

# L'ADN ENVIRONNEMENTAL AU SERVICE DE LA BIODIVERSITE : EVALUATION ET CARACTERISATION

**AMRANI K.<sup>1,4</sup>, POMPANON F.<sup>2</sup>, PANSU J.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Université Grenoble Alpes, Laboratoire Pacteterritoires, France

<sup>2</sup>Université Grenoble Alpes, Laboratoire Ecologie Alpine, France

<sup>3</sup>Princeton University, Department of Ecology and Evolutionary Biology, U.S.A

<sup>4</sup>Université Kasdi Merbah Ouargla, Laboratoire Bioressources sahariennes, Algérie

[Khaled.amrani@umrpacte.fr](mailto:Khaled.amrani@umrpacte.fr)

**Résumé :** L'étude des potentialités agrobiologiques des sols sahariens revêt un intérêt capital pour la mise en valeur. Dans cette optique, la caractérisation de la biodiversité à partir d'ADN issu d'un échantillon de sol est maintenant possible grâce aux nouvelles technologies de séquençage. Elle permet d'effectuer des inventaires, de reconstituer des paléo-environnements et de caractériser des sols.

Le recours à cet outil offre de réelles possibilités d'amélioration de connaissances, comme préalable à la caractérisation de la diversité des espèces vivant au sein des écosystèmes pour en comprendre le fonctionnement. Elle devient également un enjeu sociétal puisqu'elle est nécessaire pour mettre en œuvre des programmes de conservation et de restauration des agro-écosystèmes. C'est dans ce contexte qu'une collaboration scientifique a été mise en place en 2013. Le principe de cet outil consiste à extraire l'ADN d'un échantillon environnemental (eau, sol ...), puis à amplifier par réaction de polymérisation en chaîne le fragment cible correspondant au code-barres à l'aide d'un couple d'amorces prédéfini. Ces derniers peuvent amplifier un large spectre d'espèces. On parle alors de *Metabarcoding*. La présente communication a pour objectif de présenter l'outil et sa valeur ajoutée potentielle dans les études agro-écologiques.

**Mots clés :** Fertilité des sols, Biodiversité, ADN environnemental, Sols sahariens

## الحمض النووي البيئي في خدمة التنوع البيولوجي: التقييم والخصائص

**ملخص :** تعتبر دراسة القدرة الزراعية - البيولوجية للتربة الصحراوية ذات أهمية كبرى للتنمية. وفي هذا السياق، أصبح من الممكن الآن دراسة خصائص التنوع البيولوجي عن طريق الحمض النووي لعينة من التربة بفضل تقنيات التسلسل الجديدة. حيث تسمح بالجرد وإعادة بناء البيانات الماضية وتحديد خصائص التربة. استخدام هذه الأداة يوفر فرصاً حقيقية لتحسين المعلومات حول خصائص تنوع الأصناف الحية التي تعيش في النظم الإيكولوجية من أجل فهم الوظيفة. كما أنها أصبحت قضية مجتمعية حيث أنه من الضروري تنفيذ برامج محافظة واستعادة للنظم الإيكولوجية الزراعية. وفي هذا السياق، أنشئ تعاون علمي في عام 2013. مبدأ هذه الأداة هو استخراج الحمض النووي من عينة بيئية (المياه والتربة...)، ثم التضخيم بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسلة للجزء المستهدف الموافق للرمز الشريطي باستخدام زوج محدد مسبقاً. هذا الأخير يمكنه تضخيم مجموعة واسعة من الأصناف الحية. والغرض من هذه المداخلة هو تقديم هذه الأداة قدراتها المضافة المحتملة في الدراسات الزراعية الإيكولوجية.

**كلمات دالة:** خصوبة التربة، التنوع البيولوجي، الحمض النووي البيئي، التربة الصحراوية.

## 1. INTRODUCTION

La caractérisation de la diversité des espèces est un préalable à la connaissance du fonctionnement écologique des écosystèmes terrestres, marins ou humides. Elle présente un intérêt scientifique majeur pour comprendre les interactions qui s'opèrent et qui contribuent à l'équilibre écologique. Elle devient, de ce fait, un enjeu sociétal pour la préservation, la mise en valeur et la restauration de la biodiversité guidant les gestes de génie écologiques des aménageurs [1].

