEN, Morten et WILLERSLEV, Eske, 2012. Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. In : LIN, Senjie (éd.), *PLoS ONE*. 29 août 2012. Vol. 7, n° 8, pp. e41732. DOI 10.1371/journal.pone.0041732.

THOMSEN, Philip Francis et WILLERSLEV, Eske, 2015a. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. In : *Biological Conservation*. mars 2015. Vol. 183, pp. 4-18. DOI 10.1016/j.biocon.2014.11.019.

THOMSEN, Philip Francis et WILLERSLEV, Eske, 2015b. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. In : *Biological Conservation*. mars 2015. Vol. 183, pp. 4-18. DOI 10.1016/j.biocon.2014.11.019.

TIGHE, Andrew J., OVERBY, Sarah, THURMAN, Kiera, GANDOLA, Robert, FULANDA, Bernerd, BYRNE, John et CARLSSON, Jens, 2020. Investigating a simplified method for noninvasive genetic sampling in East African mammals using silica dried scat swabs. In : *Ecology and Evolution*. avril 2020. Vol. 10, n° 7, pp. 3330-3337. DOI 10.1002/ece3.6115.

TIWARI, Ruchi, DHAMA, Kuldeep, SHARUN, Khan, IQBAL YATOO, Mohd., MALIK, Yashpal Singh, SINGH, Rajendra, MICHALAK, Izabela, SAH, Ranjit, BONILLA-ALDANA, D. Katterine et RODRIGUEZ-MORALES, Alfonso J, 2020. COVID-19: animals, veterinary and zoonotic links. In : *Veterinary Quarterly*. 1 janvier 2020. Vol. 40, n° 1, pp. 169-182. DOI 10.1080/01652176.2020.1766725.

TRINGE, Susannah Green, VON MERING, Christian, KOBAYASHI, Arthur, SALAMOV, Asaf A., CHEN, Kevin, CHANG, Hwai W., PODAR, Mircea, SHORT, Jay M., MATHUR, Eric J., DETTER, John C., BORK, Peer, HUGENHOLTZ, Philip et RUBIN, Edward M., 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. In : *Science (New York, N.Y.)*. 22 avril 2005. Vol. 308, n° 5721, pp. 554-557. DOI 10.1126/science.1107851.

TSAI, Y L et OLSON, B H, 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1992. Vol. 58, n° 7, pp. 2292-2295. DOI 10.1128/AEM.58.7.2292-2295.1992.

TSIODRAS, Sotirios, KELESIDIS, Theodoros, KELESIDIS, Iosif, BAUCHINGER, Ulf et FALAGAS, Matthew E., 2008. Human infections associated with wild birds. In : *Journal of Infection*. février 2008. Vol. 56, n° 2, pp. 83-98. DOI 10.1016/j.jinf.2007.11.001.

TSUJI, Satsuki, YAMANAKA, Hiroki et MINAMOTO, Toshifumi, 2017. Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. In : *Limnology*. 1 janvier 2017. Vol. 18, n° 1, pp. 1-7. DOI 10.1007/s10201-016-0483-x.

