



Journée ZABR | ADN Environnemental

Evaluation des écosystèmes aquatiques à l'ère moléculaire
état de l'art, challenges et projets

23 janvier 2020 | Lyon



ENVIRONNEMENT
O MAGAZINE.FR

Sommaire

Avant-propos ----- 3

Programme de la conférence ----- 4

Barcoding, Métabarcoding : petite entrée en matière
Tristan LEFEBURE, UMR 5023 Lehma, Université Lyon 1 ----- 7

L'ADNe POUR INVENTORIER DES ESPECES

L'ADNe pour détecter des espèces rares ou exotiques
Jonathan GRONDIN, Spygen
Michael CAGNANT, Office Français de la Biodiversité (OFB) -----15

L'ADNe pour comprendre les relations prédateur-proies-habitat : le cas
de l'Apron du Rhône
Vincent DUBUT, UMR IMBE, Aix Marseille Université----- 22

L'ADNe pour la connaissance des peuplements de poissons : intérêts et
limites en fonction des objectifs et types de milieux
Mathieu ROCLE, CNR
Nicolas ROSET, Office Français de la Biodiversité (OFB)----- 29

L'ADNe POUR REVELER LES CHANGEMENTS ENVIRONNEMENTAUX

Ce que révèle l'ADNe dans les carottes sédimentaires des lacs
David ETIENNE, UMR Carrtel, Inrae----- 36

Évaluer la qualité écologique des milieux aquatiques avec l'ADN des
diatomées
Valentin VASSELON, Office Français de la Biodiversité (OFB)--- 41

L'ADNe du miel d'abeilles domestiques : vers un nouvel outil pour la
flore terrestre
Julie CHARTON, Matthieu LE BRUN, EDF-R&D----- 47

EN ROUTE VERS L'IMPLEMENTATION DE CES OUTILS

Propositions de scénario et de plan d'action pour le déploiement de ces
outils
Philippe BLANCHER, Estelle LEFRANÇOIS, Eco in'Eau----- 52

Quelle mise en œuvre à l'échelle nationale et européenne ?
Agnès BOUCHEZ, UMR Carrtel, Inrae ----- 58

POSTERS ----- 62

Avant-Propos

Contexte

À l'heure où la **biodiversité des milieux aquatiques** est en danger, il est plus que nécessaire de **caractériser l'état écologique** de ces écosystèmes, en vue de leur préservation et de de leur restauration. Cette évaluation est d'ailleurs imposée par la Directive-Cadre sur l'Eau.

Traditionnellement, les **méthodes d'évaluation** reposent sur la mesure de la structure ou du fonctionnement des communautés, et sont basées sur l'identification morphologique de divers groupes d'organismes. Cette approche présente aujourd'hui un certain nombre de limites : coût, temps, difficultés d'identifications.

Le développement récent des **outils de bioévaluation environnementale basés sur l'analyse de l'ADN** (barcoding, métabarcoding) permet-il de dépasser ces limites ?

Objectifs

Cette journée vise ainsi à :

- Partager ensemble **différentes approches d'évaluation** de la biodiversité basées sur l'ADN environnemental, depuis les méthodes déjà opérationnelles aux développements plus récents
- Discuter des **plus-values, limites et perspectives** de ces outils
- Échanger sur **les démarches et actions à développer** pour favoriser leur bonne utilisation

Comité de programme

Marie BEAREZ, **CNR**, Agnès BOUCHEZ, **UMR Carrel Inrae**, Anne CLEMENS, **Graie Zabr**, Thibault DATRY, **Inrae**, Isabelle JACQUELET, **EDF**, Tristan LEFEBURE et Laurent SIMON, **UMR 5023 Lehma Université Lyon 1**, Nicolas ROSET et Nicolas POULET, **OFB**, Stéphane STROFFEK et Olivier GORIN, **Agence de l'eau RMC**

Programme

09h00 Accueil

09h30 Ouverture

Anne CLEMENS, Directrice de la Zabr

09h40 Barcoding, Métabarcoding : petite entrée en matière

Tristan LEFEBURE, UMR 5023 Lehma, Université Lyon 1

L'ADNe POUR INVENTORIER DES ESPECES

Animation Tristan Lefebure, UMR 5023 LEHNA, Université Lyon 1

10h15 L'ADNe pour détecter des espèces rares ou exotiques

Jonathan GRONDIN, Spygen
Michael CAGNANT, Office Français de la Biodiversité (OFB)

10h40 L'ADNe pour comprendre les relations prédateur-proies-habitat : le cas de l'Apron du Rhône

Vincent DUBUT, UMR IMBE, Aix Marseille Université

12h00 L'ADNe pour la connaissance des peuplements de poissons : intérêts et limites en fonction des objectifs et types de milieux

Mathieu ROCLE, CNR
Nicolas ROSET, Office Français de la Biodiversité (OFB)

11h30 Table ronde : Plus-values et limites de ces outils ?

12h00 Flash Poster

12h30 Déjeuner

L'ADNe POUR REVELER LES CHANGEMENTS ENVIRONNEMENTAUX

Animation Laurent Simon, UMR 5023 LEHNA, Université Lyon 1

14h00 Ce que révèle l'ADNe dans les carottes sédimentaires des lacs

David ETIENNE, UMR Carrel, Inrae

14h25 Évaluer la qualité écologique des milieux aquatiques avec l'ADN des diatomées

Valentin VASSELON, Office Français de la Biodiversité (OFB)

14h50 L'ADNe du miel d'abeilles domestiques : vers un nouvel outil pour la flore terrestre ?

Julie CHARTON, EDF

15h15 Pause

EN ROUTE VERS L'IMPLEMENTATION DE CES OUTILS

Animation Agnès Bouchez, UMR CARRETEL, Inrae

15h45 Propositions de scénario et de plan d'action pour le déploiement de ces outils

Philippe BLANCHER, Estelle LEFRANÇOIS, Eco in'Eau

16h25 Quelle mise en œuvre à l'échelle nationale et européenne

Agnès BOUCHEZ, UMR Carrel, Inrae

17h00 Fin de la journée

Posters

Potentiel des capteurs passifs en hydroxyapatite pour échantillonner l'ADN environnemental

Héloïse Verdier, LEHNA, Université de Lyon, et al. ----- 63

May stream biofilms act as macroinvertebrates eDNA samplers?

Sinziana F. Rive, UMR CARTEL, Inrae, et al----- 64

B1-O-RHÔNE: Knowledge of seasonal and inter-annual fish density variations in the light of sediment management operations on the Swiss and French upper-rhône river

Franck Cattaneo, HESGE, Mathieu Rocle, CNR, et al. ---- 65

RESUMÉS et SUPPORTS D'INTERVENTIONS

Barcoding, Métabarcoding : petite entrée en matière

Tristan LEFEBURE, UMR 5023 LEHNA, Université Lyon 1

RÉSUMÉ

Depuis son essor au début des années 2000, l'identification moléculaire des organismes à partir de séquences d'ADN (DNA barcoding) s'est imposée comme une approche complémentaire des approches morphologiques. Initialement appliqué à des organismes considérés isolément, ce principe a vite été élargi à des échantillons environnementaux complexes, donnant ainsi naissance à l'identification en parallèle de tous les organismes d'une communauté (metabarcoding).

Dans cette présentation introductive, je détaillerai les processus de barcoding et de metabarcoding. Enfin je présenterai les différentes facettes que cache le terme d'ADN environnemental (eDNA).

Propulsé par les progrès des techniques de séquençage, l'utilisation de l'ADN en écologie est en transformation constante. En plus de la complexité associée à ce type d'approches interdisciplinaires, le vocabulaire décrivant les méthodes employées et leurs applications est en renouvellement permanent, rendant cette thématique peu lisible pour des non spécialistes. Une meilleure compréhension d'un projet en sciences de l'eau utilisant l'ADN débute par un décryptage des unités biologiques étudiées, du type de matrice ADN échantillonnée, et enfin du type de marqueurs moléculaires utilisés.

Barcoding, Métabarcoding, ADN ...

petite entrée en matière

Tristan Lefébure

Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés
tristan.lefebure@univ-lyon1.fr

22 janvier 2020

Journée ZABR - ADN environnemental



Tristan Lefébure - LEHNA

Barcoding, Métabarcoding, ADN ...

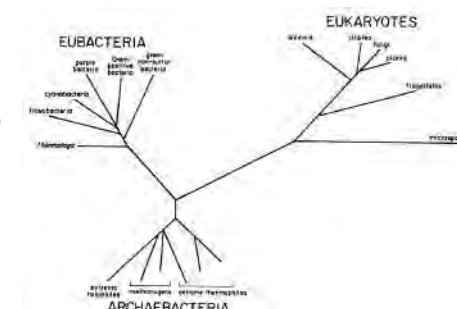
Journée ZABR - ADN

1 / 25

ADN et Identification moléculaire



ADN : Universel, transmission verticale, accumule des substitutions



Woese 1987

Utilisation : Phylogénie, identification moléculaire, ...

Tristan Lefébure - LEHNA

Barcoding, Métabarcoding, ADN ...

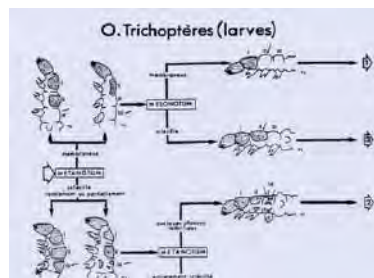
Journée ZABR - ADN

2 / 25

Identification morphologique

Limitations des approches morphologiques :

- Limite intrinsèque à l'identification morphologique :
 - ▶ cryptisme
 - ▶ indétermination des juvéniles, sexe, fragments...
- Difficulté d'échantillonnage
- Déclin des experts
- Coûts et délais de l'identification



Burns et al 2008 PNAS

Identification moléculaire

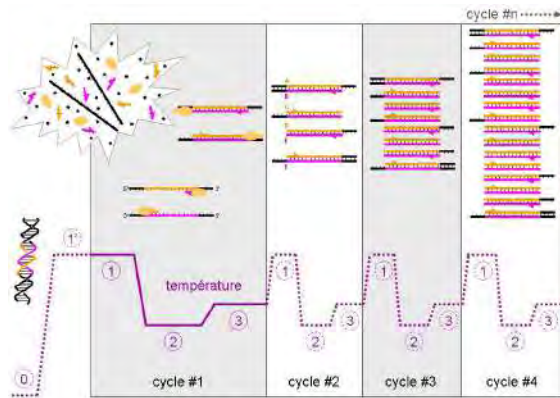
Différent objectifs :

- DNA barcoding (**identification** st d'un organisme) : **Quel est ce taxon ?**
- Taxinomie moléculaire (identification + **délimitation**)
- Détection moléculaire (présence/absence, abondance) : **Le taxon X est-il présent ?**
- Barcoding environnemental (**métabarcoding**) : **qui est là ?**
- Génomique environnementale (**métagénomique**) : **qui, quoi, comment ?**



Photo Credit : Suz Bateson

Une technique centrale : la PCR



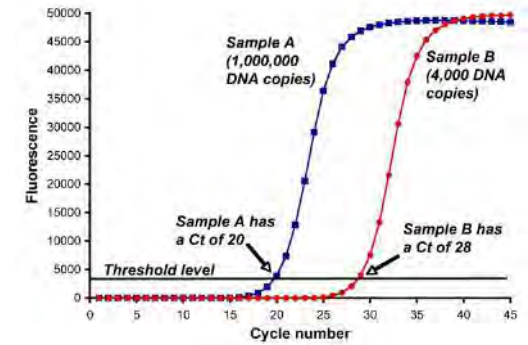
Page wikipedia

- Doublement du nombre de molécule ciblée à chaque cycle
- $n_x = n_0 \times 2^x$
- 1 → 1E6 molécules en 20 cycles
- Méthode très sensible !

Quantification par PCR

PCRq, PCR en temps réel

- Décalage dans le temps de la phase exponentielle visible en fonction du nombre de molécule de départ
- Quantification relative : $2^8 = 256X$
- Quantification absolue avec gamme étalon



⇒ PCR : un outil pour détecter et quantifier les ADN

Détection d'espèce par (q)PCR



Table 1. Rate of bullfrog detection in water samples.

