

➤ **BEEDET**

➤ **IDENTIFICATION DES ABEILLES
SAUVAGES ET DOMESTIQUES PAR DES
METHODES MOLECULAIRES NON
DESTRUCTIVES**

Métaprogramme BIOSEFAIR

Bilan de projet : 2021 - 2024

Juillet 2024

Le déclin des insectes pollinisateurs est aujourd’hui un fait avéré rapporté dans de nombreux médias, journaux scientifiques (Dicks et al, 2021). Pour mettre fin à cette disparition rapide et massive des insectes pollinisateurs diverses actions ont été engagées en France telles que le plan pollinisateurs (2021-2026) et en Europe avec la rédaction de l’article 8 de la Commission Européenne (Juin 2022) qui prévoit ‘ l’obligation d’inverser le déclin des pollinisateurs et de parvenir à une évolution à la hausse des populations de pollinisateurs jusqu’à atteindre des niveaux satisfaisants. Cette obligation s’appuiera sur la mise en place d’une méthode de surveillance des pollinisateurs’. Cependant à l’heure actuelle les inventaires et les suivis d’insectes pollinisateurs se heurtent à d’importants verrous méthodologiques liés à un manque d’entomologistes et de méthodes fiables, standardisées permettant les identifications jusqu’ à l’espèce. A côté des verrous méthodologiques, il existe également une forte attente sociétale et institutionnelle pour suivre les populations de pollinisateurs dans des différents contextes environnementaux avec des méthodes qui préservent les spécimens vivants. Dans ce contexte nous avons proposé de mettre au point un protocole non léthal, facilement remobilisable par des instituts ou des associations pour identifier les abeilles sauvages à partir des traces qu’elles peuvent laisser sur les fleurs en butinant tels que des soies, des fèces ou encore de la salive.

Pour mettre au point ce protocole nous avons mis en œuvre un dispositif expérimental en conditions contrôlées. Quatre plants de fraisiers, couramment utilisés comme pollinomètres, ont été placés dans des enceintes ‘insects proof’ ou exposés à l’air libre pendant 3 jours. Dans la condition A les plants de fraisiers ont été mis en contact avec 4 abeilles appartenant à 3 espèces piégées au filet et photographiées pour identification (*Anthophora plumipes*, *Andrena* sp. et *Lasioglossum* sp). Dans la condition B les plants ont été exposés à l’air libre avant la collecte des fleurs. Dans la condition C les plants de fraisiers n’ont pas été en contact avec des insectes pollinisateurs. Après 3 jours les fleurs sont récoltées individuellement puis congelées et stockées à – 20°C avant l’extraction des ADNs provenant des traces.

Figure 1 : Dispositif expérimental



Le séquençage de minibarcodes 16S d’insectes de 250 bps (Clarke et al., 2014) a été sélectionné pour développer ce protocole. Ces minibarcodes sont classiquement utilisés pour identifier de l’ADN partiellement dégradé, provenant d’échantillons environnementaux (ADNe). En préalable aux travaux de metabarcoding ADNe nous avons construit une base de barcodes de référence pour les abeilles sauvages de la région d’Occitanie (Marquisseau et al., en préparation 2024).

Principaux résultats :

- Mise en place d’un protocole utilisable en routine avec optimisation des différentes étapes :

Extraction de l'ADN à partir de traces de passage d'insectes.
Conditions d'amplification du minibarcode 16S adaptées à plusieurs genres.
Conditions de séquençage MiSeq (profondeur de lecture, prix).
Traitement bioinformatique des données.

- « Proof of concept » : en conditions contrôlées, l'analyse préliminaire des résultats a permis de mettre en évidence que l'on peut détecter le passage d'insectes à partir de fleurs butinées.