- TURNER, Cameron R., BARNES, Matthew A., XU, Charles C. Y., JONES, Stuart E., JERDE, Christopher L. et LODGE, David M., 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. In : GILBERT, M. (éd.), *Methods in Ecology and Evolution*. juillet 2014. Vol. 5, n° 7, pp. 676-684. DOI 10.1111/2041-210X.12206.
- UCHII, Kimiko, DOI, Hideyuki, OKAHASHI, Teruyuki, KATANO, Izumi, YAMANAKA, Hiroki, SAKATA, Masayuki K. et MINAMOTO, Toshifumi, 2019. Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA. In : *Environmental DNA*. 15 octobre 2019. pp. edn3.37. DOI 10.1002/edn3.37.
- VALIERE, Nathaniel et TABERLET, Pierre, 2000. Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. In : *Molecular Ecology*. 2000. Vol. 9, n° 12, pp. 2150-2152. DOI 10.1046/j.1365-294X.2000.11142.x.
- VESTHEIM, Hege et JARMAN, Simon N., 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. In : *Frontiers in Zoology*. 20 juillet 2008. Vol. 5, n° 1, pp. 12. DOI 10.1186/1742-9994-5-12.
- VIEIRA, I. C. G., TOLEDO, P. M., SILVA, J. M. C. et HIGUCHI, H., 2008. Deforestation and threats to the biodiversity of Amazonia. In : *Brazilian Journal of Biology*. novembre 2008. Vol. 68, n° 4, pp. 949-956. DOI 10.1590/S1519-69842008000500004.
- VOLKMANN, Holger, SCHWARTZ, Thomas, BISCHOFF, Petra, KIRCHEN, Silke et OBST, Ursula, 2004a. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). In : *Journal of Microbiological Methods*. février 2004. Vol. 56, n° 2, pp. 277-286. DOI 10.1016/j.mimet.2003.10.014.
- VOLKMANN, Holger, SCHWARTZ, Thomas, BISCHOFF, Petra, KIRCHEN, Silke et OBST, Ursula, 2004b. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). In : *Journal of Microbiological Methods*. février 2004. Vol. 56, n° 2, pp. 277-286. DOI 10.1016/j.mimet.2003.10.014.
- WAUGH, John, EVANS, Max, MILLAR, Craig et LAMBERT, David, 2011. Birdstrikes and barcoding: Can DNA methods help make the airways safer? In : *Molecular ecology resources*. 1 janvier 2011. Vol. 11, pp. 38-45. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02884.x.
- WEI, Fuwen, SWAISGOOD, Ronald, HU, Yibo, NIE, Yonggang, YAN, Li, ZHANG, Zejun, QI, Dunwu et ZHU, Lifeng, 2015. Progress in the ecology and conservation of giant pandas. In : *Conservation Biology*. 2015. Vol. 29, n° 6, pp. 1497-1507. DOI 10.1111/cobi.12582.
- WEI, Nan, NAKAJIMA, Fumiyuki et TOBINO, Tomohiro, 2019. Variation of Environmental DNA in Sediment at Different Temporal Scales in Nearshore Area of Tokyo Bay. In : *Journal of Water and Environment Technology*. 2019. Vol. 17, n° 3, pp. 153-162. DOI 10.2965/jwet.18-047.
- WILCOX, Taylor M., MCKELVEY, Kevin S., YOUNG, Michael K., JANE, Stephen F., LOWE, Winsor H., WHITELEY, Andrew R. et SCHWARTZ, Michael K., 2013. Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. In : *PLOS ONE*. 26 mars 2013. Vol. 8, n° 3, pp. e59520. DOI 10.1371/journal.pone.0059520.
- WILLERSLEV, Eske, HANSEN, Anders J., BINLADEN, Jonas, BRAND, Tina B., GILBERT, M. Thomas P., SHAPIRO, Beth, BUNCE, Michael, WIUF, Carsten, GILICHINSKY, David A. et COOPER, Alan, 2003. Diverse plant and animal genetic records

from Holocene and Pleistocene sediments. In : *Science (New York, N.Y.)*. 2 mai 2003. Vol. 300, n° 5620, pp. 791-795. DOI 10.1126/science.1084114.

WILLERSLEV, Eske, HANSEN, Anders J., RØNN, Regin, BRAND, Tina B., BARNES, Ian, WIUF, Carsten, GILICHINSKY, David, MITCHELL, David et COOPER, Alan, 2004. Long-term persistence of bacterial DNA. In : *Current Biology*. 6 janvier 2004. Vol. 14, n° 1, pp. R9-R10. DOI 10.1016/j.cub.2003.12.012.

WOODROFFE, Rosie, 1999. Managing disease threats to wild mammals. In : *Animal Conservation*. 1999. Vol. 2, n° 3, pp. 185-193. DOI 10.1111/j.1469-1795.1999.tb00064.x.

YAMADA, Etsu, OZAKI, Takashi et KIMURA, Machiko, 1998. Determination and Behavior of Humic Substances as Precursors of Trihalomethane in Environmental Water. In : *Analytical Sciences*. 1998. Vol. 14, n° 2, pp. 327-332. DOI 10.2116/analsci.14.327.

YANG, Fan, DING, Fei, CHEN, Hong, HE, Mingqi, ZHU, Shixin, MA, Xin, JIANG, Li et LI, Haifeng, 2018. DNA Barcoding for the Identification and Authentication of Animal Species in Traditional Medicine. In : *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* [en ligne]. 22 avril 2018. Vol. 2018. [Consulté le 22 juillet 2020]. DOI 10.1155/2018/5160254. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937547/>.

ZHANG, Tao, WU, Qunfu et ZHANG, Zhigang, 2020. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. In : *Current Biology*. avril 2020. Vol. 30, n° 7, pp. 1346- 1351.e2. DOI 10.1016/j.cub.2020.03.022.