La caractérisation des espèces des différents règnes du vivant ont toujours fait référence à des critères morphologiques, plutôt descriptifs, trouvant ainsi leurs limites chez les microorganismes, difficiles à observer. Ce sont alors des paramètres moléculaires qui ont été privilégiés [2].

C'est dans ce contexte que s'est développée la détermination rapide et fiable des espèces basée sur l'utilisation d'un fragment d'ADN. Dénommée « code-barres ADN », traduction de l'anglais DNA barcoding, il s'agit d'une région du gène mitochondrial codant

pour la cytochrome oxydase 1, qui a été définie en 2003 comme le fragment de référence pour la caractérisation des espèces animales [3].

Bien que le recours à des échantillons d'ADN « classiques » (le barcoding) était opérationnel depuis une dizaine d'années, [4], le recours au *Métabarcoding* est récent. Le mérite revient aux technologies de séquençages à haut-débit ayant permis le traitement simultané de plusieurs échantillons d'ADN provenant à la fois d'individus et d'espèces différentes, contrairement à la méthode classique qui ne permettait le traitement que d'un seul gène provenant d'un échantillon connu [6, 7, 8].

C'est en 1987 que l'on fait référence à l'ADNe pour la première fois [9]. Elle concernait une méthode d'extraction de l'ADN des micro-organismes à partir des sédiments [10]. Le terme ne va être réellement employé que dans les années 2000 par les microbiologistes [11, 12]. Le *Métabarcoding* environnemental ou l'ADNe (environnementale) permet une extraction d'échantillons environnementaux sans isolation préalable des organismes ciblés [13]. Il est composé de l'ADN extracellulaire provenant de cellules dégradées et de l'ADN cellulaire d'organisme vivant [14, 15].

La généralisation de cette technique s'est par la suite étendue aux macro-organismes animaux et végétaux, dont on peut détecter la présence dans des échantillons environnementaux grâce aux traces d'ADN qu'ils laissent derrière eux : cadavres, mucus, excréments, fragments ...

Sur ce point, la méthode paraît prometteuse et pourrait être mobilisée pour la caractérisation des écosystèmes arides aussi bien sur le plan microbiologique, encore peu connu, que sur le plan biologique. C'est dans cet esprit qu'une collaboration scientifique a été mise en place en 2013 afin de réaliser une étude exploratrice pilote. Une approche terrain originale a été réalisée en 2014 sur des échantillons environnementaux issus des sols de Dayassur un transect de 180 km entre Ouargla et Berriane (Ghardaia) et des pelotes de rejection du Hibou Grand Duc Ascalaphe et de la Chouette effraie.

Cet article, a pour objectif la vulgarisation de l'outil. A cet effet, les résultats préliminaires d'une étude exploratrice pilote seront présentés. Nous avons délibérément choisi cette option car nous avons jugé qu'il était d'abord important de présenter l'outil en question et non pas l'étude en soi étant donné que les difficultés que nous rencontrons ont trait au financement nécessaire pour enrichir la base de données de références. Comme nous le verrons dans les résultats, la non assignation à une espèce est due à la qualité de cette base encore très lacunaire pour le Sahara ...

## 2. DE NOMBREUX CHAMPS D'APPLICATION

Ces nouveaux outils biotechnologiques et bio-informatiques offrent des alternatives aux techniques souvent beaucoup plus lourdes à mettre en œuvre qui étaient jus qu'à présent utilisées pour décrire la biodiversité. De nouvelles perspectives s'ouvrent ainsi pour étudier le fonctionnement et l'évolution des écosystèmes, terrestres et aquatiques, avec pour unique pré requis la connaissance des communautés d'espèces interagissant en leur sein.

Décrire la biodiversité à partir d'échantillons de terre en utilisant le *Metabarcoding* se révèle, entre autres, utile lorsque les individus sont difficiles à trouver et à identifier morphologiquement, comme c'est le cas pour de nombreuses espèces de la faune du sol dont la fonction au sein de l'écosystème est essentielle (vers de terre, insectes, collemboles...).