Résultats détaillés

Optimisation des conditions d'extraction et d'amplification des ADNs

1/Extraction des ADNs

Deux kits d'extraction ont été testés : DNeasy Blood & Tissue (Quiagen) et Extract Me (Blirt). Seul le kit DNeasy a été retenu avec quelques modifications. Chaque fleur a été introduite dans un tube de 2 ml puis recouverte de tampon de lyse contenant de la protéinase K avant d'être incubée 3h à 56 °C. Les échantillons sont ensuite centrifugés pour éliminer les débris floraux. Le surnageant est déposé sur une colonne NucleoSpin pour la purification de l'ADN qui sera récupéré dans 120 µl de tampon puis congelé à -20°C. Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de 93 fleurs : 33 A, 29 B et 32 C.

2/Amplification du minibarcode 16S par PCR

Pour optimiser les conditions d'amplification du minibarcode 16S par PCR en partant de très faible quantité d'ADN potentiellement dégradé nous avons testé différentes Taq polymérases et différentes méthodes de dosage des ADNs (Qubit et dépôt sur gel d'agarose). Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 25µl avec 3 µl d'ADN 0, 25 µl de polymérase Taq (Eurobio), 1 µl de chaque amorces (10 µM), 5 µl de tampon contenant du MgCl₂ et 14,5µl d'eau. Les paramètres d'amplification étaient de 94°C pendant 5mn, puis 45 cycles de 94°C pendant 30s, 45 °C pendant 45s, 72 °C pendant 45s et une élongation finale de 72 °C pendant 20 mn. Après amplification un aliquote est déposé sur un gel d'agarose 2% (Figure 2). Le témoin positif (T+) correspond à de l'ADN extrait d'*Antophora plumipes*, une des espèces qui avaient été introduites dans la cage de pollinisation.

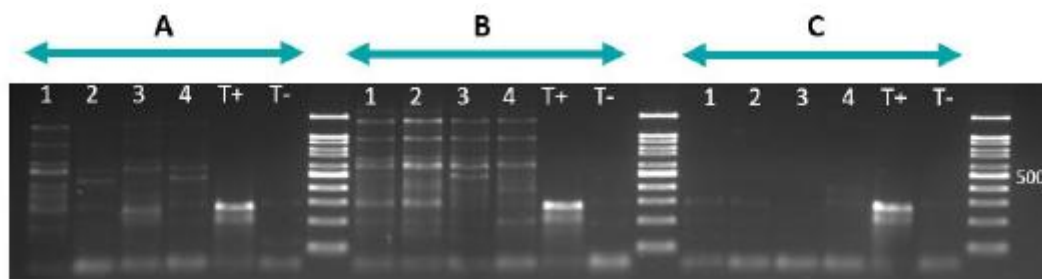


Figure 2 : Visualisation des produits d'amplification du minibarcode 16S sur gel d'agarose. A : Fleurs mises en contact avec les 3 espèces d'abeilles sauvages ; B : Fleurs exposées à l'air libre, C : Fleurs sans contact avec les insectes pollinisateurs

Les profils sont multibandes pour l'ensemble des échantillons, avec une tendance plus marquée pour les ADN provenant de fleurs mises en contact avec les abeilles (A) ou exposées à l'air libre (B). Des essais d'enrichissement en séquences cibles ont également été réalisés (résultats non présentés).