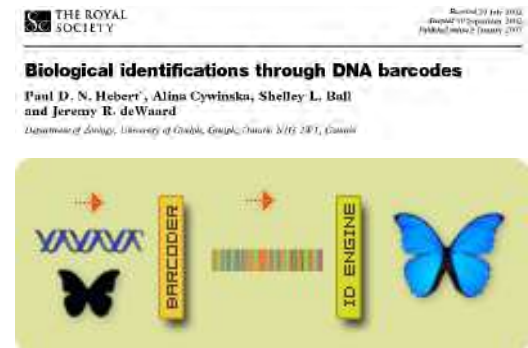
pond	bullfrog presence and relative abundance	water samples positives at least once	positive PCRs
1	yes-low	2/3	2/9
2	yes-low	3/3	6/9
3	yes-low	2/3	2/9
4	yes-high	3/3	8/9
5	yes-high	3/3	6/9
6	yes-high	3/3	8/10
7	no	0/3	0/9
8	no	0/3	0/9
9	no	0/3	0/15

- Détection de la grenouille-taureau
- Matrice : Eau (3 x 15mL)
- Amorces spécifiques (Cyt-b) et PCR

DNA barcoding

Identification à l'espèce à l'aide d'un marqueur moléculaire "universel" :

- métazoaire : COI
- champignon : ITS
- Plantes : RBCL et MATK

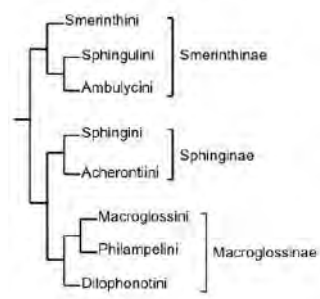


<http://www.boldsystems.org/>

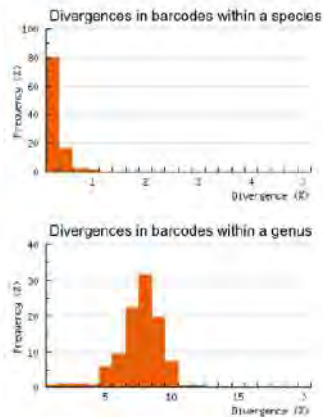
Une contrainte : le barcoding gap



A. Taxonomy of Sphingidae



B. DNA barcoding of Sphingidae



Wilson et al 2011

divergence intra-spécifique $\ll$ divergence inter-spécifique

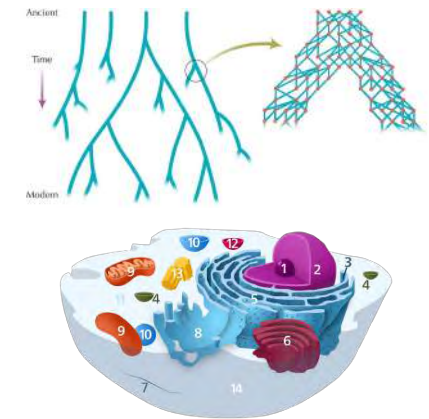
Le barcoding gap

Equilibre entre deux forces évolutives :

- Mutation (μ) : création de nouveaux variants (**polymorphisme intra-spécifique**)
- Dérive (N_e) : fixation aléatoire des variants (**cohésion des espèces**)

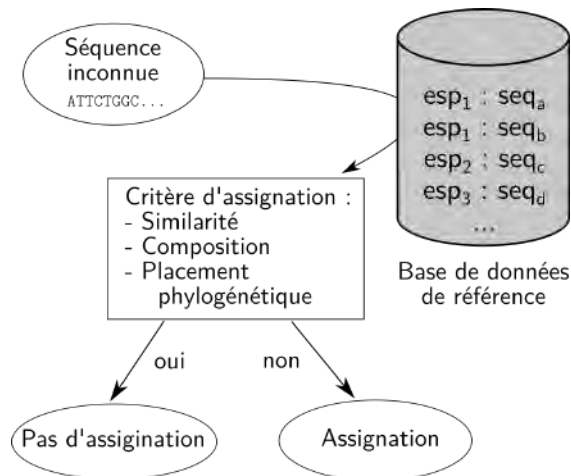
Conditions pour apparition d'un barcoding gap :

- Fort μ + faible N_e
- Exemple : génome mitochondrial des animaux



Les étapes du barcoding

- 1 Echantillonnage d'un organisme
- 2 Extraction ADN
- 3 Amplification par PCR d'un barcode
- 4 Séquençage Sanger
- 5 Assignment taxonomique



Le Métabarcoding ?



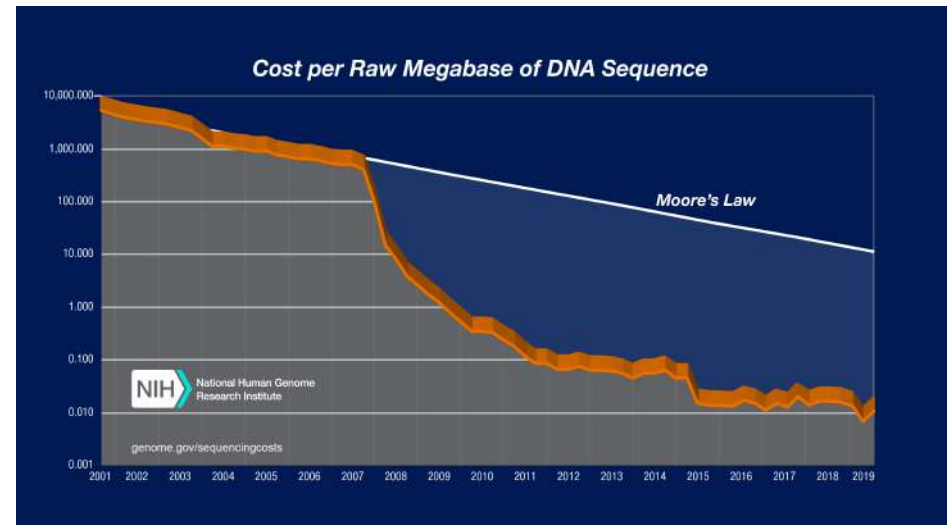
Drummond et al 2015 GigaScience

DNA metabarcoding

- Pompanon et al 2011 Biofutur
- Identification moléculaire d'une communauté d'organisme
- Extension directe du barcoding aux ADN d'une communauté
- Équivalent en μ bio : Métagénomique ciblée dans un but d'identification taxonomique
- Technique : séquençage en parallèle d'amplicon de gène (eg. 16S, COI, matK, ...)

Navigation icons

Possible grâce au séquençage parallèle



ADN → séquençage aléatoire → millions de courtes lectures

Navigation icons

Etape d'une manip de métabarcoding

1- Terrain

- 1 Echantillonnage
 - ▶ Pool d'organismes triés
 - ▶ Environnemental : sédiments, eau, swabs ...

2- Conservation

2- Biologie moléculaire

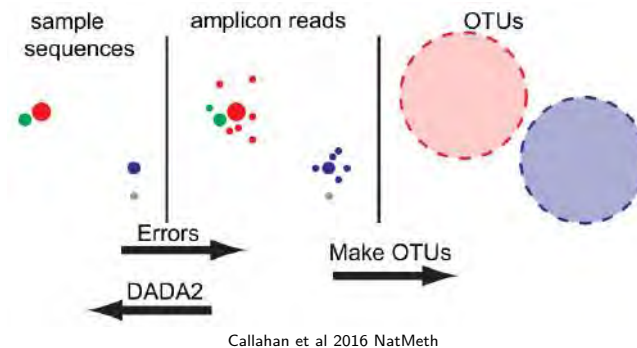
- 1 Extraction ADN
- 2 Amplification par PCR d'un barcode
- 3 Préparation de librairie de séquençage
- 4 Séquençage Illumina (séquençage d'amplicons)

3- Bioinformatique

- 1 Nettoyage et fusion des lectures
- 2 Déréplication
- 3 Clustering → OTU
- 4 Elimination des chimères
- 5 Assignment taxonomique

Navigation icons

Operational Taxonomic Units *versus* Amplified Sequence Variants



Navigation icons

Sortie d'une analyse de métabarcoding

	assignation	echant ₁	echant _j	→ echant _k
OTU ₁	sp ₁	100	200	→
OTU ₂		10		
OTU _i			N _{ij}	
↓		↓		
OTU _n				

- avec N_{ij} = Comptage de lecture, estimateur de l'abondance d'un OTU
- Analogie d'une tableau d'abondance en écologie des communautés
- △ : Abondance relative ≠ abondance absolue

Les différentes matrices ADN

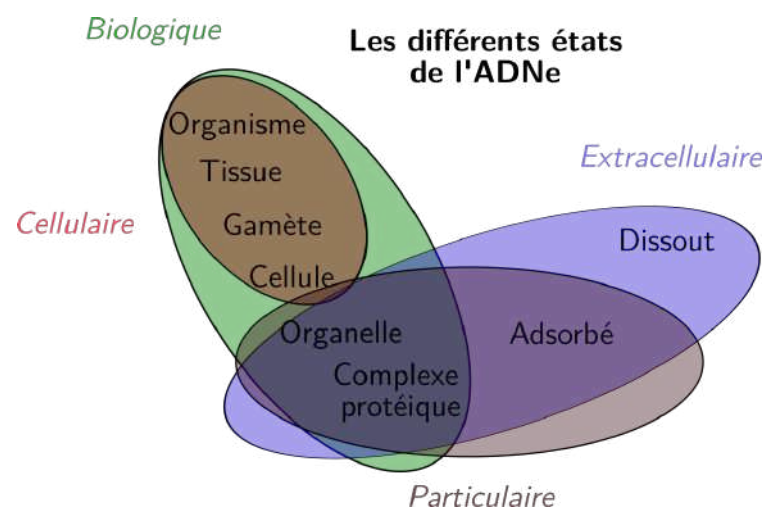
- ADN génomique** : Génome d'une espèce, 1 organisme
- ADN d'une communauté d'organisme trié** : Génome de X espèces, *bulk DNA*, *Community DNA*
- ADN environnementaux** : ADN isolés directement d'un échantillon environnemental sans isolement préalable des organismes, *eDNA*

Diener et al 2017 MolEcol, Cristescu et Hebert 2018 AREES

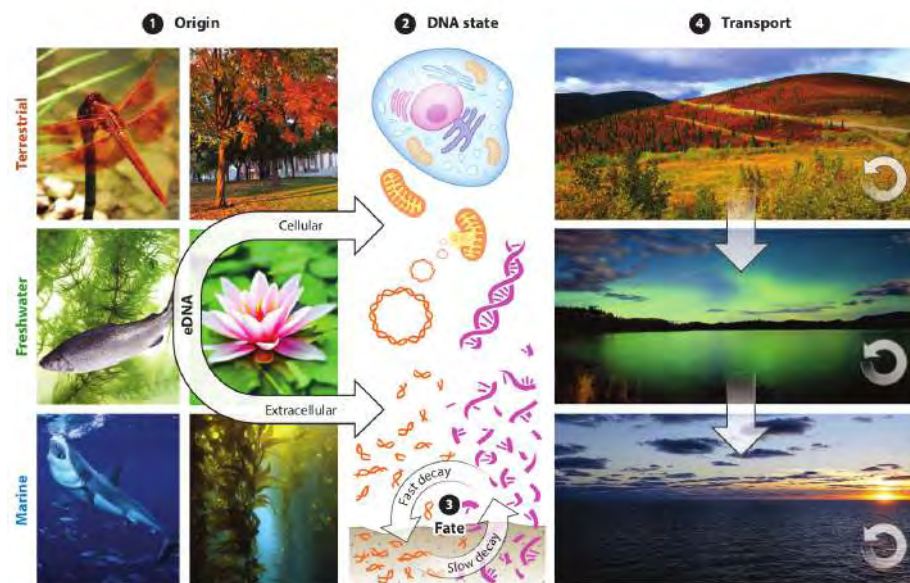


Vasco Elbrecht : <https://sites.google.com/view/vasco-elbrecht>

ADN environnemental ?

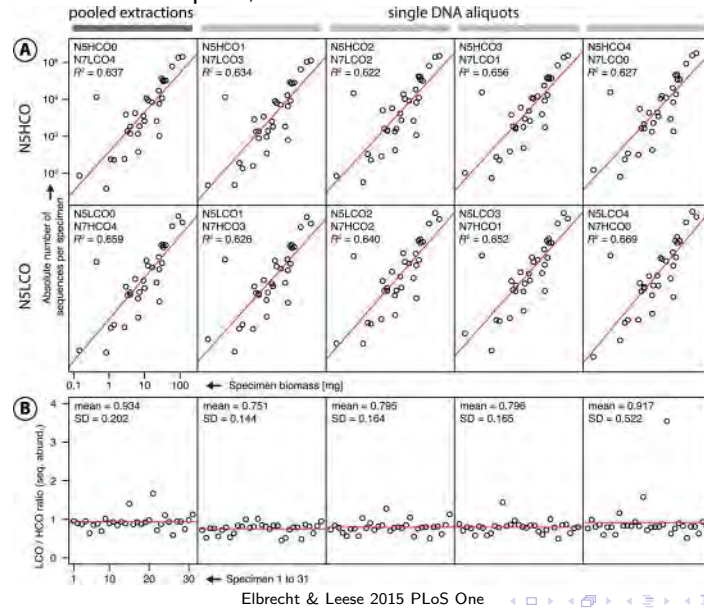


L'écologie de l'ADNe



Community DNA et relation à la biomasse

Expérience 1 : même espèce, biomasse différente



Tristan Lefebvre - LEHNA

Barcoding, Métabarcoding, ADNe ...