ZHANG, Zhian, KERMEKCHIEV, Milko B. et BARNES, Wayne M., 2010. Direct DNA Amplification from Crude Clinical Samples Using a PCR Enhancer Cocktail and Novel Mutants of Taq. In : *The Journal of Molecular Diagnostics*. mars 2010. Vol. 12, n° 2, pp. 152-161. DOI 10.2353/jmoldx.2010.090070.

ZHOU, J, BRUNS, M A et TIEDJE, J M, 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. In : *Applied and environmental microbiology*. 1996. Vol. 62, n° 2, pp. 316-322. DOI 10.1128/AEM.62.2.316-322.1996.

# Annexe 1: protocole d'extraction à partir de tissu frais.

---

## Protocole modifié d'extraction de tissus frais à partir du kit One4all de biobasic cana INC®

Les buffer ACL et CL sont préchauffés à 56°C afin de remettre en solution tout précipité et d'améliorer l'élution finale.

1. Couper 25mg de tissu en petits morceaux, (modification d protocole), les morceaux sont passés au Precellys© dans des tubes à billes en céramiques (protocole 2x15s à 5500rpm),
2. Ajouter 180µl de buffer ACL et bien mélanger.
3. Ajouter 20µL de protéinase K. Mélanger grossièrement en passant au vortex© puis incubé à 56°C jusqu'à ce que le tissu soit totalement lysé. Les tubes sont homogénéisés régulièrement durant la procédure.
4. Mélanger à l'aide d'un vortex© pendant 15 secondes puis ajouter 200µl de buffer CL et mélanger.
5. Ajouter 200µL d'éthanol (96-100%) et re-mélanger à l'aide d'un vortex©.
6. Transférer la solution y compris tout précipité dans une colonne EZ-10© elle-même placée dans un tube collecteur de 2ml. Centrifuger à 9 000xg (12 000 rpm) pendant 1 minute. Jeter le surplus.
7. Ajouter 500µL de solution CW1 puis centrifuger pendant 1 minute à 9 000xg (12 000 rpm). Jeter l'élution.
8. Ajouter 500 µL de solution CW2 puis centrifuger 1 minute à 9 000xg (12 000 rpm). Jeter l'élution.
9. Placer la colonne vidée dans un tube collecteur et centrifuger pendant 2 minutes à 9 000xg (12 000 rpm) afin d'assécher la membrane. Jeter l'élution et transférer la colonne dans un tube propre de 1.5mL. Laisser incubé couvercle ouvert afin d'éliminer toute trace résiduelle d'éthanol à température ambiante pendant 2 à 3 minutes.
10. Ajouter 25 µL de buffer CE directement au centre de la membrane. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes puis centrifuger pendant 2 minutes à 9 000xg (12 000 rpm) afin d'éluer l'ADN. Répéter l'opération avec 25µL de buffer CE afin d'obtenir un volume final de 50µL. Le buffer CE est préalablement réchauffé à 60°C afin d'améliorer l'efficacité d'élution.

## **Annexe 2: protocole d'extraction d'ADN génomique à partir du kit d'extraction One4all® de Biobasic Canada INC**

---

Le buffer CL est préchauffé à 56°C afin de remettre en solution tout précipité. Le buffer Ce est chauffé au préalable à 60°C afin d'améliorer l'élution finale.

1. Aspirer 200µL de solution et ajouter 200µL de buffer Cl ainsi que 20µL de protéinase K. Mélanger à l'aide d'un vortex©.
2. Incuber pendant 10 minutes, homogénéiser grossièrement toutes les 3 minutes afin de mettre en suspension les particules et favoriser la lyse cellulaire.
3. Ajouter 200µL d'éthanol (96-100%) et remélanger à l'aide d'un vortex©.
4. Transférer la solution y compris tout précipité dans une colonne EZ-10© elle-même placée dans un tube collecteur de 2ml. Centrifuger à 9 000xg (12 000 rpm) pendant 1 minute. Jeter le surplus.
5. Ajouter 500µL de solution CW1 puis centrifuger pendant 1 minute à 9 000xg (12 000 rpm). Jeter l'élution.
6. Ajouter 500 µL de solution CW2 puis centrifuger 1 minute à 9 000xg (12 000 rpm). Jeter l'élution.
7. Placer la colonne vidée dans un tube collecteur et centrifuger pendant 2 minutes à 9 000xg (12 000 rpm) afin d'assécher la membrane. Jeter l'élution et transférer la colonne dans un tube propre de 1.5mL. Laisser incuber couvercle ouvert afin d'éliminer toute trace résiduelle d'éthanol à température ambiante pendant 2 à 3 minutes.
8. Ajouter 25 µL de buffer CE directement au centre de la membrane. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes puis centrifuger pendant 2 minutes à 9 000xg (12 000 rpm) afin d'éluer l'ADN. Répéter l'opération avec 25µL de buffer CE afin d'obtenir un volume final de 50µL. Le buffer CE est préalablement réchauffé à 60°C afin d'améliorer l'efficacité d'élution