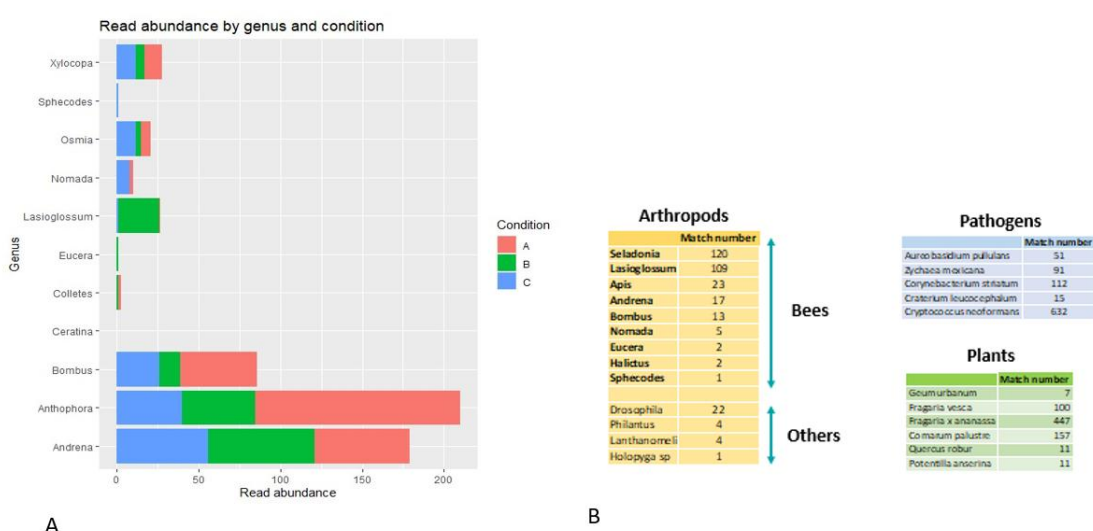
3/ Séquençage MiSeq

Un investissement de temps important a été dédié à la recherche des conditions qui permettaient d'obtenir un séquençage avec une profondeur de lecture suffisamment élevée pour détecter de faibles quantités d'ADN cibles tout en étant compatibles avec les moyens financiers alloués à cette prestation.

Traitement bioinformatique des données

L'analyse préliminaire des résultats (Figure 3) a permis de montrer qu'il était possible de détecter deux des espèces que nous avons introduites manuellement : *Anthophora* et *Andrena* (A). La détection de *Lasioglossum* nécessite un travail plus approfondi car nous avons mis en évidence que le mini barcode 16S est particulièrement riche en séquence répétée AT dans ce genre et nécessite l'adaptation des paramètres de blast pour la recherche dans les bases de données mondiales. La détection de séquences dans les conditions C (pas d'introduction manuelle d'abeilles) provient du fait que les fraisiers utilisés dans cette expérience provenaient de pépinières extérieures. L'examen plus détaillé d'un échantillon de fleur de la condition A (introduction manuelle d'abeilles) permet de voir que l'on détecte plusieurs espèces d'abeilles sauvages appartenant à différents genres mais également des séquences d'autres insectes pollinisateurs comme des syrphes (*Philantus*). En revanche, nous avons trouvé beaucoup de contaminations d'homo sapiens (résultats non présentés) et de séquences correspondant à de l'ADN 16S de fraisiers.

Figure 3 : A : Liste des abeilles sauvages classées par genre trouvées avec du metabarcoding ADN sur les 93 fleurs de l'étude. B : Liste des arthropodes, agents pathogènes et ADN de plantes identifiés sur une fleur de la condition A (mise en contact avec les 3 espèces d'abeilles sauvages).



Retour d'expérience

Il apparait nécessaire de limiter les contaminations 'homo sapiens' et 'fraisiers' dont le nombre de lectures au séquençage est très supérieur à celui des espèces d'abeilles. C'est un cas de figure qui est connu pour les échantillons d'ADNe et pour lequel il existe des solutions comme l'utilisation d'oligonucléotides de blocage qui vise à réduire l'amplification de ces contaminations.

Valorisation

Présentation du projet et des résultats préliminaires :

- Congrès : EurBee 9 Belgrade, Serbia, 20-22 Septembre 2022.
- Atelier méthodes automatisées d'inventaire de la biodiversité du Métaprogramme Biosefair Lyon 7 et 8 Septembre 2022.
- Journée scientifique ADN environnemental de la ZA PYGAR le 8 Novembre 2022,

- Groupe de Travail barcoding/metabarcoding du GDR Pollineco 5-7 Octobre 2022.
- Congrès : Apimondia Santiago, Chili, 4-8 Septembre 2023
- International Environmental and Agronomical Genomics symposium (Toulouse 2024)