



# Distribution des Odonates boréo-alpins en Haute-Savoie et prédiction des futurs changements liés au réchauffement climatique.

h e p i a

institut de recherche i n T N E  
terre nature environnement

swissuniversities

Hes·SO

Haute Ecole Spécialisée  
de Suisse occidentale

Fachhochschule Westschweiz

University of Applied Sciences and Arts  
Western Switzerland



École Pratique  
des Hautes Études



CENTRE D'ÉCOLOGIE  
FONCTIONNELLE  
& ÉVOLUTIVE



Réserves Naturelles  
DE HAUTE-SAVOIE



Marie Lamouille-Hébert, Julien Crovadore, Aurélien Besnard, François Lefort, Beat Oertli.



## Objectif :

- (i) étudier la distribution actuelle des espèces spécialisées d'altitude dans les Alpes haut-savoyardes, et
- (ii) modéliser leur distribution future et celle de leurs habitats au vu des impacts potentiels dus au changement climatique.

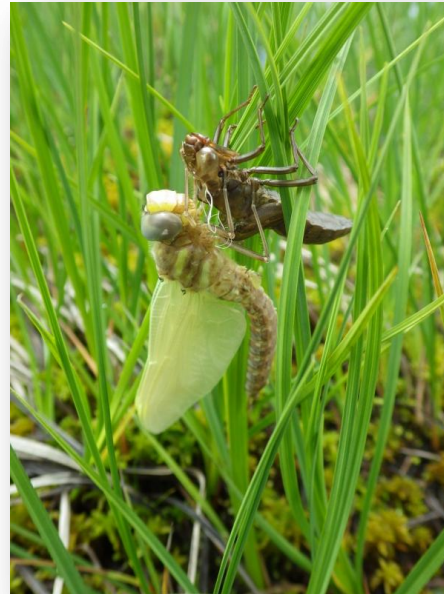
## Hypothèses :