## **Annexe 3. Protocole modifié d'extraction à partir du kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini kit**

---

1. Peser 180-220 mg de fèces (ou 200µL si échantillon liquide) dans un tube à centrifuger de 2mL, placer le tube sur glace.
2. Ajouter 1mL de buffer Inhibitex à chaque échantillon de fèces. Mélanger à l'aide d'un vortex® pendant 1 minute ou jusqu'à ce que l'échantillon soit dilué.
3. Centrifuger l'échantillon à 20 000xg (14 000 rpm) pendant 1 minute afin de précipiter les particules.
4. Ajouter 25 µL de protéinase K dans un nouveau tube de centrifugation de 2 mL.
5. Ajouter 600µL de surnageant dans le tube contenant la protéinase K.
6. Ajouter 600µL de buffer AL puis passer au vortex 15s.
7. Incuber à 70°C pendant 10 minute en homogénéisant régulièrement toutes les 3 minutes environ.
8. Ajouter 600 µL d'éthanol (96-100%) au lysat et mélanger en utilisant un vortex®.
9. Transférer avec précaution 600µL de lysat dans une colonne QIamp. Fermer le couvercle et centrifuger pendant 1 minute. Placer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube collecteur de 2 mL puis jeter le tube contenant le filtrat.
10. Répéter l'étape 9 jusqu'à ce que l'ensemble du lysat soit passer dans la colonne.
11. Ouvrir avec précaution la colonne et ajouter 500µL de buffer AW1. Centrifuger à vitesse maximal pendant 1 minute. Placer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube collecteur et jeter le filtrat.
12. Ajouter 500µL de buffer AW2. Centrifuger à vitesse maximal pendant 3 minutes. Jeter le tube collecteur contenant le filtrat.
13. Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 ml et centrifuger à vitesse maximale pendant 3 minutes.
14. Transférer la colonne dans un nouveau tube de 1.5 mL identifié puis pipeter 200µL de buffer ATE directement sur la membrane. Laisser incuber pendant 1 minute à température ambiante. Puis centrifuger à vitesse maximal pour éluer l'ADN.
15. La qualité de l'ADN obtenu est vérifiée par spectroscopie à l'aide d'un Clariostar®.

# Annexe 4 : Fiche de synthèse du protocole proposé pour une application sur le terrain

*Echantillonnage* Eau turbide riche en particules prélevé en respectant les règles de biosécurité et en évitant toute contamination.

Matériel utilisé :

\*tube Falcon® 50 mL/100mL.

*Pré-extraction* En salle 3 de microbiologie.

Remarque : protocole adapté pour un volume de 50 mL, le filtre pouvant filtrer une plus grande quantité, il est possible de filtrer une plus grande quantité de surnageant (jusqu'à saturation du filtre) pour obtenir plus de matériel génétique sur les filtres, le protocole peut être adapté en fusionnant des échantillons (plusieurs tubes de 50 mL ou en utilisant des contenant plus important).

\*Transfert de l'échantillon (à raison d'un volume de 45mL) dans un tube Falcon® de 50mL.

\*Facultatif : préparer au préalable un mélange de 1.97g de NaHPO<sub>4</sub> et 14,7g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (quantité pour 1L de buffer phosphaté).

\*Ajout direct de 88 mg de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 660 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ou ajout direct de 750 mg d'un mélange de phosphate dans les échantillons [adapté selon un protocole existant (Taberlet et al. 2018)]

\*Agiter pendant 15 minute sur plateau oscillant (60mpm) à 6°C.

\*Centrifuger à 4000 rpm pendant 5 minutes minimum.

\*Filtrer du surnageant sur filtre.

