

Utilisation de l'ADN ancien pour la rétro-observation des espèces et la compréhension des processus évolutifs et écologiques dans les lacs d'altitude



©D.Galop, via photothèque OHM

AMBiPyr : Ancient Molecular Biodiversity in high mountain lakes in Pyrenees

GIBERT M. (1), BLANCHET S. (2), ORLANDO L. (1), GALOP D. (2)

1. AMIS – UMR 5288
2. SETE – UMR5321
3. GEODE – UMR 5602



Contexte 2018

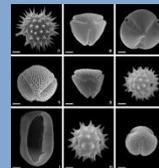
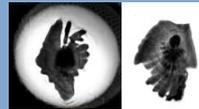
FISH-2 (D. Galop)

Reconstituer par une approche en écologie globale l'histoire et l'impact de l'introduction de salmonidés dans les lacs d'altitude. Ce processus d'anthropisation et d'artificialisation des écosystèmes aquatiques, dont les premières manifestations attestées remontent à la fin du Moyen-Age, s'est accéléré durant le XX^e siècle entraînant un impact important sur la biodiversité et le fonctionnement des lacs.



©D.Galop, via photothèque OHM

Proxies



Historique



Paléolimnologique



Quels Lacs ou Etangs ?

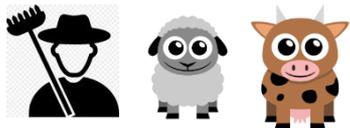
Echantillons

VICDESSOS

Haute Vallée des Gaves

Port-Biehl

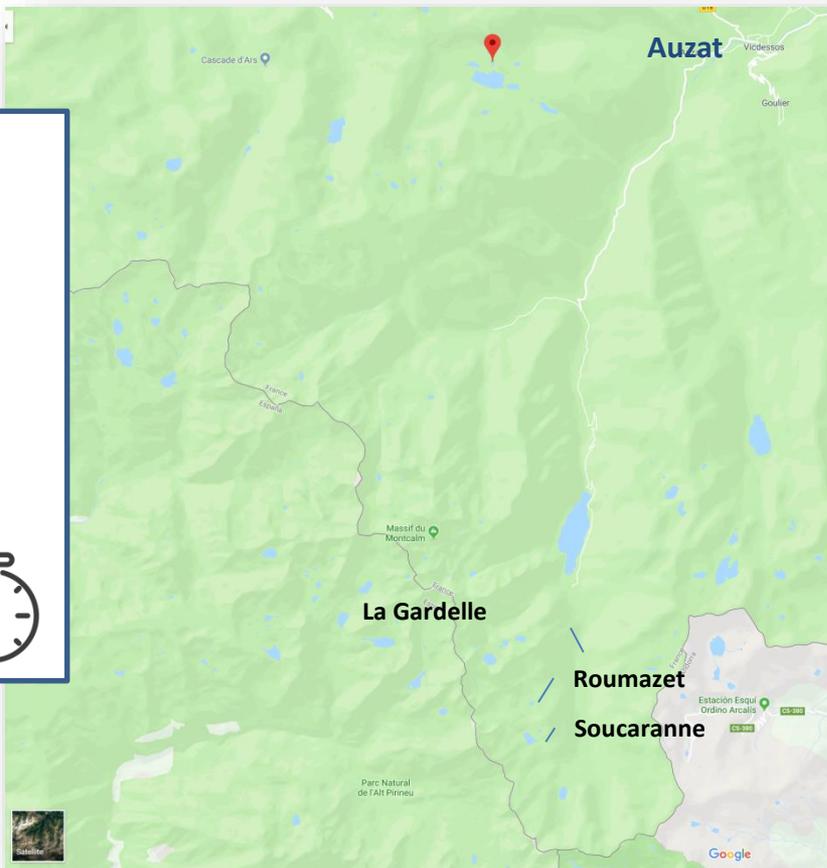
Forte pression pastorale



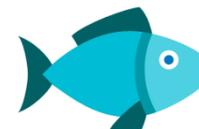
5000 ans (BP)



Etang Mort

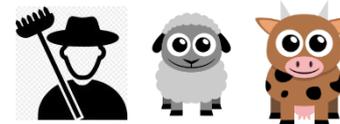


Vallée de Bassies



? <<1950
(Fin MA?)