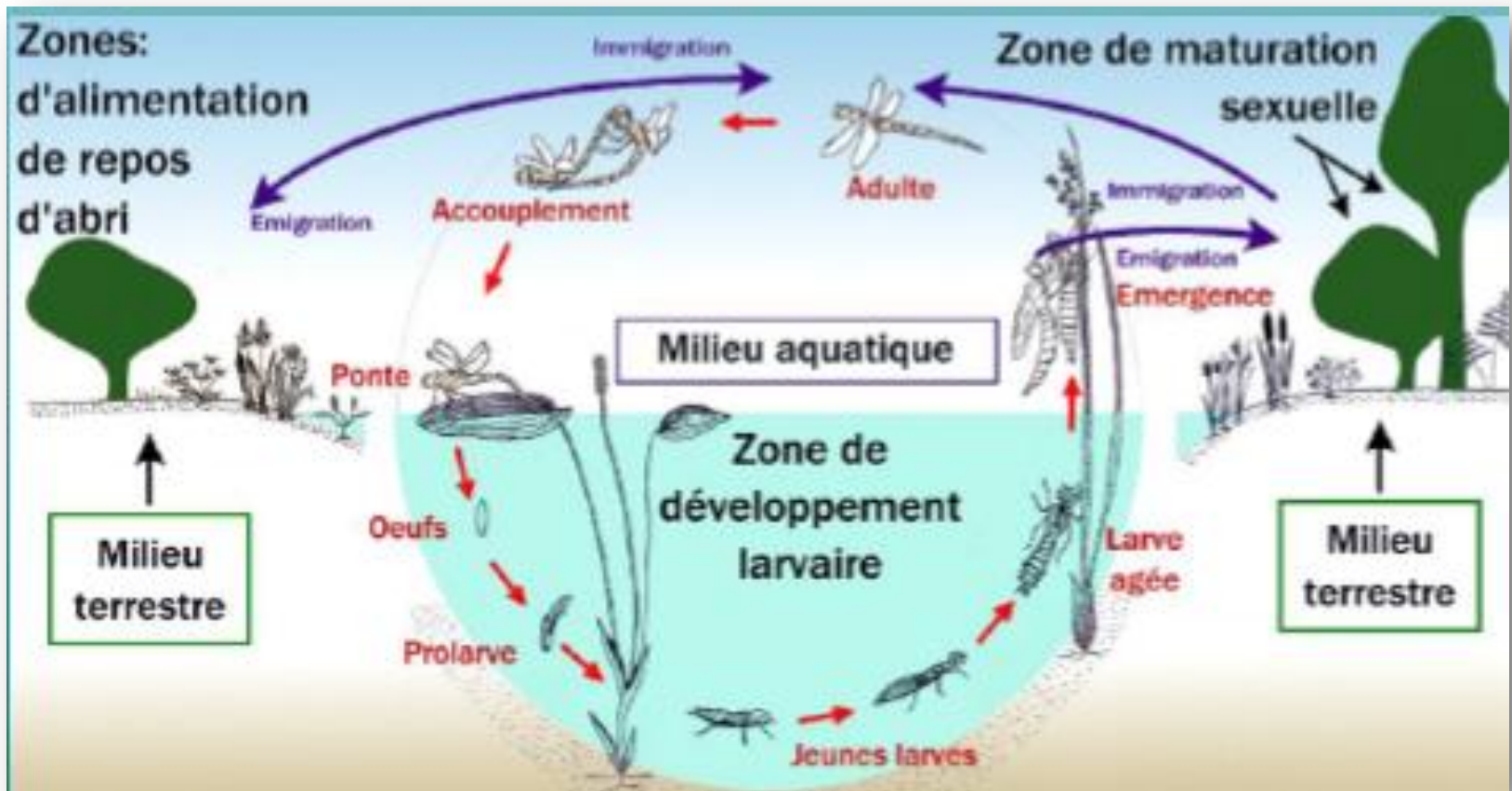
- Les espèces d'altitudes ont leur aire de distribution qui se déplace en altitude,
- La potentialité à les accueillir est limitée sur les sites existants
- L'aire de distribution des espèces s'amenuise.



Les **espèces d'altitude** (boréo-alpines) ont été identifiées par Oertli (2010), il s'agit de *Aeshna caerulea*, *Aeshna juncea*, *Aeshna subarctica*, *Coenagrion hastulatum*, *Leucorrhinia dubia*, *Somatochlora alpestris* et *Somatochlora arctica*.

Elles sont **toutes menacées** (vulnérables ou quasi-menacées) en France (UICN France, MNHN, OPIE & SFO, 2016).





© J.-L. Dommanget/Société française d'Odonatologie (Sfo) –juin 2013/OPIE

Stade larvaire : 2 à 4 années – 10 à 17 stades

Stade adulte : quelques mois



Hétérogénéité spatiale : un seul passage sur les sites pour une meilleure couverture des gradients existants.

La probabilité de noter une espèce absente alors qu'elle est présente est augmentée.

Il est donc nécessaire de combiner différentes méthodes pour augmenter la probabilité de détection :

- Recherche des adultes
- Recherche des exuvies
- Recherche des larves
- ... et travail sur l'ADN environnemental.