Le *Metabarcoding* peut aussi se substituer aux relevés botaniques classiquement utilisés, notamment dans les milieux où la diversité est extrêmement élevée, les forêts tropicales humides par exemple. Il s'avère tout particulièrement utile lorsqu'il s'agit de reconstituer des paléo-environnements et que les espèces recherchées ont disparu. La reconstitution se fait classiquement à partir de l'étude de macro-fossiles et de pollens, qui biaise l'échantillonnage et est lourde à mettre en œuvre pour une faible résolution

taxonomique. Dans ce contexte, des études d'échantillons de permafrost datant de plus de 20 000 ans ont démontré une bien meilleure résolution que les relevés polliniques. [1]

Le *Metabarcoding* se révèle également plus efficace et plus résolutif que les méthodes traditionnelles pour étudier les régimes alimentaires à partir des fèces et des contenus stomacaux. Longue et fastidieuse, l'identification au microscope de fragments de cuticule de plante chez les herbivores ou de restes de proies chez les carnivores n'apporte que des informations très partielles. Le *Metabarcoding* utilisé pour reconstituer les régimes alimentaires se pose donc en technique complémentaire, voire alternative, à toutes ces méthodes. Son potentiel pour déterminer les espèces consommées a été démontré chez des animaux d'élevage (vache, mouton) et pour une grande variété d'animaux sauvages, des mammifères aux mollusques en passant par les oiseaux et les insectes [1].

### 3. APPROCHE METHODOLOGIQUE

Dans un premier temps, nous accordons la priorité à l'approche méthodologique du *Metabarcoding* car l'outil n'est que très peu connu en Algérie au regard des échanges que nous avons eu. En effet, l'ADNe est souvent confondu avec le barcoding classique d'où l'intérêt de cette présentation.

Le principe consiste à extraire l'ADN d'un échantillon environnemental (eau, sol, fèces), puis à amplifier par PCR le fragment cible correspondant au code-barres à l'aide d'un couple d'amorces prédéfini. Ces amorces peuvent être spécifiques d'une espèce. À l'inverse, les amorces peuvent amplifier un large spectre d'espèces. On parle alors de *Metabarcoding*. Dans ce cas, il faut séquencer les amplicons produits par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) puis les comparer à une base de référence pour les relier à une espèce donnée.

L'approche metabarcoding environnemental comporte six étapes :

- Echantillonnage au niveau du terrain (sol, eau,...)
- Extraction de l'ADN issu de ces échantillons
- Amplification par PCR
- Séquençage à haut débit du produit de la PCR
- Filtrage des données
- Assignation taxonomiques par comparaison à une BDD de référence.

#### 3.1. DES PRÉCAUTIONS À PRENDRE

A l'image de toute étude scientifique, l'échantillonnage doit être aussi représentatif que possible de la zone d'étude afin de mieux intégrer la biodiversité à l'échelle considérée.

L'étiquetage des échantillons est indispensable car elle permet une interprétation thématique des résultats. A titre d'exemple, les échantillons provenant d'une même région peuvent renseigner sur la répartition spatiale de la biodiversité et fournir ainsi des éléments de compréhension des communautés du vivant [18].

Par ailleurs la conservation des échantillons revêt un intérêt particulier car susceptible d'être dégradé par des enzymes. Il convient alors de : soit réaliser les analyses aussi tôt que possible après les prélèvements ou les conserver dans du silicagel [1].

Un bon code-barres ADN est une séquence variable entre espèces mais très conservée au sein d'une même espèce, permettant de lui attribuer un fort pouvoir discriminant. La séquence à étudier doit comporter deux zones très conservées d'une espèce à l'autre, pour permettre l'amplification du fragment par PCR pour garantir une bonne couverture taxonomique [1]. Par ailleurs, il est important que le fragment amplifié soit court, inférieur à 150 paires de bases (pb), permettant ainsi de travailler sur des matrices dégradées. De même, l'utilisation de fragments d'ADN mitochondriaux ou chloroplastiques est privilégiée car leur nombre de copies par cellule est 100 à 1 000 fois supérieur à celui de

l'ADN nucléaire ce qui permet de travailler sur de faibles quantités.[1]

Enfin, Il est également utile que les code-barres ADN soient phylogénétiquement informatifs pour assigner des espèces inconnues à un taxon d'ordre supérieur (genre, famille, etc.). Cela signifie que le niveau de divergence entre les séquences de référence reflète le niveau de divergence entre les espèces qui les portent.