Journée ZABR - ADNe

21 / 25

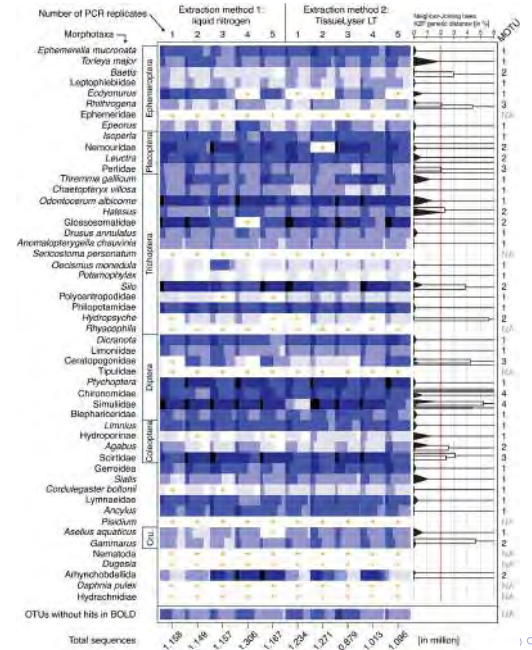
Community DNA et relation à la biomasse

Expérience 2 : Différentes espèce, biomasses identiques

- 82% des taxon retrouvés
- Variation de 1 à 4 des abondances en lectures entre taxons

⇒ Biais de PCR

Elbrecht & Leese 2015 PLoS One



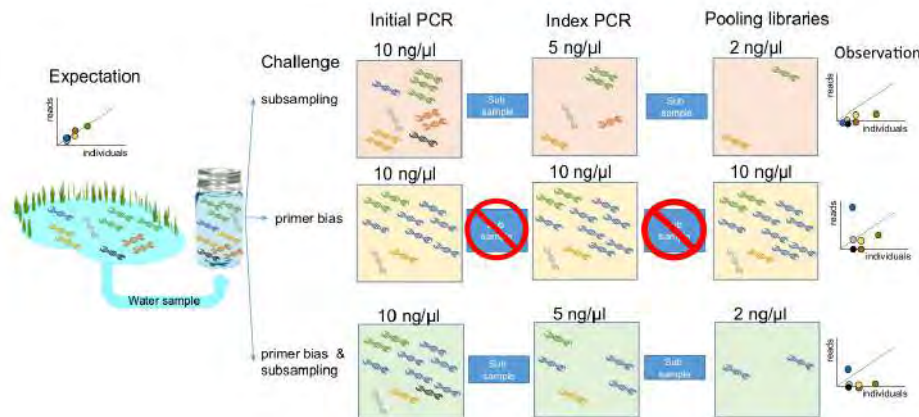
Tristan Lefebvre - LEHNA

Barcoding, Métabarcoding, ADNe ...

Journée ZABR - ADNe

22 / 25

Répétabilité



Diener et al 2016 ME

- Molécules rares
- Sous-échantillonnage
- Multiple étapes avec perte de matériel

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020

Tristan Lefebvre - LEHNA

Barcoding, Métabarcoding, ADNe ...

Journée ZABR - ADNe

23 / 25

La pauvreté des bases de données - Great but blind

Fond marins, surface standardisée, amplicons de COI

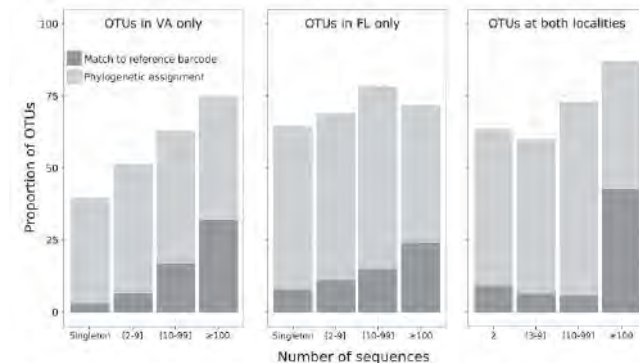


Fig. 2. Proportion of identified OTUs in a metabarcoding dataset according to the number of sequences. A match to the reference barcode was defined as >97% similarity.

Leray & Knowlton 2015 PNAS

Seulement 10% des séquences avec une identification au genre...

Tristan Lefebvre - LEHNA

Barcoding, Métabarcoding, ADNe ...

Journée ZABR - ADNe

24 / 25

Challenges

- Dépendance aux bases de données
- Quantification relative parfois possible, mais
- Biais de PCR, biais de biomasse, biais de densité en organelle
- Réplicabilité
- Risque de contamination
- ADNe, une matériel complexe (pas une méthode, pas un outil)

Lacoursière-Roussel et Deiner 2019 JFishBiol



L'ADNe pour détecter des espèces rares ou exotiques

Jonathan GRONDIN, Spygen
Michael CAGNANT, Office Français de la Biodiversité (OFB)

RÉSUMÉ

Le travail de collaboration entre l'OFB et SPYGEN depuis 2012, a permis d'aboutir au développement d'une méthode d'inventaire de la biodiversité aquatique basée sur la recherche de traces d'ADN dans l'environnement, l'ADN environnemental. Deux approches sont développées : l'approche Barcoding (étude d'une espèce cible) ; l'approche Métabarcoding (étude à l'échelle d'un ou plusieurs groupes taxonomiques). Ces méthodes (VigiDNA®), standardisées et reproductibles, permettent une très bonne détectabilité des espèces aquatiques, dont des espèces rares libérant très peu d'ADN dans le milieu, comme par exemple l'Apron du Rhône (*Zingel asper*), ou des Espèces Exotiques Envahissantes comme par exemple le Gobie à tâche noire (*Neogobius melanostomus*).

Dans le cadre du Plan National d'Action (PNA) pour l'Apron du Rhône 2012-2017, animé par le Conservatoire d'Espaces Naturels

Rhône-Alpes, la recherche d'ADNe (VigiDNA®) a permis en 2016 de détecter la présence d'une population d'aprons sur le Verdon à l'amont de sa limite de répartition connue, validée l'année suivante par des observations directes lors de prospections nocturnes. Dans le cas du gobie à tâche noire, des analyses menées par l'OFB (en partenariat avec la fédération de pêche des Alpes de Haute Provence) a permis de mettre en évidence la colonisation en cours à l'amont de la retenue de Sainte-Croix sur le Verdon, posant notamment la question de la concurrence avec l'apron.

Cette méthode innovante présente de nombreux avantages qui la conforte dans sa position de méthode d'inventaire pertinente complémentaire aux méthodes d'inventaires « classiques », qui permettent notamment de recueillir des informations à l'échelle des individus et en termes d'abondance.



L'ADNe POUR LA DÉTECTION D'ESPÈCES RARES OU EXOTIQUES

Michaël Cagnant, OFB
Jonathan Grondin, SPYGEN



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Développement de la méthode ADNe

- Développement des approches ADNe **Barcoding** et **Metabarcoding** en milieux aquatiques depuis 2011
- Collaboration OFB / SPYGEN
- Outils et méthodes d'inventaire et suivi **fiables** et **standardisés**



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2

L'ADNe pour la détection d'espèces rares ou exotiques

- Espèce rare ?



- Espèce exotique ?

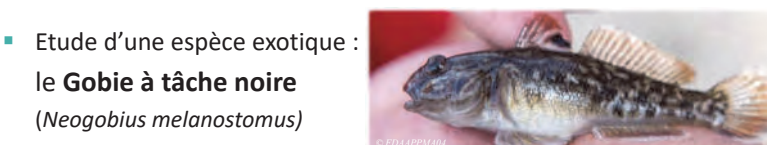
Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

3

L'ADNe pour la détection d'espèces rares ou exotiques



- Etude d'une espèce rare :
l'Apron du Rhône
(*Zingel asper*)

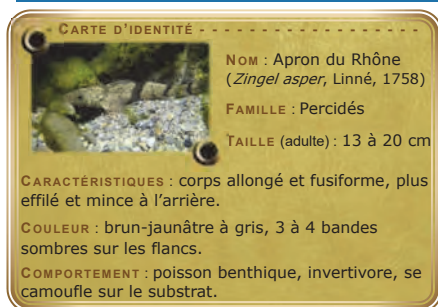


- Etude d'une espèce exotique :
le Gobie à tâche noire
(*Neogobius melanostomus*)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

4

L'ADNe pour la détection de l'Apron du Rhône



- Endémique du bassin du Rhône
- Indicateur de qualité biologique et fonctionnelle des cours d'eau
- Fort déclin au cours du XXème siècle

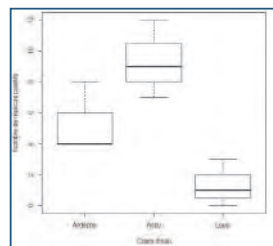
- Plan National d'Action (PNA) en 2012 (animé par le Conservatoire d'Espaces Naturels Rhône-Alpes - CEN RA)
 - Amélioration des connaissances → gestion de ses habitats
 - Etude faisabilité ADNe CEN RA / SPYGEN

L'ADNe pour la détection de l'Apron du Rhône

- 2012 -2015: Etudes de faisabilité
 - Barcoding Vs Métabarcoding → 92% Vs 96% détectabilité
 - Densité de population
 - Variabilité journalière
 - Différentes stratégies d'échantillonnage
(Distance, localisation amont/aval d'un radier, Profondeur...)

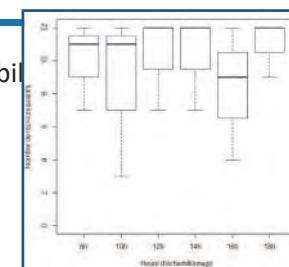
L'ADNe pour la détection de l'Apron du Rhône

- 2012 -2015: Etudes de faisabilité
 - Barcoding Vs Métabarcoding → 92% Vs 96% détectabilité
 - Densité de population → En faible ou forte densité
 - Variabilité journalière
 - Différentes stratégies d'échantillonnage
(Distance, localisation amont/aval d'un radier, Profondeur...)



L'ADNe pour la détection de l'Apron du Rhône

- 2012 -2015: Etudes de faisabilité
 - Barcoding Vs Métabarcoding
 - Densité de population
 - Variabilité journalière
 - Différentes stratégies d'échantillonnage
(Distance, localisation amont/aval d'un radier, Profondeur...)

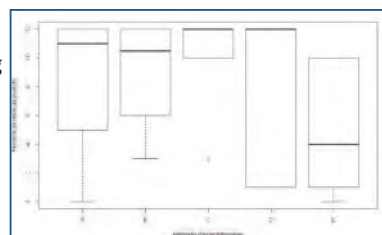


→ Pas de différence significative

L'ADNe pour la détection de l'Apron du Rhône

2012 -2015: Etudes de faisabilité

- Barcoding Vs Métabarcoding
- Densité de population
- Variabilité journalière



➔ Pas de différence significative

- Différentes stratégies d'échantillonnage
(Distance, localisation amont/aval d'un radier, Profondeur...)

L'ADNe pour la détection de l'Apron du Rhône

2016: Etude de la répartition de l'espèce par ADNe

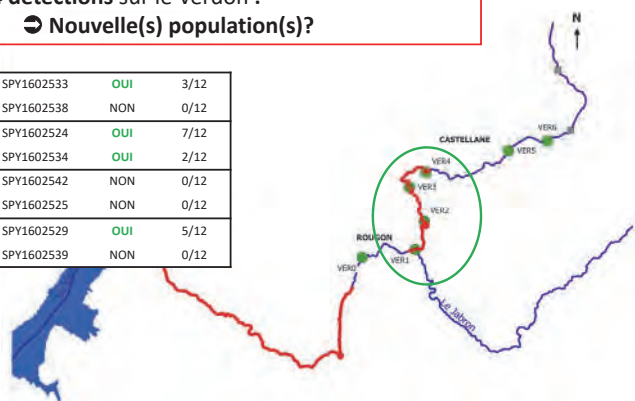
- 34 sites** sur 8 cours d'eau : Doubs, Loue, Lanterne, Ain, Drac, Cèze, Gardon, Verdon
- Protocole d'échantillonnage validé: Filtration **30L**, porosité **0,45µm**, **2 réplicats** par site.
- Analyse **Barcoding** (une espèce recherchée)



L'ADNe pour la détection de l'Apron du Rhône

2016: 4 détections sur le Verdon :
➔ Nouvelle(s) population(s)?

VER1	SPY1602533	OUI	3/12
	SPY1602538	NON	0/12
VER2	SPY1602524	OUI	7/12
	SPY1602534	OUI	2/12
VER3	SPY1602542	NON	0/12
	SPY1602525	NON	0/12
VER4	SPY1602529	OUI	5/12
	SPY1602539	NON	0/12



L'ADNe pour la détection de l'Apron du Rhône

2017: prospections nocturnes
➔ confirmation de présence de l'espèce

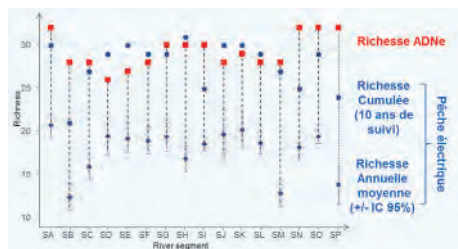
- Extension de l'aire de répartition connue sur le Verdon:
 - 2012: linéaire de 18 km** à l'amont immédiat du lac de Sainte-Croix
 - 2017: linéaire minimum de 31 km**



L'ADNe pour la détection de l'Apron du Rhône



Etude des peuplements piscicoles du Rhône



Pont et al., 2018

2 espèces uniquement détectées par ADNe dont:

- *Zingel asper* (Apron du Rhône)
- *Misgurnus fossilis* (Loche d'étang)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

10

L'ADNe pour la détection du gobie à tâche noire

Problématique

2017: Capture d'un gobie à tâche noire (*Neogobius melanostomus*) dans le plan d'eau de Brunet (bassin versant de l'Asse, 04).