Matériel : filtre Corning® 0.22 PES stérile, lame de scalpel 23 stérile, pince stérile, erlenmeyer® adaptable au goulot du filtre de contenance d'au minimum 100mL, pompe à vide.

*Manipulation sous une hotte à flux laminaire de type Sorbonne®.*

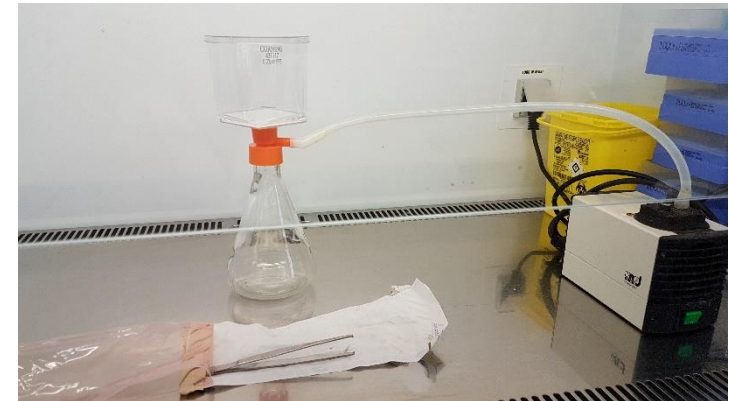
\*Nettoyage de la paillasse par une solution aseptisante, utilisation d'un Erlenmeyer® muni d'un goulot vissable.

\*Séparation en 2 hémifiltres et transfert dans des tubes à billes d'argile. La séparation se fait à l'aide d'une pince stérile et d'une lame de scalpel de 23, puis le transfert dans les tubes en enroulant les hémifiltres autour de la pince.

\*Passage au Precellys® (reference KT 03961) après ajout de 1mL d'eau stérile ADN-free ; 3 cycles de 30s à 5 500 rpm entrecoupés de 10s de pauses.

\*Centrifugation des tubes Ependorf® à 9000 rpm pendant 1 minute.

\*Prélèvement de 100µL de surnageant pour extraction.



*Photo du dispositif de filtration*



*Extraction*

*En salle 1 dédiée aux PCR et extractions.*

\*Kit Qiagen® One4all protocole cellule modifié et selon les indications du fabricant. Quantité de départ d'échantillon : 100µL.

*Préchauffer un bain marie à 56°C.*

-Ajout de 200µL de buffer CL et 2µL de protéinase K. Mélanger à l'aide d'un vortex®.

-Incuber à 56°C pendant 10 minutes, mélanger dans un vortex® toutes les 3 minutes.

-Ajouter 200µL d'éthanol (96-100%) et mélanger grossièrement dans un vortex®.

-Transférer le mélange dans une colonne d'extraction (ref. EZ-10 Spin column) placée dans un tube collecteur de 2mL. Centrifuger à 9.000xg (ou 12.000 rpm) pendant 1 minute.

-Ajouter 500µL de solution CW1 puis centrifuger 1 minute à 9.000xg (soit 12.000 rpm). Jeter l'éluat.

-Ajouter 500µL de solution CW2 puis centrifuger 1 minute à 9.000xg (soit 12.000 rpm). Jeter l'éluat.

-Centrifuger la colonne vide pendant 2 minutes à 9.000xg (soit 12.000 rpm), transférer la colonne dans un tube Ependorf® identifié, laisser le couvercle ouvert et incuber 3 min à température afin de bien aérer le filtre et s'assurer qu'il n'avait pas de molécules d'éthanol résiduels (inhibiteur de PCR).

-Modification de la dernière étape d'élution : préchauffer le buffer CE à 60°C puis ajouter 25µl au centre du filtre, incuber à température ambiante pendant 2 minutes puis centrifuger à 9.000xg (soit 12.000 rpm). Répéter l'étape d'élution une seconde fois (même tube collecteur).

-Echantillon final de 50µl sur buffer CE, à amplifier dans la foulée ou conserver à 6°C pour une utilisation le lendemain, -20°C sur plusieurs semaines, -60°C pour plusieurs mois ou années.