### 3.2. L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le recours aux outils bio-informatiques est requis. Ces derniers ont été développés pour optimiser l'exploitation des bases de données à partir d'un jeu de séquences de référence prédéfini. Ils permettent de choisir les amorces d'amplification les mieux adaptées, par recherche des variables encadrées par des zones conservées. Ils sont aussi utilisés pour estimer la qualité des code-barres en mesurant le pouvoir discriminant et leur couverture taxonomique [16, 17].

La qualité de la base de référence et son exhaustivité par rapport à la zone d'étude conditionne bien entendu la qualité de l'assignation des séquences produites aux espèces.

### 4. CAS D'ÉTUDE DANS LE SAHARA SEPTENTRIONAL ALGÉRIEN

Une approche terrain originale a été réalisée en avril 2014 sur des échantillons environnementaux issus des sols de Dayas sur un transect de 180 km entre Ouargla et Berriane (Ghardaïa). Nous avons veillé à respecter les principes de précaution lors des prélèvements. Huit stations ont été choisies par hasard.

Au niveau de chaque Dayas une dizaine de prélèvements ont été effectués, homogénéisés pour en faire un seul échantillon représentatif.

Deux objectifs ont été assignés à cette étude pilote exploratrice : la première étant la capacité de détection de l'approche métabarcoding de traces ADN animale. La deuxième a trait à l'évaluation du stock semencier. S'agissant de traces animales (Tabl. 1), les résultats ont permis le référencement des espèces à trois taxons, la sous famille, le genre et l'espèce avec un score identitaire (best identity) supérieur ou égale à 0,8. Ce niveau de lecture (Best identity) exprime le score d'assignation de similarité par rapport à la base de référence. Plus il est proche de 1 mieux est le degré d'identification de l'espèce. Ce n'est pas le seul critère. Il existe une trame d'interprétation avec des critères à croiser afin de confirmer ou d'infirmer l'identification proposée. Parmi ces critères, la nature des séquences selon qu'elles soient vraies ou fausses. Là aussi un choix est à opérer parmi les séquences fausses qui a priori devraient être écartées sauf si elles sont associées à une séquence vraie traduisant un lien de parenté.

Ainsi, dans le taxon espèce, figurent 9 spécimens : (les informations entre parenthèses à faciliter la compréhension des résultats)

*Aphis craccivora* (aire de répartition IRAN)

*Aphis sedii* (aire de répartition Europe Asie et USA)

*Apis mellifera*

*Brenskiella flavomicans* (de la famille des Scarabaeidae dont l'espèce est signalée au Machrek et au Sinaï en Egypte)

*Chlamydatus becki* (aire de distribution Amérique du Nord)

*Dysaphis rumecicola* (comporte 100 espèces)

[\*D. acroptilidis\*](#) – [\*D. affinis\*](#) – [\*D. allii\*](#) – [\*D. angelicae\*](#) – [\*D. anisoidis\*](#) – [\*D. annulata\*](#) – [\*D. anthrisci\*](#) – [\*D. apiifolia\*](#) – [\*D. ariae\*](#) – [\*D. armeniaca\*](#) – [\*D. atina\*](#) – [\*D. aucupariae\*](#) – [\*D. bononii\*](#) – [\*D. brachycyclica\*](#) – [\*D. brancoi\*](#) – [\*D. brevirostris\*](#) – [\*D. bunii\*](#) – [\*D. candicans\*](#) – [\*D. capsellae\*](#) – [\*D. caucasica\*](#) – [\*D. centaureae\*](#) – [\*D. cephalariae\*](#) – [\*D. cephalarioides\*](#) – [\*D. chaerophylli\*](#) – [\*D. cnidii\*](#) – [\*D. cousiniae\*](#) – [\*D. crataegi\*](#) – [\*D. crathaegaria\*](#) – [\*D. crathaegiphila\*](#) – [\*D. crithmi\*](#) – [\*D. deltoidei\*](#) – [\*D. devectora\*](#)