— Possibilité de présence dans d'autres plans d'eau du bassin de la Durance!!!

— **2018:** Capture de gobies à tâche noire dans la retenue de Sainte-Croix sur le Verdon (04/83)



Risque identifié:

- propagation à tout le bassin de la Durance
- concurrence vis-à-vis d'espèces autochtones (notamment apron)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

11

L'ADNe pour la détection du gobie à tâche noire

Difficultés

- Espèce « nouvelle » = espèce rare?
- Milieux concernés = milieux « difficiles »:
 - Plans d'eau = milieux profonds difficiles à échantillonner (filets, nasses, pêches électriques en bordure, pêche à la ligne,...)
 - Verdon à l'amont de la retenue de Sainte-Croix = milieu large, peu accessible, torrentiel

Solution pragmatique et pertinente



ADNe metabarcoding

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

12

L'ADNe pour la détection du gobie à tâche noire

Prélèvements ADNe metabarcoding

Plans d'eau du bassin de la Durance (juin 2017)

- exutoire du plan d'eau des Buissonnades
- exutoire du plan d'eau de Forestière

Gobie à tâche noire: **NON DÉTECTÉ**

(mais jusqu'à 16 taxons détectés dont gambusie, perche-soleil, pseudorasbora,...)



© M. CAGNIANT - OFB



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

13

L'ADNe pour la détection du gobie à tâche noire

Prélèvements ADNe metabarcoding

Verdon à l'amont de la retenue de Sainte-Croix

- Prélèvement du 3 septembre 2018

Gobie à tâche noire: **NON DÉTECTÉ**

- Prélèvements du 22 août 2019

Gobie à tâche noire: **DÉTECTÉ**

Nom scientifique	Base de référence	AFB-STCRO2			
		SPY192652	SPY192653	SPY192654	SPY192655
		Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN
<i>Neogobius melanostomus</i>	SPYGEN	5	4 349	9	2 258
<i>Zingel asper</i>	SPYGEN	12	14 825	12	16 876

Campagne de suivi de la colonisation du gobie à tâche noire sur le Verdon (convention OFB/FDAAPMA04)

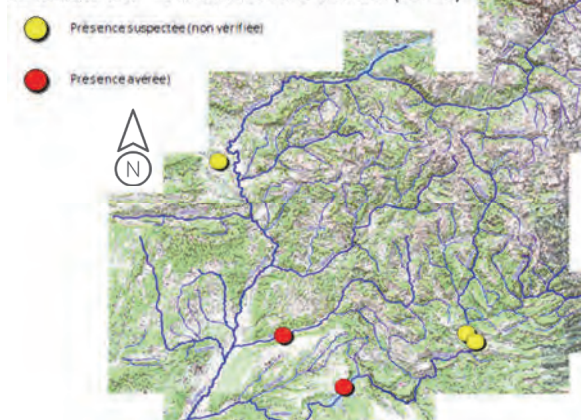


Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

14

L'ADNe pour la détection du gobie à tâche noire

- Etat des connaissances de répartition du gobie à tâche noire dans le sud-est – bassin de la Durance (2019)



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

15



Avantages de la méthode ADNe

- Méthode **standardisée et reproductible**
- Très **bonne détectabilité** (dont les espèces rares et cryptiques) dans des **milieux « difficiles »**
- Facilité de mise en œuvre sur le terrain
- Gain de temps et diminution des coûts d'inventaire
- Pas d'introduction de pathogènes ou d'EEE
- Non invasif sur le milieu
- Plusieurs groupes taxonomiques à partir d'1 échantillon
- Un contrôle de qualité poussé

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

16



Limites de la méthode ADNe

- Ne permet pas d'estimer la **taille d'une population**
- Pas d'**informations sur les individus** (taille, âge, sexe, stade de développement, etc.)
- Qualité de l'identification dépendante de la qualité et de l'exhaustivité des **banques de données génétiques**
- Ne peut pas différencier les hybrides
- Délai d'analyse** (pas d'information immédiate)
- Faux positifs parfois difficiles à expliquer/écarter

L'ADN environnemental est un **outil complémentaire** aux autres méthodes d'inventaire!

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

17

Perspectives

- PNA Apron du Rhône 2020-2030
 - nouveaux prélèvements prévus pour affiner la répartition (Loue, Rhône, Ain, Verdon,...)
- Etude des EEE 2019 (2020)
 - travaux méthodologiques sur grands cours d'eau
 - études gobie (en BFC et PACA)
- Etude des EEE en Rhône Alpes 2020
 - réflexion préalable à la mise en place d'un réseau de surveillance/suivi des EEE par ADN environnemental



MERCI POUR VOTRE ATTENTION

Michaël Cagnant, OFB – michael.cagnant@ofb.gouv.fr
Jonathan Grondin, SPYGEN – jonathan.grondin@spygen.com



L'ADNe pour comprendre les relations prédateur-proies-habitat : le cas de l'Apron du Rhône

Vincent DUBUT, UMR IMBE, Aix Marseille Université



L'ADNe POUR COMPRENDRE LES RELATIONS PRÉDATEUR-PROIES-HABITAT : LE CAS DE L'APRON DU RHÔNE

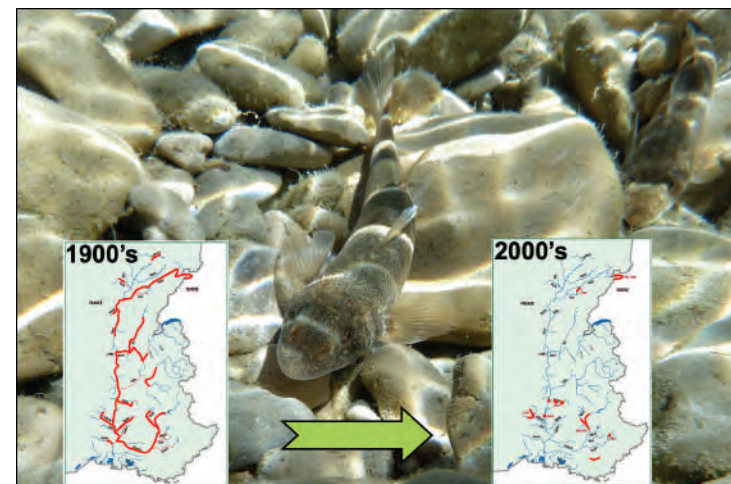
Vincent DUBUT, IMBE, Aix Marseille Université

Gaït ARCHAMBAUD, RECOVER, INRAe



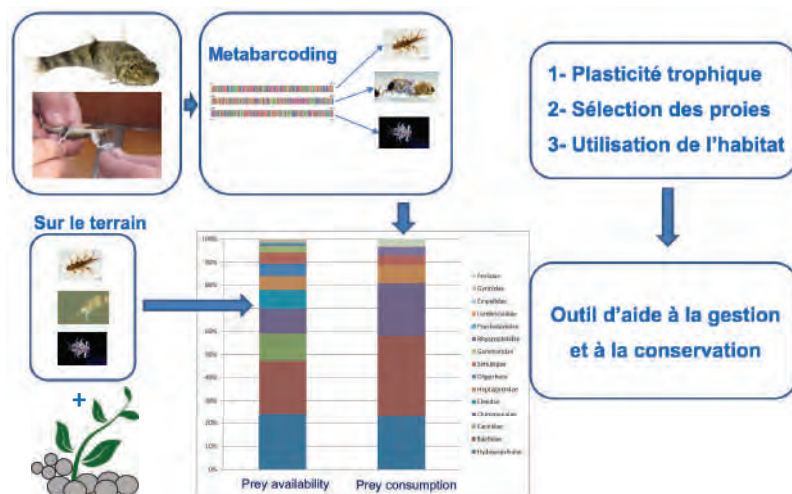
Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

L'apron du Rhône



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Objectifs de l'étude: Action 8 du PNA apron (2012-2016)



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Les défis du métabarcoding alimentaire

- ADN dégradé
- Couverture taxonomique
- Elimination des artéfacts :
 - Erreur de séquençage
 - Erreur de PCR
 - « Mis-tagging »
 - Contaminations
- Identification taxonomique des séquences

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Les défis du métabarcoding alimentaire

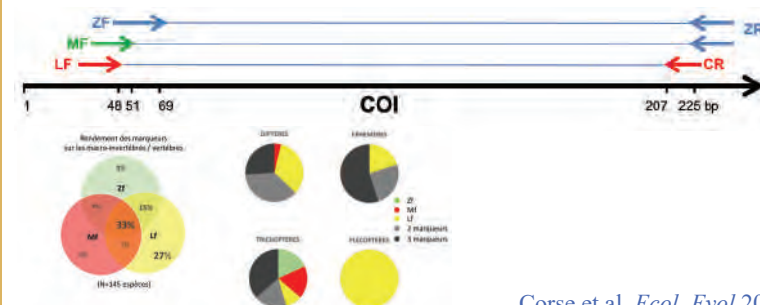
- ADN dégradé (**faux négatifs**)
- Couverture taxonomique (**faux négatifs**)
- Elimination des artéfacts : (**faux positifs**)
 - Erreur de séquençage
 - Erreur de PCR
 - « Mis-tagging »
 - Contaminations
- Identification taxonomique des séquences (**faux négatifs et faux positifs**)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Limiter les faux négatifs

- ADN dégradé
- Couverture taxonomique

➤ 3 couples d'amorces (enrichissement par PCR) :



Corse et al. *Ecol. Evol* 2019

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Limiter les faux positifs

- Eliminations des artéfacts

➤ Design expérimental:

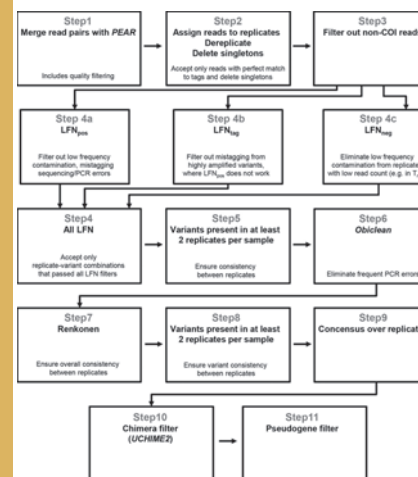
- Locaux adaptés et dédiés (contaminations)
- Echantillons témoins:
 - Témoins négatifs
 - Témoins positifs (« mock samples »)
 - Echantillons « exogènes »
- Réplicas techniques

➤ Filtrage des données > pipeline bioinformatique

- Elimination du LFN (Low Frequency Noise; De Barba et al. 2014)
- Contrôle du mis-tagging
- Elimination des variants non-répétables
- Contrôle des chimères et des pseudogènes

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Filtrage et validation des données le pipeline bioinformatique

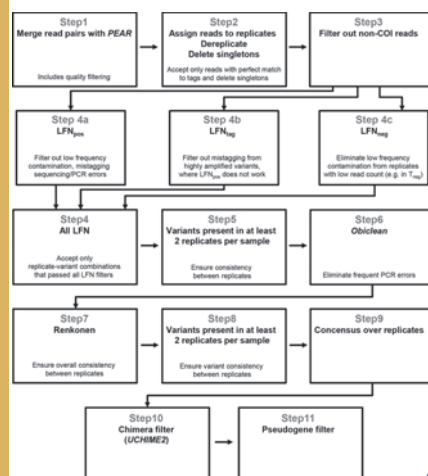


➤ Filtrage basé sur des seuils non-arbitraires, déterminés à partir du jeu de données : Témoins et Réplicas techniques

Corse et al. *Mol. Ecol. Resources* 2017

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Filtrage et validation des données le pipeline bioinformatique



➤ Filtrage basé sur des seuils non-arbitraires, déterminés à partir du jeu de données :
Témoins et Répliques techniques

➤ 0,3% des variants retenus
➤ 70% des reads assignés à un échantillon
➤ Filtrage stringent
➤ JDD robuste