Forte pression pastorale



?

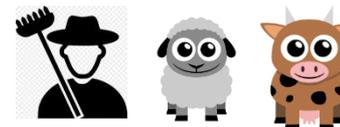


Vallée de Soulcem



>1950

Forte pression pastorale



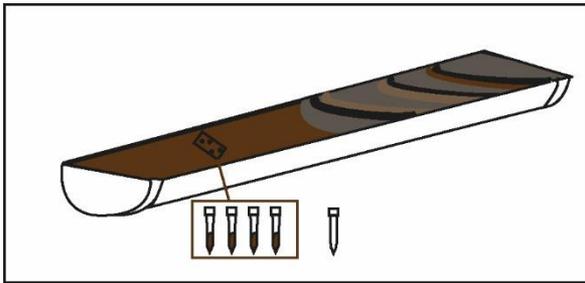
5000 ans (BP)



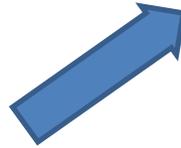
Procédure



Carottage en lac avec contamination par plasmide



Prélèvement sur $\frac{1}{2}$ carotte
plusieurs répliques/tranche,
suppression du sédiment de surface
Outils de prélèvements et tubes stériles



Protection et conditions d'extraction de l'ADN
Contrôlées : salles blanches



séquençage



metabarcoding



Capture par hybridation

Approche de la biodiversité aquatique (lacs)

Projet focus :

- Introduction des **salmonidés** et **cyprinidés** dans les lacs d'altitude pyrénéens
- Impact sur la Faune (flore), en particulier endogène
- Possibilité d'élargir à **d'autres espèces**

Techniques :

- Espèces cibles (référencées et/ou tissus frais) : **Vairon** et **euprocte** → « Capture »
- **Approche globale** (espèces genotypées, barcodes) : végétaux, vertébrés, **teleostomiens**, batraciens → *metabarcoding*

teleo-F1 **ATCGATTACACCGCCCGTCACTCT** (Forward)
teleo-R1 **ATCGATTCTCCGGTACACTTACCATG** (Reverse)



batra-F1 **ATCGATTACACCGCCCGTCAACCCT**
batra-R1 **ATCGATTGTAYACTTACCATGTTACGACTT**
(12s rDNA)



Valentini et al, 2015. Mol Ecol

Teleostomiens et Batraciens

Base de données Valentini et al. 2016

53 amphibiens

Table S1 Amphibian tissue samples used for the reference database construction. Samples with code BEV are from the collection hosted at CEFE UMR 5175, Biogeography and Vertebrate Ecology team, in Montpellier (France). Samples with code SPY are from the collection hosted at SPYGEN, Le Bourget du Lac (France).