*D. eremuri* – *D. ferulae* – *D. flava* – *D. foeniculus* – *D. gallica* – *D. handeliae*  
*D. henrystroyani* – *D. hirsutissima* – *D. hissarica* – *D. incognita* – *D. kadyrovi*  
*D. lappae* – *D. laserpitii* – *D. lauberti* – *D. leefmansi* – *D. libanotidis* – *D. ligulariae*  
*D. longipilosa* – *D. malidauci* – *D. maritima* – *D. microsiphon* – *D. mordvilkoii*  
*D. multisetosa* – *D. munirae* – *D. narzikulovi* – *D. neostroyani* – *D. newskyi*  
*D. oreoselini* – *D. orientalis* – *D. papillata* – *D. parasorbi* – *D. pavlovskyana*  
*D. peucedani* – *D. physocaulis* – *D. pimpinellae* – *D. plantaginea* – *D. plantaginis*  
*D. pseudomolli* – *D. pulverina* – *D. pyrarica* – *D. pyri* – *D. radicivorans* – *D. radicola*  
*D. ramani* – *D. ranunculi* – *D. rara* – *D. reaumuri* – *D. rumecicola* – *D. selinumii*  
*D. seselii* – *D. shaposhnikovii* – *D. sharmai* – *D. sibirica* – *D. sorbi* – *D. sorbium*  
*D. tadjikistanica* – *D. taisetsusana* – *D. taraxaci* – *D. tschildarensis*  
*D. tulipae* – *D. ubsanurensis* – *D. unicauli* – *D. uralensis* – *D. ussuriensis*  
*D. vandenboschi* – *D. viennoti* – *D. virgata* – *D. zini*.

*Monosynammabohemanni* (espèce signalée dans la région biogéographique du paléarctique occidental)

*Seirottranaannulipes* (Tenebrionidaereprésenté par 221 espèces au Sahara nord occidental)[19].

*Zophosispunctata*(Seul le genre signalé dans le Tassili du Hoggar en Algérie :Zophosissp (voir photo 1))



Photo 1. Zophosissp[20]

Nous avons éprouvé de grandes difficultés quant à l'assignation de l'espèce à la base de référence internationale GenBank. En effet, hormis *Zophosispunctata* dont seul le genre *Zophosis* est signalé dans le Tassili à l'extrême Sud algérien à environ 1500 km de Ouargla, nous ne pouvons pas confirmer ni infirmer la présence ou l'absence des 8 autres espèces. Seule une hypothèse peut être émise : il s'agit de la capacité de l'outil d'assigner l'espèce au parent génétiquement le plus proche. Cela renvoie donc à identifier le lien et le degré de parent éphylogénétique. Cette affiliation ne serait cependant vraie qui s'il ne s'agit pas d'une contamination relevant d'erreur de manipulation au laboratoire. Cette hypothèse est confortée au regard de la fréquence des séquences attribuées à *Zophosispunctata* (29,55%) et à la sous famille des Lagriinae (37,54%) (Tabl. 1). Ces deux taxons comprennent les Coleoptères et les Ténébrionidés largement répandus dans les zones sahariennes en Algérie. Ce résultat confirme la capacité de l'outil ADNe à fournir des informations pertinentes mais il est conditionné, pour une meilleure précision, à la qualité de la base de données de référence laquelle semble présentée, pour les régions sahariennes, de nombreuses lacunes.

**Tableau 1.** Résultats de l'analyse *Métabarcoding*

<b>Taxon</b>	<b>Nom Scientifique</b>	<b>Fréquence %</b>
Espèce	<i>Aphiscraccivora</i>	0,37
	<i>Aphisredi</i>	0,18
	<i>Apis mellifera</i>	0,18
	<i>Brenskiellaflavomicans</i>	0,18
	<i>Chlamydatiusbecki</i>	9,48
	<i>Dysaphisrumecicola</i>	1,48
	<i>Monosynammabohemanni</i>	0,92
	<i>Seirotanaannulipes</i>	9,1
	<i>Zophosispunctata</i>	29,55
Genre	<i>Cardiothorax</i> sp(Fam. Tenebrionidae)	8,55
Sous Famille	Lagriinae	37,54
	Pimeliinae	0,55
<b>TOTAL</b>		<b>98,08</b>
NB: rejetés	Lucilia	0,18
	no rank	1,3
<b>TOTAL</b>		<b>99,56</b>

**NB : rejetés** correspond à des contaminations de laboratoire, cas du genre lucilia, absent du Sahar

Ces résultats brutes sont à prendre avec précaution car il serait assez réducteur de prétendre maîtriser l'outil ADNe sur la base d'une seule étude pilote. En effet, l'assignation aux différents taxons dépend comme indiquer plus haut de la qualité de la base de référence. Pour le Sahara elle est quasiment vide et devrait être enrichie.