## ➤ Echantillonnage sur le terrain – Données génétiques

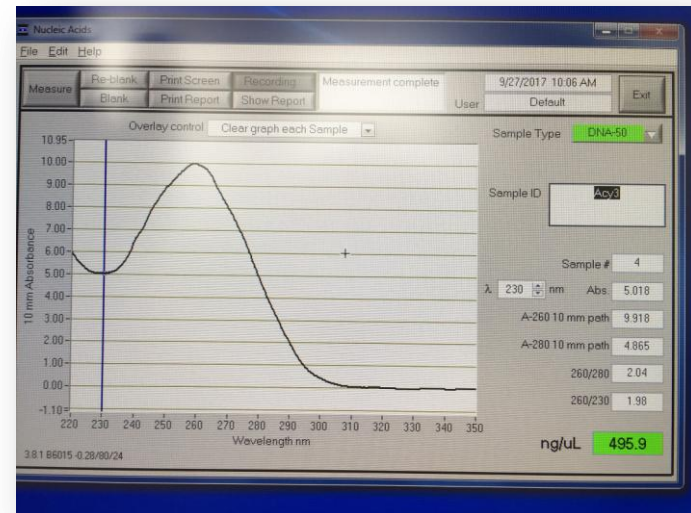
- Prélèvements d'eau sur 12 sites par an pendant 3 années (36 sites échantillonnés) : 2 x 1L par site (2 répliques).
- Collecte d'un individu par espèce cible (hors réserves)
  - ✓ Pour identification génétique,
  - ✓ Pour enregistrement des séquences ADN sur Genbank (NCBI - National Center for Biotechnology Information),
  - ✓ Pour la création de sondes spécifiques aux espèces recherchées.



## ➤ Identification génétique des espèces prélevées

### ▪ Extraction d'ADN des libellules ciblées

Espèces à rechercher	Ordre	Sous-Ordre	A collecter	Collectées 2017	A collecter en 2018	Codes
<i>Aeshna subarctica</i>	Odonata	Anisoptera				
<i>Aeshna caerulea</i>	Odonata	Anisoptera	X	X		<b>Aca1</b>
<i>Aeshna juncea</i>	Odonata	Anisoptera	X	X		<b>Aju2</b>
<i>Aeshna cyanea</i>	Odonata	Anisoptera	X	X		<b>Acy3</b>
<i>Leucorrhinia dubia</i>	Odonata	Anisoptera	X	X		<b>Ldu4</b>
<i>Somatochlora alpestris</i>	Odonata	Anisoptera	X	X		<b>Sal5</b>
<i>Somatochlora arctica</i>	Odonata	Anisoptera	X			
<i>Coenagrion hastulatum</i>	Odonata	Zygoptera	X	X		<b>Cha6</b>



## ➤ Identification génétique des espèces prélevées

- Amplification de gènes cibles tels que COI (Cytochrome c oxidase subunit I) permettant la caractérisation génétique des libellules au niveau de l'espèce.
- 2 Portions du gène mitochondrial COI déjà amplifiées avec succès pour les 6 libellules échantillonnées. Exemple avec *Aeshna caerulea* :

### *Aeshna caerulea* (Aca1)

- COI Folmer region

#### Aca1 - Complete COI Folmer region (567bp)

```
ACTGCTCTAAGAGTTTAAATTGAAATTGAATTAGGACAACCAGGATCATAAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAGTTGTAACAGCACACGCCTTTGTTATAATTTCTTTA  
TAGTAATACCTATTATAAATTGGAGGATTCGGAAATTGGTTAGTACCATAAATTAGGAGCTCCTGATATGGCTTTCCACGTTTAAATAATATAAGATTTTGGTTATTACCACC  
CTCATTAACTACTATTAGCAGGAAGTATAGTTGAAAGAGGAGCTGGAACAGGTTGAAACGGTATATCCTCCATTAGCTGGTGAATTGCTCATGCAGGAGCATCAGTAGATC  
TAACTATTTTTCTTTACATTTGGCTGGAGTATCTTCAATTCTAGGAGCTATTAATTTTATCACTACAACAATTAATAAAAGTCACCAGGAATAAAGATAGACCAAATACCTTTA  
TTTGTATGAGCAGTTGTAATTACAGCTGTACTTTTATTACTTTCTTTACCAGTTCTAGCTGGTGAATTACAATGCTATTAACAGATCGAAATATTAATACATCATT
```