*Amplification*

*En salle 1 dédiée aux PCR et extractions.*

*Par qPCR*

\*Utilisation des amorces AVES02 (Taberlet et al. 2018) :

*Aves02 FGAAAATGTAGCCCATTCTTCC*

*Aves02 RCATACCGCCGTCGCCAG*

\*Composition d'un puit d'extraction volume total 20µL

*(Mélange pré PCR sous hotte et séparation physique du reste des manipulations)*

- 7.2µL d'eau stérile ADN-free
- 10µL de solution MasterMix issus du kit de PCR,
- 0.4µL d'amorces forward (10µmol/L),
- 0.4µL d'amorces reverse (10µmol/L),
- 2µL d'ADN extrait.

**Paramètres de la PCR :**

	PCR temps réel (chimie SYBRgreen®)
Dénaturation (1 cycle)	95°C, 1 cycle de 5min
Amplification (40 cycles)	95°C, 10s
	50°C, 15s
	72°C, 15s
Fusion (1 cycle)	95°C, 10s
	65°C, 1min
	97°C, 1s
Refroidissement (1 cycle)	37°C, 30s

*Purification*  
*Electrophorèse*

**\*Faire migrer sous surveillance par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% (pour une plaque de 17 puits, 2.1g d'agarose, 7µL de SYBR green®) 80V pendant 1h30 à 2h, 20µL d'ADN amplifié et 2,5µL de bleu par puit et 4µl de ladder 100 paires de bases aux extrémités des plaque de gel d'agarose.**

**\*Découper les gels d'agarose positif sous lampe ultraviolet, séquences ciblées de 80-100 paire de bases à l'aide d'une lame de scalpel stérile de 23, utiliser une lame par échantillon afin d'éviter toute contamination d'un échantillon à un autre.**

**\*Cubes de gel d'agarose pesés à l'aide d'une balance de précision.**

**\*Purifier à l'aide du kit Qiagen® selon le protocole du fabricant. L'ensemble des étapes de centrifugation se font à une vitesse de 17.900xg (soit 13.000 rpm température 15-20°C).**

- **Ajouter 3 fois le volume (100mg équivalent environ 100µL).**
- **Préchauffer le bain marie à 50°C puis incubé pendant 10 minutes ou jusqu'à dissolution du gel et en homogénéisant à l'aide d'un vortex®.**
- **Vérifier une coloration jaune de la solution (pH <7.5)**
- **Ajouter un volume de gel d'isopropanol et homogénéiser à l'aide d'un vortex®.**
- **Placer la colonne QIAquickcolumn® du kit dans un tube collecteur de 2 L.**
- **Afin de lier le matériel génétique transférer la solution sur le filtre de la colonne de purification puis centrifuger 1 minute à 17.900xg (soit 13.000 rpm température 15-20°C). Jeter l'éluât.**
- **Ajouter 750µL de buffer PE, laisser incubé 2 à 5 minute et centrifuger 1 minute à 17.900xg (soit 13.000 rpm température 15-20°C). Jeter l'éluât puis centrifuger à nouveau à vitesse identique et laisser le filtre s'aérer afin d'éliminer les molécules d'éthanol résiduelles.**
- **Placer la colonne dans un tube Ependorf® de 1.5 mL identifié.**
- **Ajouter 50µL de buffer EB (10mmol Tris-Cl, pH 8.5) ou de l'eau stérile au centre de la membrane de filtration. Incuber 4 minutes puis centrifuger 1 minute.**

*Séquençage*

**\*Envoi à un organisme privé (Eurofins genomics®) des échantillons d'ADN purifiés pour séquençage de l'ADN obtenu par méthode Sanger ou Illumina (séquençage haut débit). Préparation des échantillons selon le protocole de l'organisme prestataire.**

**Deux tubes Ependorf® de 1.5mL sont préparés l'un contenant 5µL d'ADN purifiée et 5µL d'amorce forward (5pmol/µL) l'autre contenant 5µL d'ADN purifiée et 5µL d'amorce reverse (5pmol/µL). Les tubes sont identifiés à l'aide d'étiquette à code-barre fournis par l'organisme.**

#### **Annexe 4:Fiche de synthèse du protocole proposé pour une application sur le terrain**

# Glossaire

---

**Amplicon** : Morceau d'ADN ou d'ARN étant le produit d'une réplication. Terme souvent employé pour désigner le produit d'une amplification par PCR.

**Barcode** : Marqueur génétique représenté par une séquence courte du génome d'un organisme permettant l'identification spécifique d'une espèce ou d'un taxon.

**Biodiversité** : Variabilité parmi les organismes vivants de tout environnement (terrestre, marin et autre écosystème aquatique) et les complexes écologiques formés.