Corse et al. *Mol. Ecol. Resources* 2017

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

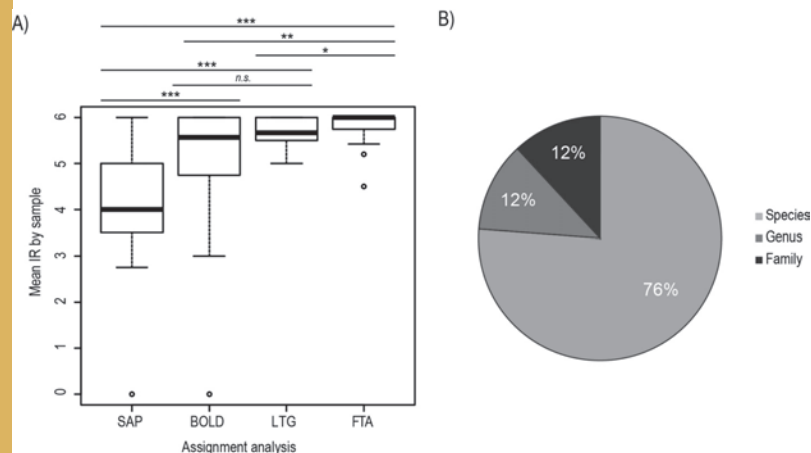
Assignation taxonomique

- 3 approches différents:
 - SAP (Munch et al. 2008)
 - LTG (Corse et al. 2017)
 - BOLD
- Si incongruence :
 - Reconstruction phylogénétique
 - Biogéographie
 - >> FTA

Corse et al. *Mol. Ecol. Resources* 2017

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Assignation taxonomique



Corse et al. *Mol. Ecol. Resources* 2017

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Des enjeux méthodologiques... du laboratoire jusqu'à l'ordinateur

- **Design expérimental**
 - Locaux adaptés et dédiés
 - Choix des amorces
 - Échantillons témoins
 - Répliques techniques
- **Filtrage des données** > pipeline bioinformatique
 - Élimination du bruit et des artéfacts
- **Identification taxonomique**
 - Assignation à l'espèce des variants

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Des enjeux méthodologiques... du laboratoire jusqu'à l'ordinateur

➤ Design expérimental

- Locaux adaptés et dédiés
- Choix des amorces
- Echantillons témoins *
- Réplicas techniques *

➤ Filtrage des données > pipeline bioinformatique

- Elimination du bruit et des artéfacts *

➤ Identification taxonomique

- Assignation à l'espèce des variants

* Contrôle qualité / reproductibilité

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

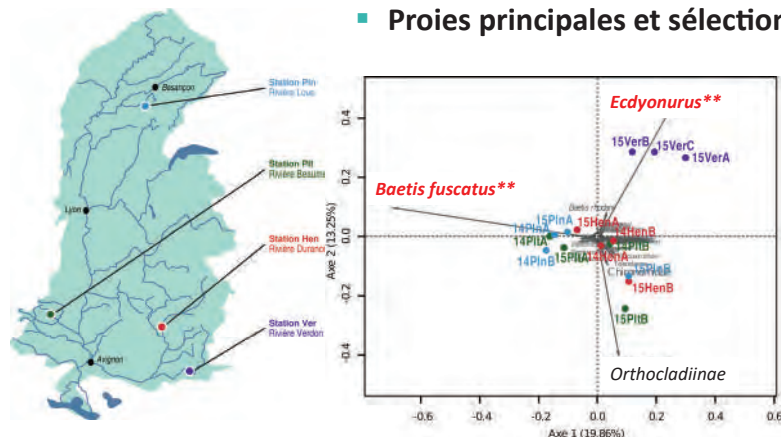
Et l'apron dans tout ça ?



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Et l'apron dans tout ça ?

■ Proies principales et sélection



Baetis fuscatus : 40 à 60% du régime alimentaire

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Utilisation de l'habitat

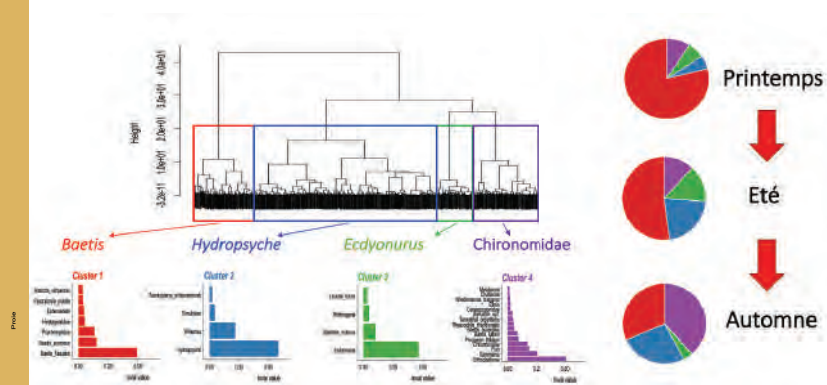


Caractéristiques des proies de l'apron:

- Rhéophiles
- Associées à substrat grossier
- Epibenthiques

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

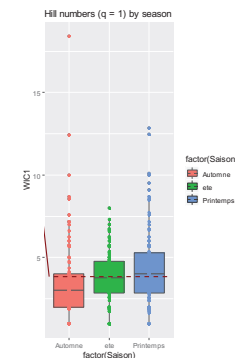
Variations saisonnières



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

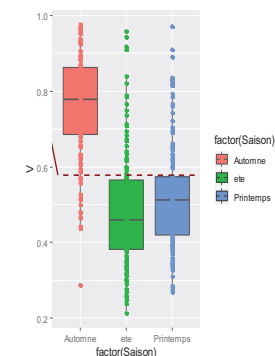
Variations saisonnières

Largeur de la niche trophique



➤ Diminue en Automne

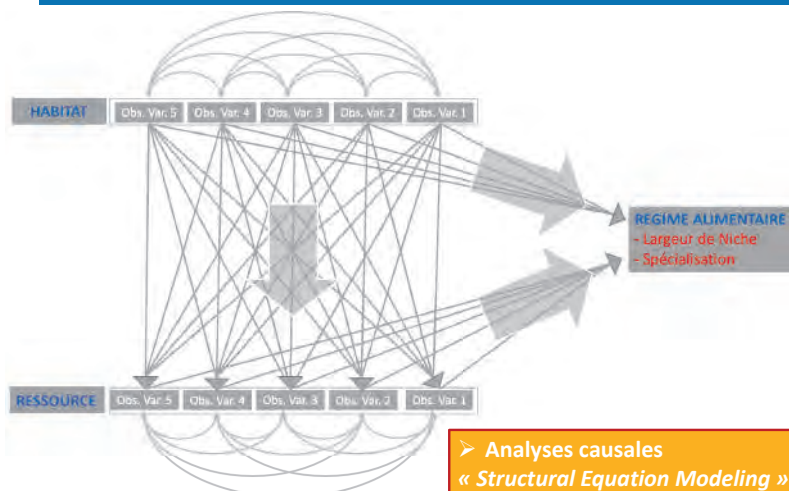
Spécialisation individuelle



➤ Augmente en Automne

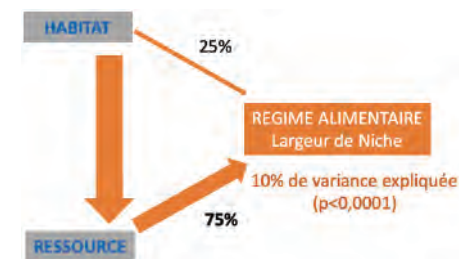
Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Comprendre les variations observées: modélisation



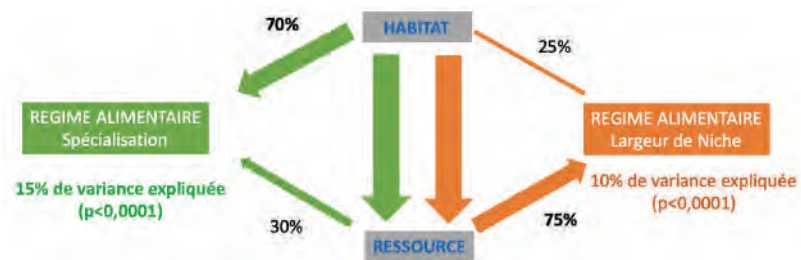
Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Comprendre les variations observées: modélisation



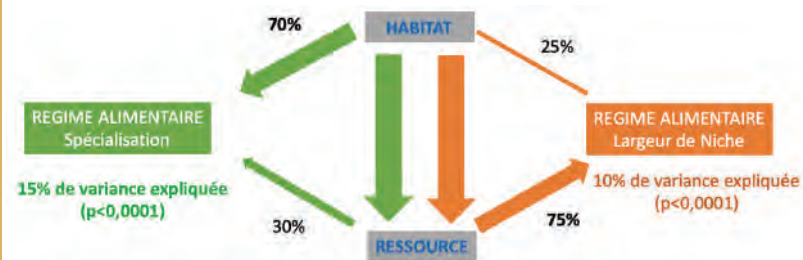
Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Comprendre les variations observées: modélisation



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Comprendre les variations observées: modélisation



➤ L'habitat impacte davantage la spécialisation que la ressource!!

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Remerciements



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

L'ADNe pour la connaissance des peuplements de poissons : intérêts et limites en fonctions des objectifs et types de milieux

Mathieu ROCLE, CNR

Nicolas ROSET, Office Français de la Biodiversité (OFB)

RÉSUMÉ

Après quelques années de mise au point (2010-2015), l'ADNe est de plus en plus utilisée dans l'étude ou le suivi de la faune piscicole notamment en milieux lotiques, souvent en complément des méthodes d'échantillonnage « traditionnelles ».

En 2016, la CNR a mené une vaste étude des peuplements de poissons du Rhône, du Léman à la Méditerranée, à partir de l'ADNe sur une 100 aine de sites. Entre 2015 et 2019, l'OFB a mis en œuvre la méthode sur un certain nombre de stations en région Auvergne-Rhône-Alpes.

La présentation a pour objectif de partager le retour d'expérience sur ces opérations qui ont permis à la fois d'améliorer les protocoles de prélèvement et de contribuer à définir le domaine d'application de l'ADNe pour l'étude des peuplements de poissons. Sont notamment discutées les performances et limites de la méthode, par comparaisons aux résultats de la pêche électrique dans différents contextes (types de cours d'eau, objectifs...).

Les résultats ont montré que l'ADNe présentait un grand intérêt pour la détection d'espèces rares, en particulier dans les grands milieux difficiles à échantillonner à partir des méthodes traditionnelles, avec un très bon rapport coût (financier ou humain) / efficacité ; ce qui ouvre de nombreuses perspectives dans les études de la biodiversité aquatique ainsi que dans les suivis de reconquête des milieux par les espèces migratrices. L'échelle d'étude plus large (tronçon) présente également certains avantages, mais aussi quelques inconvénients. Enfin la proportion de séquences d'ADNe constitue bien une évaluation semi-quantitative pertinente, reflétant certaines caractéristiques « réelles » du peuplement ; sans que l'on puisse toutefois établir de correspondance statistique avec les méthodes traditionnelles (problème d'échelle et variations inter-spécifiques...)

Néanmoins l'interprétation des résultats requière une certaine expertise et de nombreux aspects restent améliorables, des référentiels génétiques aux outils de prélèvements. Certaines études sont également nécessaires pour affiner encore l'interprétation des résultats (distance de détection, effort d'échantillonnage, variations inter-annuelles ou inter-opérateurs...) sur différentes espèces et différents milieux (lentiques...).



L'ADNe POUR LA CONNAISSANCE DES PEUPELEMENTS DE POISSONS : INTÉRÊTS ET LIMITES EN FONCTIONS DES OBJECTIFS ET TYPES DE MILIEUX



Mathieu ROCLE, Compagnie Nationale du Rhône
Nicolas ROSET, Office Français de la Biodiversité

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

L'ADNe pour inventorier les espèces piscicoles

1. Expérimentation CNR-SPYGEN en 2016. Test de l'ADNe en milieu courant à large échelle
→ 100^{aine} de sites de prélèvements sur le Rhône et ses affluents entre le lac de Genève et la Méditerranée en 20 jours
2. Différentes études menées par l'OFB en région AuRA pour **accompagner le développement** et **préciser l'intérêt et les limites** de la méthode dans différents contextes et objectifs
→ 15^{aine} de stations étudiées par ADNe et pêches électriques entre 2014 et 2019

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

1. Rhône : Méthodologie de prélèvement

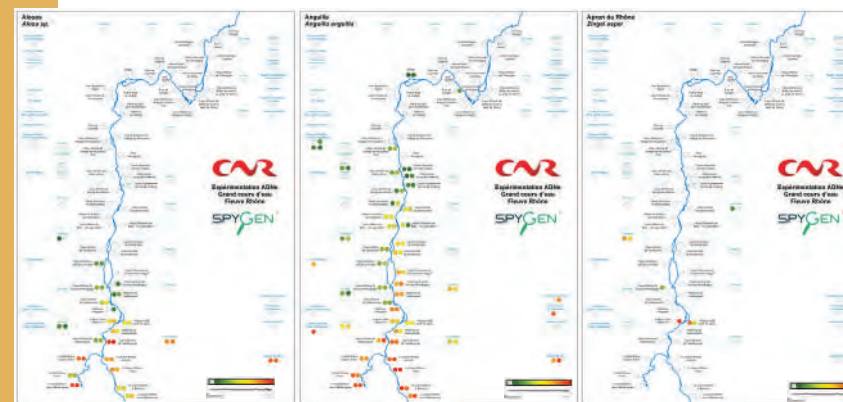


- Utilisation de 2 vigiboats par site avec capsule de filtration tangentielle (0.45µm)
- Depuis les ponts ou depuis un bateau moteur
- Différents sites testés (canaux, Rhône, affluents, îlons)



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

1. Rhône : Résultats bruts



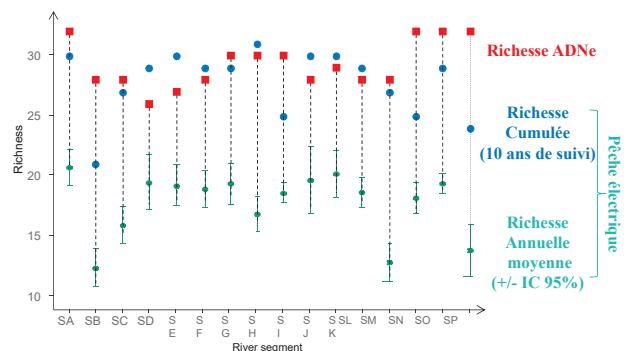
- Alose feinte
- Anguille
- Apron

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

1. Rhône : Comparaison avec le pêches électriques

- Abondance relative (valeur moyenne) différenciée par méthode.