- COI B

#### Aca1 - Complete COI B region (541bp)

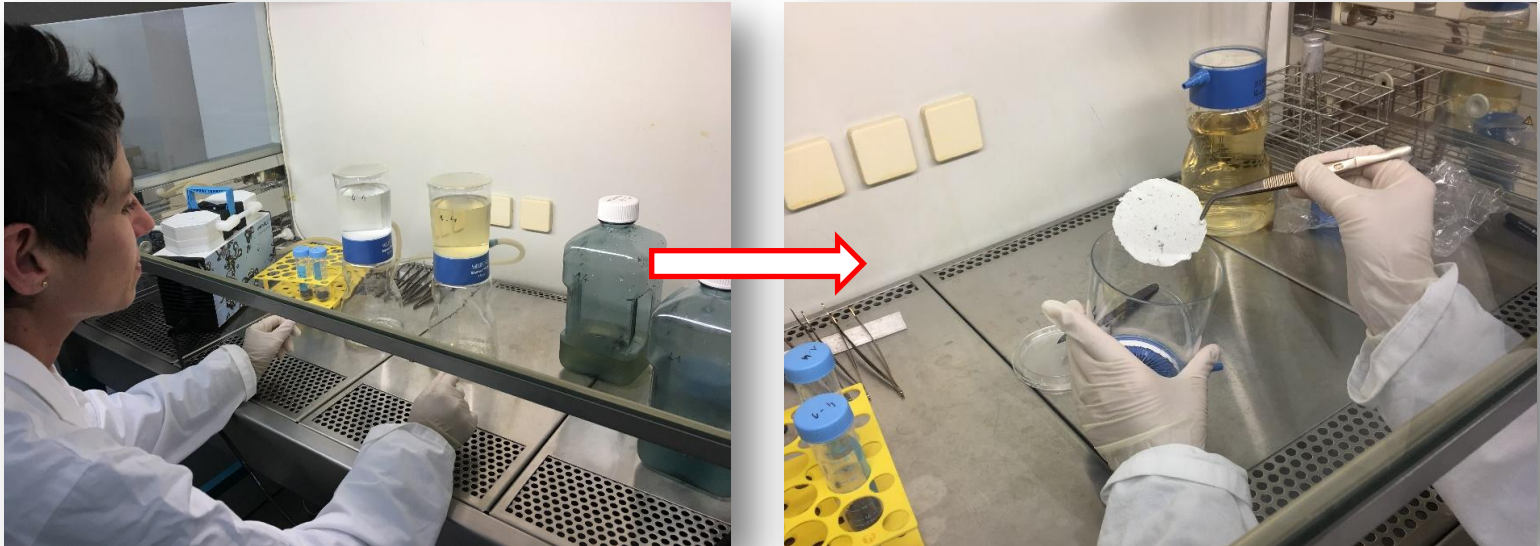
```
TTTTAGTTGATTAGCAACTCTACACGGAACTCAATTATCCTATAGTCCATCCTTATTATGAGCATTAGGATTTGTATTCTTATTCACTATTGGAGGTTAACAGGAGTAGTATTAG  
CTAATTCATCAATTGATATTGCTATACATGATACATATTATGTAGTAGCACACTTCCACTATGTTCTATCTATAGGAGCTGTATTTGCAATTATAGGAGGACTAGTACACTGATTT  
CCATTATTTAGAGGAGTAACAATAAATAATCATATACTTAAAATCCATTTTATAGTAATATTTGTTGGAGTAAATTTAACATTTTTCTCAACATTTCTAGGACTTAGTGGAAAT  
ACCTCGACGATATTAGATTATCCTGATGCATATACAGCATGAAATATTATGTCAACATTAGGAAGAACTATTTTATTGTTGGAGTAATTTTATTAATTTTTATTATTGAGTTG  
CTATAGTGTCACAACGACAAATTTATCCCCATTAATTTAAATACATCAATTGAATGATATCAAAATTACCTCCTA
```

- Amplification de l'ARN ribosomal : 18S (partial sequence) - ITS1-5.8S-ITS2 (complete sequence) - 28S (partial sequence).