Species	Code	Sampling date (year)	Origin (country)	Sequence
6 <i>Bufo viridis</i>	BEV.10931	2010	France	CTTCAAAGCATAAAACAAGTTTCTAACAAAGTTTGAGCATTACAGAAAGGCC
	BEV.8749	2001	Cyprus	CTTCAAAGCATAAAACAAGTTTCTAACAAAGTTTGAGCATAACAGAAAGGCC
	BEV.688	1996	Hungary	CTTCAAAGCATAAGCAAGCTTTAACAAAGCTTGAGCATAACAGAAAGGCC
	SPY_AM30338_G	2011	France	CTTCAAAGCATAAAACAAGTTTCTAACAAAGTTTGAGCATAACAGAAAGGCC
7 <i>Calotriton asper</i>	SPY_AM30374_C	2011	France	CTTCAAGTACTATTTAACAAATAAATAAAAAAGACAAAAAGAAAGAGGCC
	BEV.T6611	2011	France	CTTCAAGTACTATTTAACAAATAAATAAAAAAGACAAAAAGAAAGAGGCC
	BEV.T6612	2011	France	CTTCAAGTACTATTTAACAAATAAATAAAAAAGACAAAAAGAAAGAGGCC
	BEV.T6613	2011	France	CTTCAAGTACTATTTAACAAATAAATAAAAAAGACAAAAAGAAAGAGGCC
8 <i>Chioglossa lusitanica</i>	BEV.L777	2001	Spain	CTTCAAGTACTATTTAACAAATAAATAAAAAAGACAAAAAGAAAGAGGCC
	BEV.L778	2001	Spain	CTTCAAGTACTATTTAACAAATAAATAAAAAAGACAAAAAGAAAGAGGCC

→ *Calotriton asper*

86 espèces poissons d'eau douce

Table S2 Fish tissue samples used for the reference database construction. Samples with code MNHN are from the collection hosted at the National Museum of Natural History in Paris (France), samples from Denmark are part of the fish collections at the Natural History Museum in Copenhagen (Denmark) and samples with code SPY are from the collection hosted at SPYGEN, Le Bourget du Lac (France).

→ **Cyprinidés : vairon...**
Salmonidés : truite fario
saumon de fontaine

Species	Code	Sampling date (year)	Origin (country)	Sequence
61 <i>Phoxinus phoxinus</i>	SPY_P58324_B	2011	France	CTCCTGTGGAATGCAATGAAATACCTAATACTAAAGCGCTGACAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	MNHN (4401)	2011	France	CTCCTGTGGAATGCAATGAAATACCTAATACTAAAGCGCTGACAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P58324_D	2014	France	CTCCTGTGGAATGCAATGAAATACCTAATACTAAAGCGCTGACAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P58324_E	2014	France	CTCCTGTGGAATGCAATGAAATACCTAATACTAAAGCGCTGACAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P58327_B	2011	Netherlands	CCCCGTGCAAAATGCAATCAATACGTAATTCACAGCACTGACAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
71 <i>Salmo trutta</i>	SPY_P8032_A	2011	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_B	2011	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_C	2012	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_D	2012	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_E	2010	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_F	2010	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_G	2008	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_H	2008	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_I	2008	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_J	2008	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_K	2008	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_L	2008	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_M	2010	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8032_N	2010	France	ECCCAGTTCAATTAACTCTTCTAACTAAGAAGTTAGCCGAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	72 <i>Salvelinus alpinus</i>	SPY_P8036_A	2011	France
SPY_P8036_B		2014	France	CCCCAAGTTAAATTTATCTCTTAACTAAGAAGTTAACCAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
SPY_P8036_C		2014	France	CCCCAAGTTAAATTTATCTCTTAACTAAGAAGTTAACCAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
73 <i>Salvelinus fontinalis</i>	SPY_P8038_B	2012	Netherlands	CCCCAAGTTAAATTTATCTCTTAACTAAGAAGTTAACCAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
	SPY_P8038_C	2012	Netherlands	CCCCAAGTTAAATTTATCTCTTAACTAAGAAGTTAACCAACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA

Genbank *Oncorhynchus mykiss*

CCCCAAGTTCAACCTGTCTTCTAACTAAGAAGTTAACCGAACAAAGGGGAGGCAAGTCGTAAACATGGTAAGTGTACCGGAAGGTGCGCTTGGGAATACCCAGAGTGCTAA

Design des *metabarcodes*: proxy *sedaDNA*

teleo-F1 **ATCGATTACACCGCCCGTCACTCT** (Forward)
teleo-R1 **ATCGATTCTCCGGTACACTTACCATG** (Reverse)

batra-F1 **ATCGATTACACCGCCCGTCACCCT**
Batra-R1 **ATCGATTGTAYACTTACCATGTTACGACTT**
(12s rDNA)