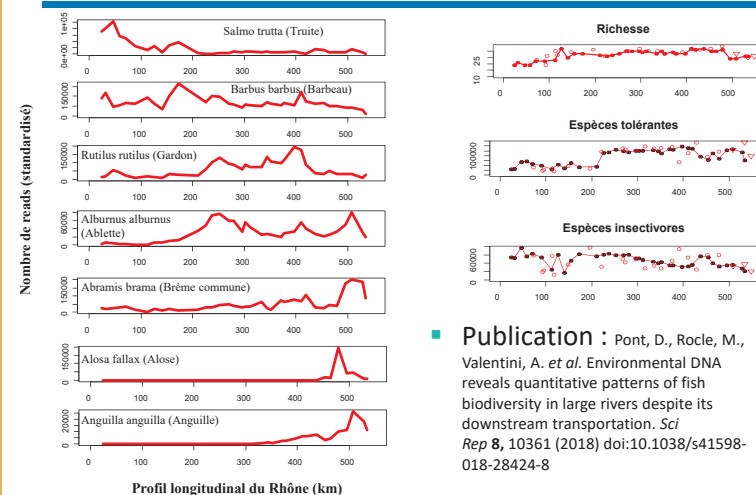
Species	Electrofishing	eDNA	Sign test
Bleak	27.63%	6.04%	p<0.001
Chub	18.63%	6.20%	p<0.05
Barbel	3.34%	12.92%	p<0.001
Ruffe	0.17%	6.35%	p<0.01
Stone Loach	0.43%	3.82%	p<0.05
Minnnow	0.08%	1.21%	p<0.05
Freshw. Blenny	0.07%	1%	p<0.05
Zander	0.16%	1.08%	p<0.01
Sculpin	0.07%	0.98%	p<0.01
Carp	0.16%	0.73%	p<0.05



- 83-100% des espèces détectées par ADNe.
- Dont 2 espèces rares et des faux positifs (step, piscicultures...).

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

1. Rhône : comparaison des structures longitudinales



- Publication : Pont, D., Rocle, M., Valentini, A. et al. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Sci Rep* 8, 10361 (2018) doi:10.1038/s41598-018-28424-8

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

1. Rhône : limites et plus-values de ce projet

- Absence d'information sur les tailles et les âges au sein des populations piscioles
- Question des distances de détection en fonction de l'abondance de l'espèce (y compris les apports des affluents)
- Question de variabilité génétique sur certaines espèces
- Performance globale de la méthode dans un milieu courant avec une diminution du temps vis-à-vis de la quantification de la structure longitudinale du peuplement piscicole
- Adapté à l'échelle du fleuve Rhône et à son débit
- Adapté au suivi à grande échelle et à la reconquête des axes de migration

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : matériel et méthode



- Prélèvement par Vigibot ou Vampir avec capsule de filtration (0.45µm)
- Depuis les ponts ou en accès direct dans l'eau
- Généralement 2 filtrations de 30 min. (pseudo-réplicas)
- Analyses réalisées par SPYGEN selon des procédures standardisées

Valentini, A., P. Taberlet, et al. (2016). "Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding." *Molecular Ecology* 25(4): 929-942.

Question : comment analyser et interpréter les résultats de suivi ADNe ?
Quels apports / limites par rapport à la pêche électrique

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : sites d'étude

- Petits et moyen cours d'eau** - pêches complètes à plusieurs passages : **Tier** (cf. étude Aiguebelette-Tiers-73), **Veyle** (suivi restauration hydromorphologique-01) ; **Séran** (suivi de la lote-01 – pêche électrique plus ancienne)
- Moyens à grands cours d'eau** - pêches partielles par points à pieds : **Ain à St Maurice** (station RHP-RCS-RRP - présence d'OBR mal évaluée par PE) ; **Drôme à Chabrillan** et **Livron** (stations RCS-RRP - présence potentielle d'APR)
- Grands à très grands cours d'eau** - pêches par point mixte ou en bateau : **Loire à Briennon** (RCS – présence de CDR, *Lampetra*...) ; **Saône à Lyon** (RCS + surveillance EEE)



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : zoom sur quelques résultats

■ Pêches complètes à deux passages

- Veyle à Buellas



- ✓ Tronçon sinueux recréer en 2010 en dérivation de la gravière de Saint-Denis-le-Bourg (01)
- ✓ Pêches électriques d'inventaire en 2018 (2015, 2012, 2010...) sur station restaurée aval (3 stations plus en amont et 1 en aval)
- ✓ Prélèvement ADN : octobre 2018 – 15 et 17 min (colmatage rapide)

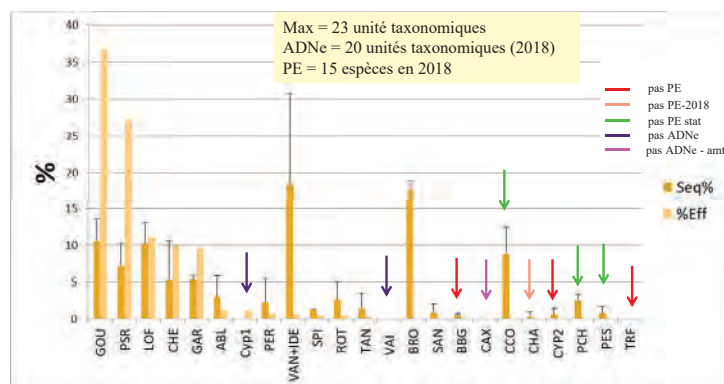


Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : zoom sur quelques résultats

■ Pêches complètes à deux passages

- Veyle à Buellas



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : zoom sur quelques résultats

■ Pêches complètes à deux passages

- Veyle à Buellas

Questions :

- ✓ ADN :
 - absence VAI (récurrent) et CYP1 (BLN très abondant) ;
 - pas CAX capturé (PE) sur la station juste en amont
- ✓ PE :
 - absence de CYP2, TRF (erratique, pisciculture), BBG : présence possible mais anecdotique
 - absence de CHA : mais capturées certaines années sur station témoin amont (qqes 100aines m)
- ✓ Pb taxonomique (CYP1, vandoises,...)

Conclusions :

- ✓ Peuplement principal bien décrit par les deux méthodes mais faible cohérence des %
- ✓ Des limites à chaque méthode, essentiellement sur espèces faiblement représentées
- ✓ Interrogation sur absence de détection VAI et CYP1
- ✓ Influence du temps de filtration (colmatage)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : zoom sur quelques résultats

- Pêches partielles par point à pieds
 - Ain à Saint-Maurice-de-Gourdans



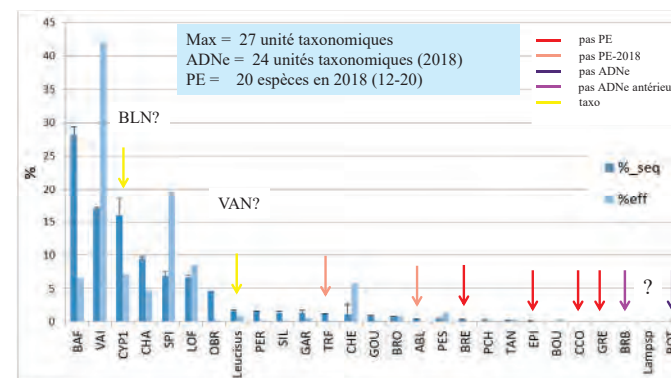
- ✓ Pêches électriques annuelles (RHP) : 2018 (2017, 2016, 2015...) en juin-juillet
- ✓ Prélèvement ADNe : octobre 2018 ; 2 fois 30 min.



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : zoom sur quelques résultats

- Pêches partielles par point à pieds
 - Ain à Saint-Maurice-de-Gourdans



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : zoom sur quelques résultats

- Pêches partielles par point à pieds
 - Ain à Saint-Maurice-de-Gourdans

Questions :

- ✓ ADNe :
 - absence ROT et BRB (capturé certaines années) ;
- ✓ PE :
 - absence de EPI, CCO, GRE (présence possible-probable) ;
 - absence d'ABL et TRF (mais capturées certaines années)
- ✓ Questions taxonomique : CYP1 (uniquement BLN?), *Leuciscus* (uniquement vandoises?)

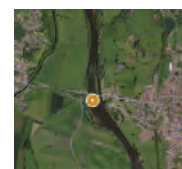
Conclusions :

- ✓ Peuplement principal bien décrit par les deux méthodes mais faible cohérence des %
- ✓ Des limites à chaque méthode portant essentiellement sur des espèces faiblement représentées
- ✓ Interrogation sur absence de détection ROT (hybride?)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : zoom sur quelques résultats

- Pêches partielles par point en bateau/mixte
 - Loire à Briennon



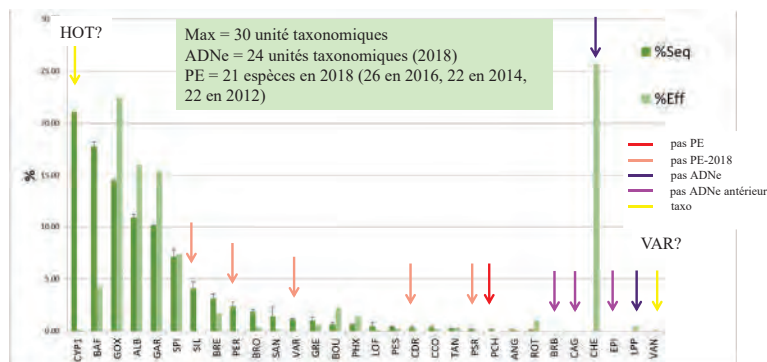
- ✓ Pêches électriques tous les deux ans (RCS) en 2018 (2016, 2014, 2012...) en octobre
- ✓ Prélèvement ADNe : octobre 2018 – 20 et 25 min (colmatage)



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : zoom sur quelques résultats

- Pêches partielles par point en bateau/mixte
 - Loire à Briennon



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : zoom sur quelques résultats

- Pêches partielles par point en bateau/mixte
 - Loire à Briennon

Questions :

- ✓ ADNe :
 - absence CHE très abondant et LPP (rare) ;
 - pic CYP1 surestimé ? (uniquement HOT en faible effectif / PE) ;
 - absence de CAG et BRB et EPI capturées certaines années (peu de chances qu'elles aient disparues du secteur)
- ✓ PE :
 - absence de SIL, PSR, PCH : présence quasi-certaine (interrogation PCH?)
 - absence de PER, VAR, CDR : mais capturées certaines années (faible abondance pour CDR)
- ✓ Questions taxonomique (CYP1, vandoises,...)

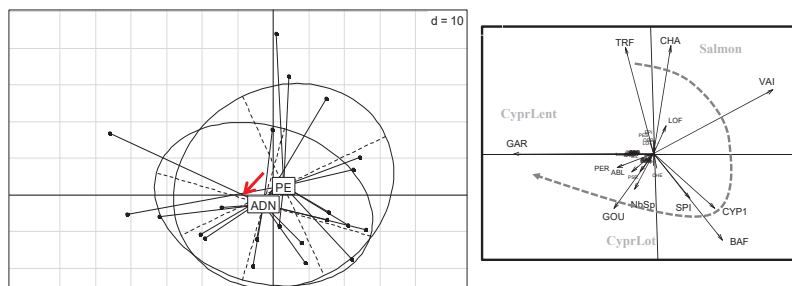
Conclusions :

- ✓ Outre les différences de composition : cohérence globale, y compris entre proportions (sauf BAF et CYP1)
- ✓ Des limites à chaque méthode portant essentiellement sur des espèces faiblement représentées (sauf pb CHE en ADNe - récurrent dans les études de 2018 cf Ain, Drôme...)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

2. Etudes AuRA : analyse globale

- Typologie des stations selon les % par espèce (ACPC)



- ✓ Correspondance globale dans la typologie donnée par les deux méthodes
- ✓ Mais tendance de l'ADNe à décrire un peuplement plus « aval » avec des cas extrêmes (cf. Tier amont) -> attention aux effets de confluence et détections sans présence « physique »

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Conclusions - Perspectives

- Fort potentiel de l'ADNe dans différents contextes : P/A, structure peuplement (semi-quantitatif), sp rares ...
- Applications généralisables dans différentes études naturalistes, écologiques, notamment étude préliminaire d'un territoire
- Une nouvelle échelle de perception (tronçon) à maîtriser
- Des résultats qui doivent être expertisés
- Des performances variables selon espèces et les conditions du milieu (types cours d'eau, colmatage...)
- Des développements scientifiques et techniques à poursuivre (référentiel génétique, distance de détection, seuils de présence, signification du nb de seq., effort et mode de prélèvement en milieu lentique...)
- Possibilité d'améliorer encore les outils de prélèvements (ergonomie, mesure volume...)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

MERCI POUR VOTRE ATTENTION !