## ➤ Extraction d'ADNe des plans d'eau

- Extraction d'ADNe (ADN environnemental) des échantillons d'eau : Filtration sur 0.22µm puis extraction du filtre.



- Dosage Nanodrop, QUBIT
- Concentration - Kit GenomicDNA Clean and Concentrator
- La première série de prélèvements « Année 1 » (12 plans d'eau soit 24 éch. avec les répliques) : ADNe extraits et en cours de concentration (1mL/5).

➤ Détection des libellules sur la base de l'ADNe des plans d'eau, 2 pistes envisagées :

- Détection en Realtime PCR : mise au point de sondes spécifiques (Ex. Taqman) à chaque espèce de libellule recherchée avec amplification en temps réel.



- Amplification de gènes spécifiques avec paires de primers (amorces/sondes) spécifiques des odonates sur ADNe, suivi d'un séquençage de masse (cf. photo ci-jointe Séquenceur MiniSeq Illumina) avec traitement bioinformatique par la suite pour retrouver toutes les espèces amplifiées/détectées.

➤ Premiers résultats :

- Centralisation des séquences génétiques des espèces recensées sur Genbank/NCBI : mutualisation de la connaissance du vivant par et pour la communauté scientifique.
- Jusqu'à présent, **aucune** séquence génétique d'*Aeshna caerulea* sur NCBI!!! Nous sommes les premiers à caractériser génétiquement cette espèce (COI et ARNr).
- Séquence génétique gène COI région Folmer (région du gène amplifiée par tous les scientifiques, barcode de référence chez les eucaryotes pour la détermination interspécifiques des organismes) d'*Aeshna caerulea* identique à 99% avec *Aeshna septentrionalis*...
- Aucune donnée génétique COI région Folmer sur NCBI pour *Coenagrion hastulatum* (d'autres gènes oui mais pas COI)
- Aucune données génétiques COI région B pour les 6 espèces répertoriées !!

## ➤ Prochains objectifs – Calendrier :

- Echantillonnage des espèces de libellules manquantes, extraction ADN et caractérisation génétique – cet été/automne 2018.
- Finalisation concentration de l'ADN des prélèvements « année 1 » - juin 2018.
- Enregistrement des séquences génétiques de toutes ces espèces sur NCBI/Genbank pour libre accès à la communauté scientifique et compléter la base de données – Juin 2018.
- Mise au point de la méthode de détection des libellules sur la base de leur traces d'ADNe dans les plans d'eau (sondes spécifiques en real time peut être métabarcoding) – Juin à décembre 2018.
- 24 nouveaux prélèvements à faire : juillet-août 2018 et juillet-aout 2018...à traiter et analyser : fin 2019.

## ➤ Perspectives, limites et conclusion

- Comparaison des méthodes de détection en fonction des espèces : en attente des résultats du point précédent.
- Limite de l'ADN environnemental : les sites asséchés (alors que les espèces sont présentes), les sites avec très peu d'eau (récolte et traitement de l'échantillon plus difficile), ...
- Beaucoup de travail de recherche à mettre en œuvre avant d'avoir des résultats. Un choix de l'expérimental et de la description des écueils pour apporter à la communauté scientifique.



# Merci pour votre attention !

h e p i a

institut de recherche i n T N E  
terre nature environnement

swissuniversities

Hes·SO

Haute Ecole Spécialisée  
de Suisse occidentale

Fachhochschule Westschweiz

University of Applied Sciences and Arts  
Western Switzerland



École Pratique  
des Hautes Études



CENTRE D'ÉCOLOGIE  
FONCTIONNELLE  
& ÉVOLUTIVE



Réserves Naturelles  
DE HAUTE-SAVOIE

[marie.hebert@frapna.org](mailto:marie.hebert@frapna.org)

Crédits photos et cartographie : Marie Lamouille-Hébert et Julien Crovadore - Illustrations : Marine Picard