**Bio-informatique** : Le développement et l'usage de logiciel dans l'étude de données génétique et des séquences protéiques.

**Chimères** : Artefact d'une amplification par PCR. Apparaît lors d'une erreur d'extension d'amplicon, le morceau d'amplicon fonctionne comme une amorce dans le cycle suivant. L'amplicon s'attache au mauvais endroit de la séquence et conduit à la production d'un amplicon non désiré.

**Clade** : Groupe d'organismes suspecté d'avoir évolué et de s'être séparés depuis un ancêtre commun.

**ADNe (ADNe)** : Matériel génétique extrait de matière issue d'un échantillonnage environnemental comme de l'eau, de la boue, de l'air, un biofilm, ou encore des sédiments, puis analysés afin de tenter d'identifier les organismes présents.

**Extraction** : Processus de purification d'ADN ou d'ARN depuis n'importe quel échantillon réalisé chimiquement et mécaniquement.

**Gène** : Une unité d'information correspondant en un fragment d'ADN codant pour une séquence d'ARN ou pour une séquence d'acide aminé d'une protéine.

**Enrichissement ADN** : Toute technique moléculaire permettant d'augmenter la concentration en ADN cible dans une solution.

**Génome** : La totalité de l'ADN d'un organisme.

**In silico** : Conduit ou produit par modélisation ou simulation informatique.

**In situ** : Sur place.

**In vitro** : Mise en place dans un tube à essai, boîte de pétri ou n'importe où à l'extérieur de l'organisme vivant et de son environnement d'origine, dans des conditions artificielles.

**In vivo** : au sein d'un organisme vivant ou de son environnement.

**Lader** : Solution contenant des séquences d'acide nucléique de poids moléculaires connues utilisées lors d'une électrophorèse afin d'estimer la taille des amplicons produit lors d'une PCR.

**Locus (pl. loci)** : Localisation physique sur un chromosome (d'un gène ou d'un marqueur génétique).

**Marqueur** : séquence d'ADN suffisamment conservé et muté pour être utilisé dans l'identification d'un individu ou une espèce.

**Metabarcoding** : Méthode rapide d'estimation de la biodiversité combinant un séquençage haut débit de toutes les séquences ADN ciblés dans un échantillon donné et basé sur des séquences variables et conservé entre les espèces.

**Métagénomique** : Etude des génomes communs à tous les micro-organismes d'un échantillon pour fournir des informations sur la diversité microbienne et l'écologie d'un environnement spécifique.

**ADN mitochondrial** : molécule circulaire d'ADN issu des mitochondries de cellules eucaryotes. Cet ADN est en nombre plus important que le génome nucléaire, bien conservé au sein des espèces et entre les espèces, il est ainsi propice aux études sur ADNe.

**Next-generation-sequencing (NGS)** : Aussi connu sous le terme de séquençage haut débit, il s'agit du terme consacré utilisé pour décrire un certain nombre de technologie de séquençage (comme l'Illumina) autre que le séquençage Sanger. Des millions voir des milliards de brins d'ADN peuvent être séquencés en parallèle, les séquences étant plus courtes (300 pb) que par la méthode de Sanger (plus de 700pb)

**Polymerase chain reaction (PCR)** : Méthode permettant de produire des millions de copies de fragments d'ADN.

**Pairs d'amorces** : Courtes séquences d'ADN fabriquées pour s'hybrider spécifiquement à une séquence d'ADN et permettre le déclenchement d'une PCR.

**PCR quantitative (RT-PCR ou QPCR)** : Permet la quantification et le suivi en temps réel de l'amplification d'un fragment d'ADN.

**Séquençage Sanger** : Méthode de séquençage basé sur l'incorporation aléatoire de didesoxyribonuclotides par une polymérase dénuée d'activité exonucléase durant une réplication in vitro conduisant à l'arrêt immédiat de la réplication. On obtient alors plusieurs tailles de fragments d'ADN mesurés par électrophorèse permettant de définir la localisation exacte des différents acides nucléiques et le séquençage du fragment.

**ADN environnemental (ADNe)** : ADN issu d'un échantillon environnemental sans préjuger des espèces contenues dans l'échantillon. L'ADN peut provenir de fèces, de mucus, d'ADN extracellulaire, d'épidermes, de gamètes et la matrice peut être du sol, de l'eau ou de l'air d'âge variable.