Valentini et al, 2015. Mol Ecol



12SV5-F1 **ATCGATTAGGGATAACAGCGCAATC**
12SV5-R1 **ATCGATTTCGTTGAACAAACGAACC**
Riaz et al., 2011. NAR



trnL-F1 **ATCGATTGGCAATCCTGAGCCAAAT** riaz
trnL-R1 **ATCGATTGAGTCTCTGCACCTATC**
Riaz et al., 2011. NAR



Réduction du coût de séquençage (metabarcoding) par multiplexage

Primer PCR marqués (tailed PCR-primers)

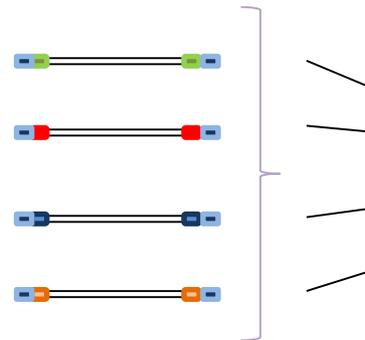
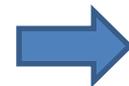
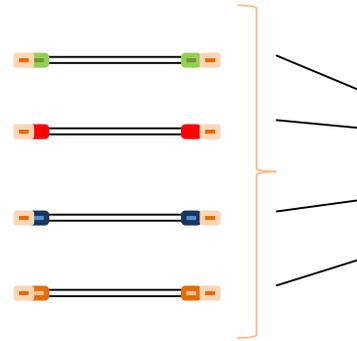
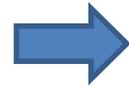
Amplicons PCR

Ligation avec adaptateurs indexés

Echantillon 1

trnL-F1
trnL-R1
12SV5-F1
12SV5-R1
teleo-F1
teleo-R1
batra-F1
batra-R1

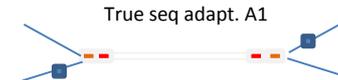
ATCGATTGCAATCCTGAGCCAAAT
ATCGATTCTCCGGTACACTTACCATG
ATCGATTGGGATAACAGCGCAATC
ATCGATTGTTGAACAAACGAACC
ATCGATTACACCGCCCCTCACTCT
ATCGATTCTCCGGTACACTTACCATG
ATCGATTACACCGCCCCTCACCCCT
ATCGATTCTAYACTTACCATGTTACGACTT



Echantillon 2

tRNL-F2
tRNL-R2
12SV5-F2
12SV5-R2
teleo-F2
teleo-R2
batra-F2
batra-R2

CAGTCAAAGCAATCCTGAGCCAAAT
CAGTCAATGAGTCTCTGCACCTATC
CAGTCAAAGGGATAACAGCGCAATC
CAGTCAATGTTGAACAAACGAACC
CAGTCAAACACCGCCCCTCACTCT
CAGTCAATCTCCGGTACACTTACCATG
CAGTCAAACACCGCCCCTCACCCCT
CAGTCAATCTAYACTTACCATGTTACGACTT