Ce que révèle l'ADNe dans les carottes sédimentaires des lacs

David ETIENNE, UMR CARTEL, INRAE

RÉSUMÉ

Les sédiments accumulés dans la zone profonde des lacs sont des lieux de concentration de l'ADN de communautés benthique et pélagique, mais également des espèces occupant le bassin versant lacustre. En s'accumulant avec le temps, les sédiments lacustres constituent ainsi de véritables archives écologiques permettant de reconstituer, via l'analyse de l'ADN sédimentaire (sedDNA), des dynamiques d'espèces, de population et de communautés, d'établir des modifications d'état fonctionnel des systèmes et de reconstituer leurs trajectoires écologiques sur des échelles temporelles décennales, séculaires ou millénaires. Ces archives lacustres offrent également l'opportunité de prolonger rétrospectivement des données d'inventorisation actuelles des espèces sur des systèmes ayant déjà fait l'objet, ou pas, de suivis réguliers.

Cette présentation aura donc pour objectif de vous illustrer, via plusieurs exemples de travaux récents, l'intérêt des approches paléo-limnologiques basées sur l'étude de l'ADN archivé dans les carottes sédimentaires lacustres.



CE QUE RÉVÈLE L'ADNE DANS LES CAROTTES SÉDIMENTAIRES DES LACS

David ETIENNE

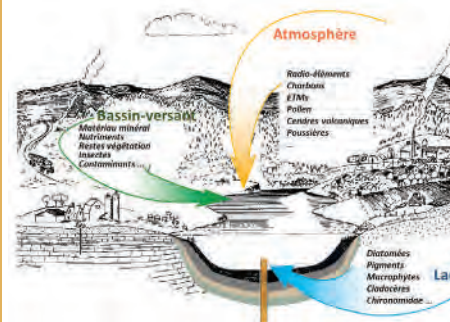
Isabelle Domaizon, Eric Capo, François Keck, Cécile Chardon, Laurent Millet



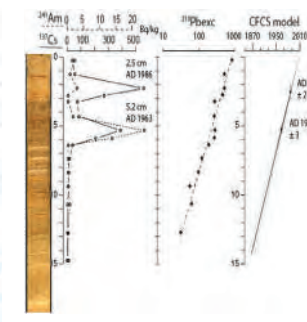
Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Les archives lacustres : intégration spatiale, temporelle et fonctionnelle

Intégration spatiale



Intégration temporelle



Reconstitution (diversité, trajectoire fonctionnelle) des écosystèmes

Etat initial ancien

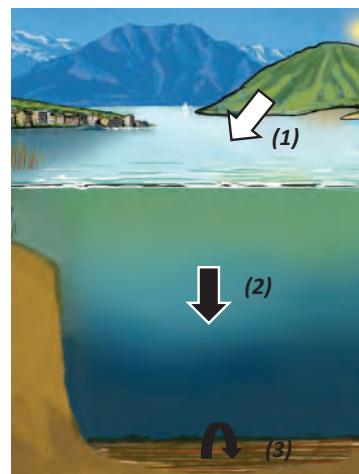
Etat actuel

Facteurs naturels

Facteurs anthropiques

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe archivés dans les sédiments



- Mélange d'ADNe de bactéries, archées, eucaryotes provenant de différentes sources :

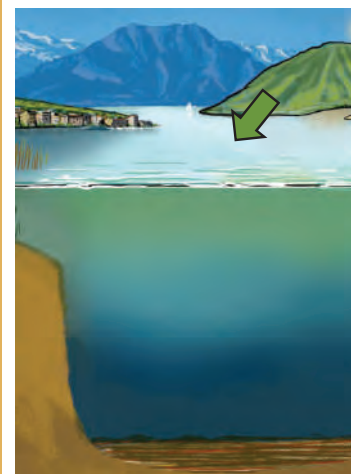
(1) sur le bassin versant

(2) dans la colonne d'eau

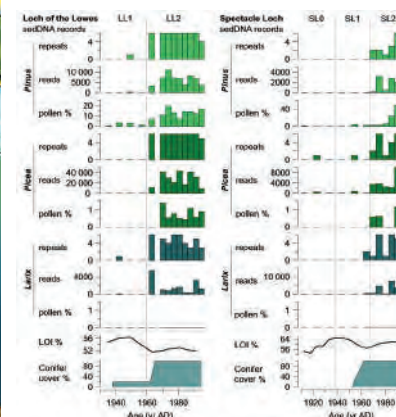
(3) dans les sédiments lacustres

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe archivés dans les sédiments



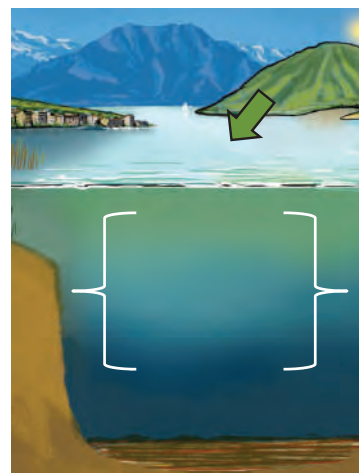
Processus de transfert



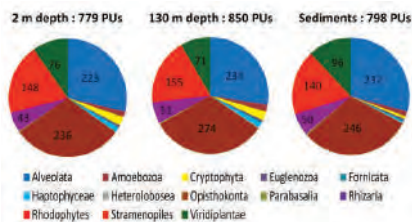
Sjögren et al. (2017) New Phytologist

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe archivés dans les sédiments



- Processus de transfert, de sédimentation

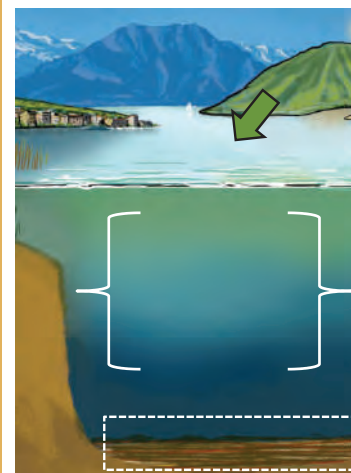


- Sédiments récents vs colonne d'eau > 70% de la diversité micro-eucaryote (colonne d'eau) retrouvée

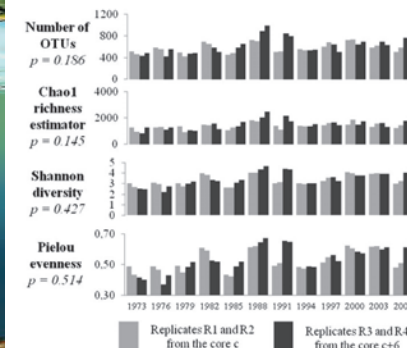
Capo et al. (2015) Microbial Ecology

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe archivés dans les sédiments



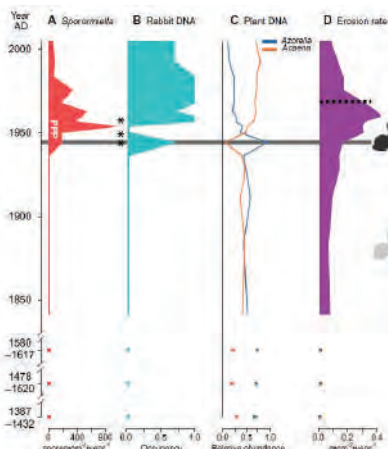
- Processus de transfert, de sédimentation et d'archivage (diagenèse précoce, conservation)



Capo et al. (2017) JOPL

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe : Reconstitution du bassin versant



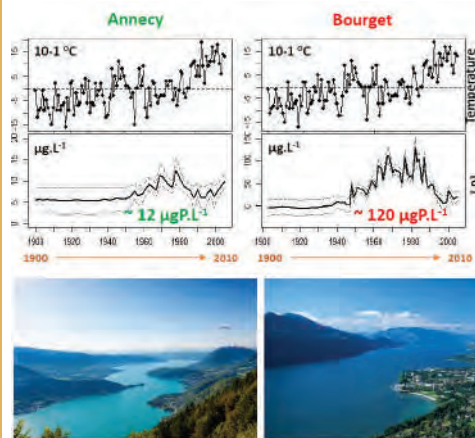
- Impact d'une espèce invasive (ex. du lapin sur les îles Kerguelen) sur la dynamique des sols et la végétation locales

- ADNe dans les sédiments lacustres, permet de travailler à une échelle spatiale limitée au bassin versant d'intérêt

Ficetola et al., 2018 (Science Advances)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

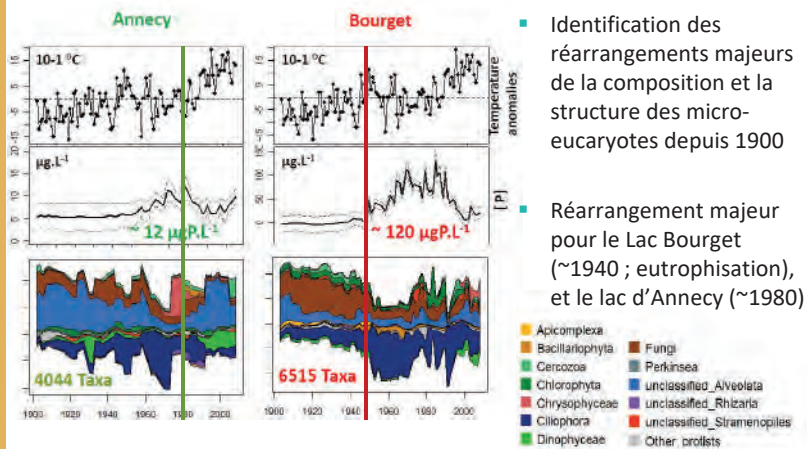
ADNe : Dynamique trophique des lacs



- Eutrophication et réchauffement récent, deux « stress » environnementaux majeurs pour les lacs
- Modification des processus écologiques qui structurent les communautés aquatiques
- Quelles réponses des micro-eucaryotes à ces facteurs?

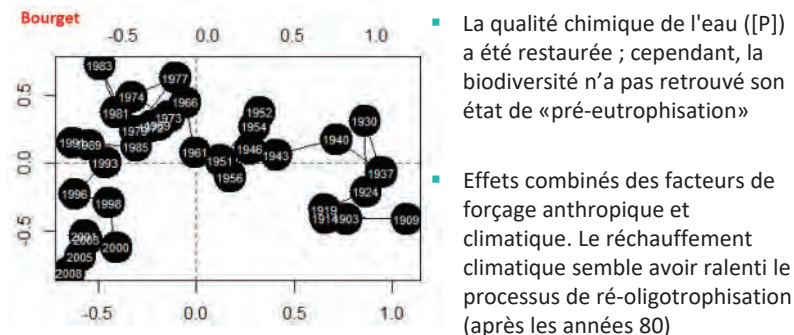
Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe : Dynamique trophique des lacs



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe : Dynamique trophique des lacs



Evolution de la Beta diversité sur les 6515 taxa inventoriés (NMDS - Distance Bray Curtis)

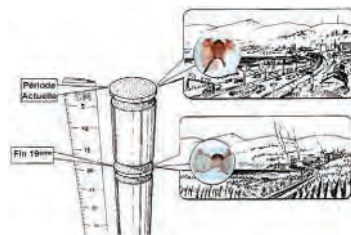
Capo et al., 2017 (Environ Microbiol)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe : approche Top-Bottom



50 lacs prélevés avec différentes morphologies et typologies trophiques



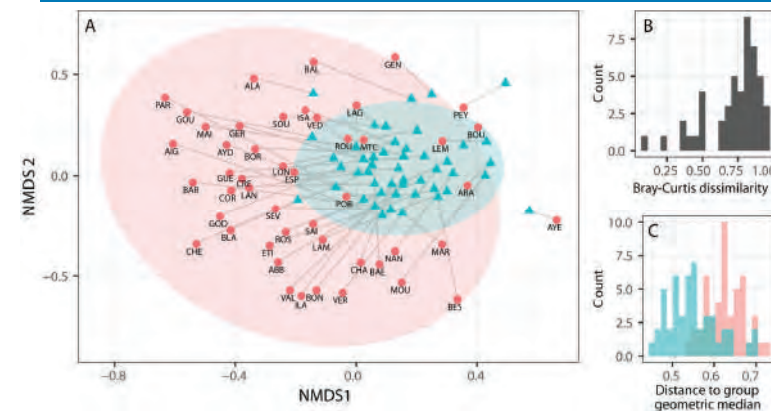
Période actuelle vs période de « référence ». Estimation de l'ampleur des changements de la diversité biologique ?