**Barcoding** : Première définition par Hebert et al. (2003),

**SYBR green** : Technique utilisée associée au kit PCR LC 480 SYBR Green I Master (réf. 04 707 516 001 laboratoire Roche), utilisée dans l'étude. Les molécules de SYBR Green I se lient au petit sillon ADN double brin néoformé, une fluorescence est alors émise (entre 465 et 510nm). Cette fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié et à l'origine des courbes obtenues en qPCR. Un pic de fusion est modélisé, il s'agit d'une courbe d'évolution de la fluorescence en fonction de la température au cours d'un cycle, on peut, par cette méthode, distinguer des produits non spécifiques (dimères d'amorces) se dénaturant à des températures plus faibles et ayant des pics plus larges et aplatis.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Guillaume LE LOC'H, Enseignant-chercheur, de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **AUBIN François** intitulée « **Mise en place d'une méthode de détection et d'identification moléculaire de l'avifaune à partir de prélèvements environnementaux** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 19/11/2020  
Enseignant-chercheur de l'École Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Guillaume LE LOC'H



Vu :  
Le Président du jury  
Professeur Christophe PASQUIER



Vu :  
Le Directeur de l'École Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
M. Pierre SANS


Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université Paul Sabatier  
M. Jean-Marc BROTO


M. AUBIN François  
a été admis(e) sur concours en : 2015  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 09/07/2019  
a validé son année d'approfondissement le : 15/10/2020  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider



Université  
de Toulouse

## **MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DETECTION ET D'IDENTIFICATION MOLECULAIRE DE L'AVIFAUNE A PARTIR DE PRELEVEMENTS ENVIRONNEMENTAUX**

Le barcoding est un outil récent développé à des fins d'identification d'organismes à partir de séquences d'ADN courtes situées sur des gènes communs à un groupe d'organismes et dont les fines différences permettent de distinguer les espèces. Cet outil a peu été utilisé dans le cadre d'études d'interfaces entre faune domestique et faune sauvage. Pourtant il est indispensable d'identifier les espèces en jeu au niveau de ces interfaces afin de mieux comprendre les contacts possibles. Ainsi, dans cette thèse nous proposons d'utiliser cette technique et mettant en place un protocole adapté de techniques déjà décrites. Une étude préliminaire est donc menée afin de faire le point sur les connaissances en forte évolution et d'adapter l'outil à l'étude et à ses spécificités. La mise à l'épreuve de différents kits d'extraction, de méthodes de traitement de l'échantillon de départ, et de différentes paires d'amorces ont pu permettre d'optimiser les méthodes en usant du matériel et des technologies disponibles. Nous avons pu mettre en place une méthode systématisée basée sur une concentration de l'ADN par filtration puis une extraction par un kit d'extraction commercial générique suivi d'une amplification par PCR quantitative à l'aide d'amorces spécifiques (Aves 02) et finalement d'un séquençage par méthode Sanger. Les séquences obtenues, confrontées à la base de données Genbank®, conduisent à l'identification des espèces présentes dans l'échantillon. Ce protocole de metabarcoding vise à terme la détection et la caractérisation d'espèces d'oiseaux sauvages évoluant en contact direct d'élevages avicoles par l'exploitation de prélèvements environnementaux.

### **BARCODING – ADNe – AVIFAUNE – INTERFACE**

## **SETTING UP OF A MOLECULAR DETECTION AND IDENTIFICATION METHOD OF WILD BIRDS FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES**

*Barcoding is a recent tool implemented to identify organisms using short DNA sequences belonging to shared genes by a group of organisms and which present tiny differences allowing to discriminate species. The tool has little been used in the study of the interfaces between wild avifauna and domestic animals. Therefore, it is important to identify the species at stake to understand the possible interactions between them. In this thesis, we propose to use barcoding by implementing a protocol, inspired by these already described in the literature. A preliminary study is conducted to take stock on the knowledge of an evolving discipline and adapt the tool to the study with its specificities. The test of various extraction kits, processing methods of initial samples, and several primers allowed to optimize the protocol using technologies and equipment available. We implemented a method based on DNA concentration, filtration and extraction by a generic extraction kit followed by a quantitative PCR using specific primers (Aves 02) and a final sequencing by Sanger method. The sequences compared with Genbank® data base led to the identification of the species present in the samples. This protocol aims to detect and characterize wild birds species evolving at direct contact of poultry farming by the use of environmental samples.*

### **BARCODING – ADNe – AVIFAUNA – INTERFACE**