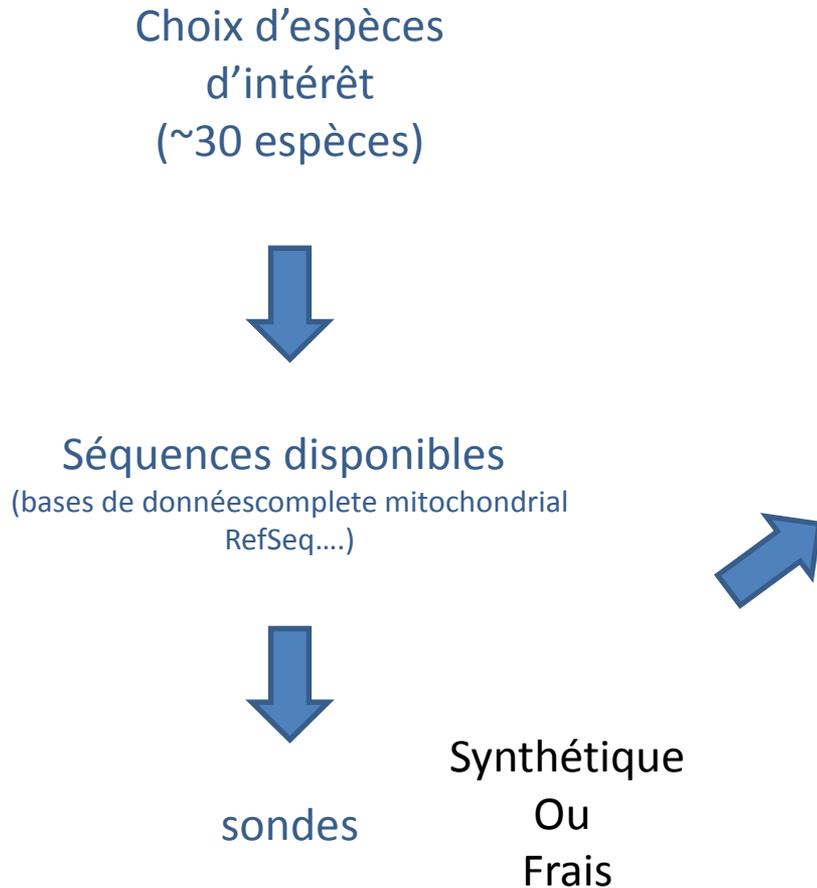


Amplicons poolés
Pour séquençage

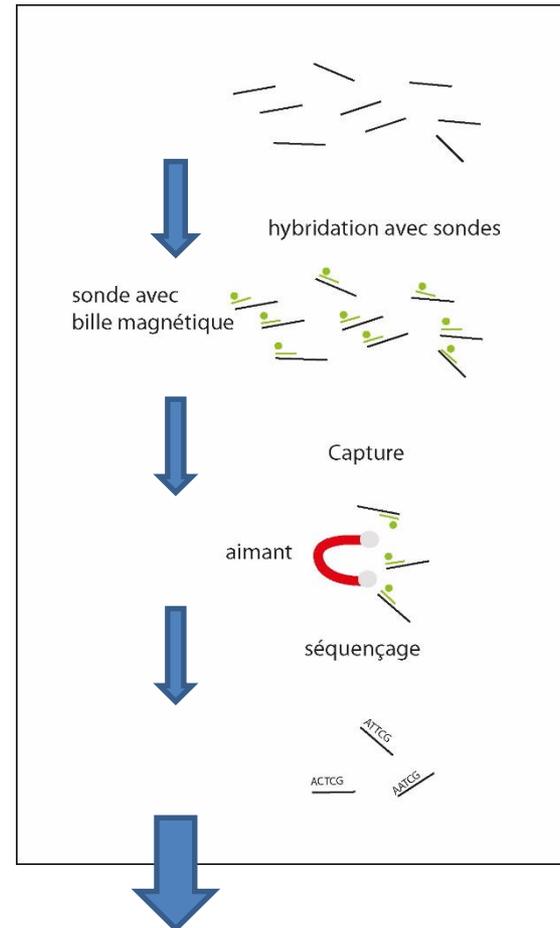


Préparation de bibliothèques d'amplicons pour metabarcoding, adaptée de Leray et al. 2016,

Analyse spécifique (espèces) par capture hybridation



Principe de la capture



Séquençage : Protocole adapté de Maricic et al, 2010

Remerciements

Didier Galop
Simon Blanchet
Ludovic Orlando

C. Theves
TEAM AGES – Labo AMIS