## 5. CONCLUSION

L'émergence de nouvelles techniques de séquençage et l'outil bioinformatique ont fortement contribué à l'apparition de l'approche *Metabarcoding*. Désormais cette alternative permet de décrire la biodiversité à partir d'échantillons environnementaux (issus de la nature) dans les nombreux cas où les méthodes classiques s'avèrent peu résolutive et fastidieuses (couteuse en temps et parfois comportant des biais à l'image des risques de confusion potentielle induites par le polymorphisme végétal). Son intérêt se révèle aussi au niveau des perspectives offertes rendant possible la combinaison de différents codes-barres en faveur d'études intégrées à partir d'un même échantillon. C'est le cas, par exemple, de la possibilité d'analyse simultanée de la microflore intestinale, du cortège parasitaire et du régime alimentaire d'une espèce grâce à ses excréments.

Dans notre cas d'étude présenté, la non assignation à une espèce est due à la qualité de la base de référence encore très lacunaire pour le Sahara. Cette étude préliminaire confirme que le Sahara demeure un terrain de recherche encore vierge où les études originales sont encore possibles et nombreuses. En effet, au regard des lacunes constatées, un travail conséquent d'inventaire de la faune, de la flore et des microorganismes reste nécessaire pour combler les manques voire corriger certaines données. Nous faisons allusion, dans ce contexte, au polymorphisme végétal qui pourrait induire en erreur. En effet, les grandes expéditions d'inventaire datent des années 1960-1970 à l'époque où les moyens n'étaient pas aussi disponibles qu'aujourd'hui.

Le recours au barcoding classique sera la première étape à envisager pour enrichir cette base de référence.

## REFERENCES

- [1] Pompanon F., Coissac E., Taberlet P., 2011.- Metabarcoding, une nouvelle façon d'analyser la biodiversité. *Biofutur* 319: 30-32
- [2] Floyd R., Abebe E., Papert A., Blaxter M., 2002.- Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular ecology* 11, 839-50.
- [3] Hebert P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., 2003.- Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 1512: 313-321.
- [4] Ji Y., Ashton L., Pedley S.-M., et al., 2013.- Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via *metabarcoding*. *Ecology letters*, 16, 1245-1257.
- [5] Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A., Willerslev E., 2007.- Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, 35(3), e14-e14.
- [6] Kircher et Kelso., 2010.- High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *BioEssays*, 32, 524-536.
- [7] Shokralla S., Spall J.L., Gibson J.F., Hajibabaei M., 2012.- Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology*, 21, 1794-1805.
- [8] Taberlet P., Prud'homme S. M., Campione E., Roy J., Miquel C., Shehzad W., Coissac E., 2012b.- Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular ecology*, 21(8), 1816-1820.-
- [9] Goulon et Guervenou., 2014.- Mise en évidence de deux milieux différents et étude de la biodiversité par le metabarcoding. Mémoire Master 1, UJF Grenoble, 14 p.
- [10] Ogram A., Sayler G. S., Barkay T., 1987.- The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, 7(2), 57-66.
- [11] Rondon M. R., August P. R., Bettermann A. D., Brady S. F., Grossman T. H., Liles M.

- R., Goodman R. M., 2000.- Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of un culture des microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2541-2547.
- [12] Handelsman J., 2004.- Metagenomics: application of genomics to un culture des microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669-685.
- [13] Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012a.- Environmental DNA. *Molecular ecology*, 21(8), 1789-1793.
- [14] Levy-Booth D. J., Campbell R. G., Gulden R. H., Hart M. M., Powell J. R., Klironomos, J. N., Dunfield, K. E., 2007.- Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(12), 2977-2991.
- [15] Pietramellara G., Ascher J., Borgogni F., Ceccherini M. T., Guerri G., Nannipieri P. 2009.- Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3), 219-235.
- [16] Ficetola G. F., Miaud C., Pompanon F., Taberlet P., 2008.- Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423-425.
- [17] [www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools](http://www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools)
- [18] Pansu J., 2014.- Impacts des activités anthropiques sur la biodiversité : une approche spatiale et temporelle par analyse de l'ADN environnemental. Thèse de doctorat, Univ. Grenoble, 258 p.
- [19] Dajoz R., 2010.- Dictionnaire d'entomologie. Éditions Tech & Doc Lavoisier, 336 p
- [20] <http://www.sahara-nature.com/animaux.php?species=tenebrionidae&ident=T17#T17>