Comparaison avec d'autres avec proxies (chironomes, pigments, ...)

Keck et al., soumis (PNAS)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe : approche Top-Bottom

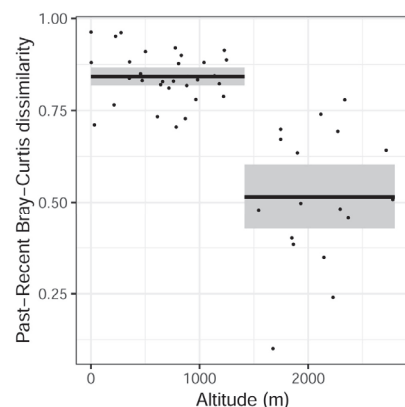


Homogénéisation des assemblages de micro-eucaryotes au cours de la période « récente »

Keck et al., soumis (PNAS)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADNe : approche Top-Bottom



- Plus forte ampleur dans la modification de la diversité micro-eucaryotique pour les lacs de « basse altitude »
- Grande variabilité de l'évolution de cette diversité pour les systèmes lacustres d'altitude
- Travail en cours pour compléter le jeu de données avec 30 lacs d'altitude dans les Alpes

Keck et al., soumis (PNAS)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Conclusions : ADNe dans les sédiments

- Grand potentiel pour étudier la **dynamique des espèces - populations - communautés - réseaux écologiques - fonctions** des bactéries, archées et eucaryotes sur des périodes **temporelles millénaires, centennales, décennales ou actuelles**
- Mais encore des questions concernant la préservation de l'ADN, la représentativité de l'échantillon ADNe, la taphonomie suivant les lacs, dissocier chez les archées et les bactéries communautés vivantes/actives/archivées

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR



MERCI DE VOTRE ATTENTION !



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Évaluer la qualité écologique des milieux aquatiques avec l'ADN des diatomées

Valentin VASSELON, Office Français de la Biodiversité (OFB)

RÉSUMÉ

La qualité des cours d'eau est en partie évaluée chaque année grâce à certains groupes biologiques, comme les diatomées, qui sont révélateurs de leur état écologique. Face à l'augmentation du nombre de suivis environnementaux et à la complexité d'étude de ces micro-organismes, il est nécessaire de développer de nouveaux outils de bioindication plus rapides et plus fiables.

Récemment, une nouvelle approche basée sur l'ADN a été développée pour permettre d'identifier les espèces sur la base de leur variabilité génétique en utilisant de courtes séquences ADN (ou barcodes ADN). Combinée aux technologies de séquençage à haut débit, cette approche moléculaire appelée métabarcoding permet d'identifier l'ensemble des espèces présentes au sein d'un échantillon environnemental et de traiter plusieurs centaines d'échantillons en parallèle.

Les développements méthodologiques réalisés ces dernières années sur le métabarcoding des diatomées permettent de produire des inventaires qualitatifs et quantitatifs suffisamment robustes pour être utilisés en bioindication. Les tests réalisés à l'échelle d'un grand nombre de cours d'eau français confirment qu'une application en routine serait envisageable, mais posent maintenant la question de la place de ces approches innovantes dans la bioindication actuelle.



ÉVALUER LA QUALITÉ ÉCOLOGIQUE DES MILIEUX AQUATIQUES AVEC L'ADN DES DIATOMÉES

Valentin Vasselon

OFB - pôle R&D ECLA

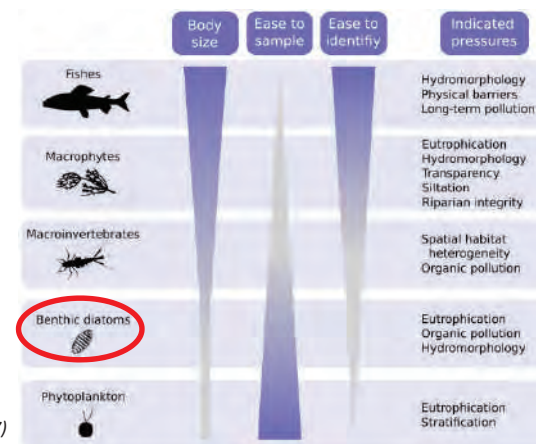
Frederic Rimet, Agnès Bouchez, Kálmán Tapolczai, François Keck, Sinziana Rivera, Olivier Monnier



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Bioindication

- Les organismes biologiques sont représentatifs de l'état de santé du milieu



(Keck et al. 2017)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

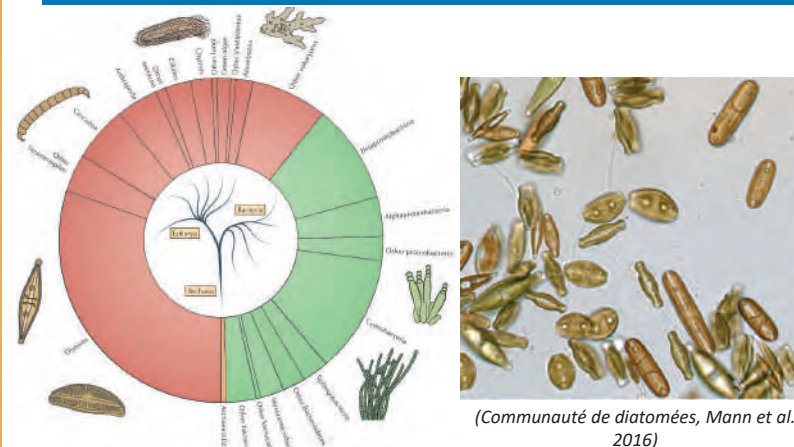
Diatomées Benthiques Contexte environnemental



© Kálmán Tapolczai

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

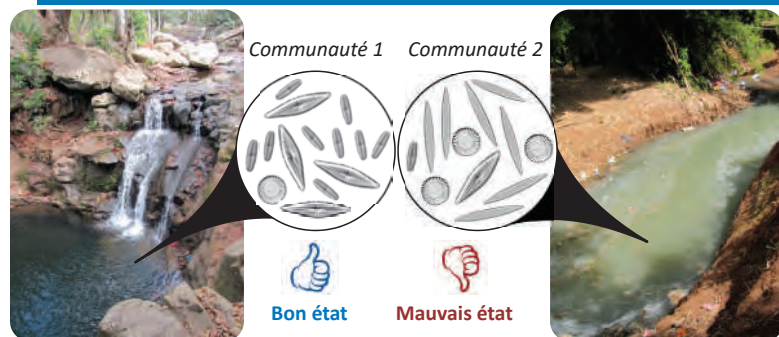
Diatomées Benthiques Contexte environnemental



(Biodiversité des biofilms aquatiques, Battin et al. 2016)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

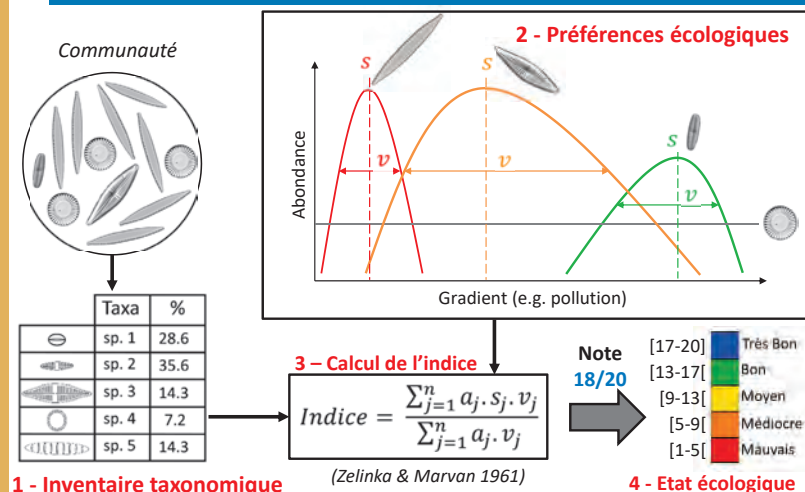
Diatomées Benthiques Bioindication



- Organismes retrouvés dans les milieux aquatiques
- Grande diversité d'espèces ($\approx 10^5$, Mann & Vanormelingen 2013)
- Espèces sensibles aux modifications physiques et chimiques du milieu
- La communauté est représentative de l'état écologique du cours d'eau

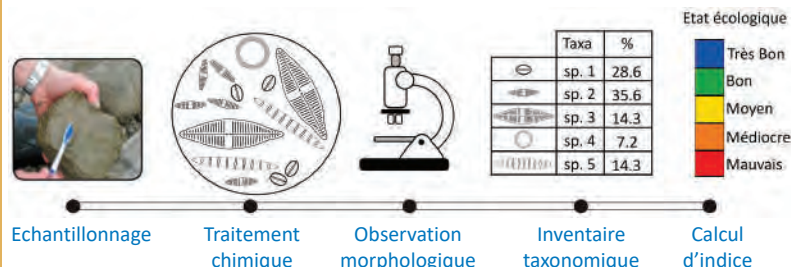
Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Calcul d'indice diatomique et état écologique



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

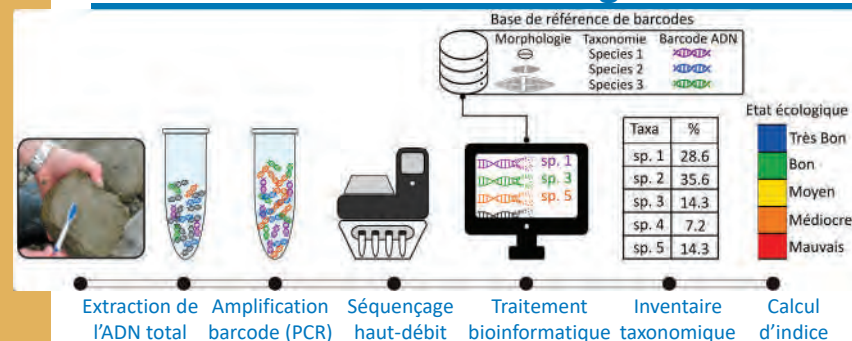
Approche morphologique Microscopie



- Classification des espèces évolue (Mann et al. 2016, Adl et al. 2019)
- Nécessite une forte expertise taxonomique = besoin d'experts
- Intercalibration complexe (e.g. Werner et al. 2016)
- Temps et coûts d'analyses élevés (Stein et al. 2014)
- Augmentation importante du nombre d'échantillons à analyser

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

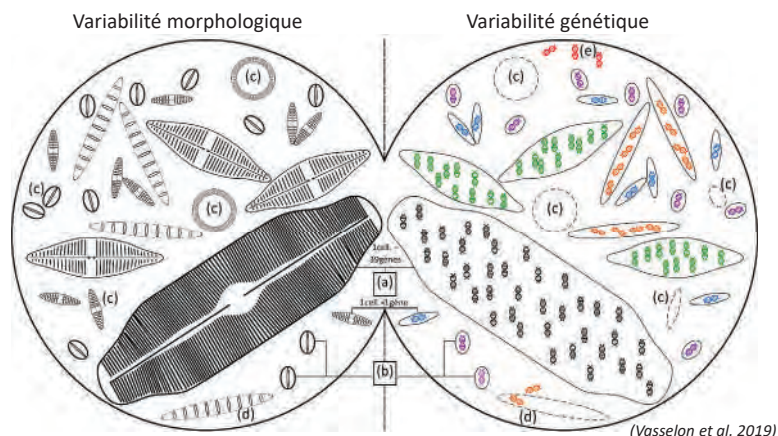
Approche moléculaire Métabarcoding



- Résolution taxonomique plus fine (diversité cryptique, variant génétique)
- Permet d'analyser en parallèle plusieurs centaines d'échantillons
- Plus rapide, de moins en moins coûteux, intercalibration plus simple
- Bonne évaluation de l'état écologique

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Deux approches différentes avec leurs propres biais



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Biais de quantification en Métabarcoding

- Communauté biologique ciblée ?
- Organismes uni, pluri-cellulaires ?
- Caractéristiques morphologiques ? (e.g. densité cellulaire des tissus)
- Cycle de vie ? (e.g. stades de développements, mode de dispersion, âge)
- Reproduction ? (e.g. sexuée, asexuée, période)
- Compartiment génétique ciblé ? (e.g. mitochondrie, génome)
- Marqueur génétique ? (e.g. 18S, rbcL, ITS, COI... nombre de copies)

Biais
biologiques

- Echantillon représentatif ? (e.g. type d'échantillon)
- Forme de l'ADN ciblé ? (e.g. ADN communautaire, ADN libre)
- Base de référence ? (e.g. complétion, curation)
- Protocoles d'échantillonnage et de laboratoire ?
- Analyse et validation des données ?

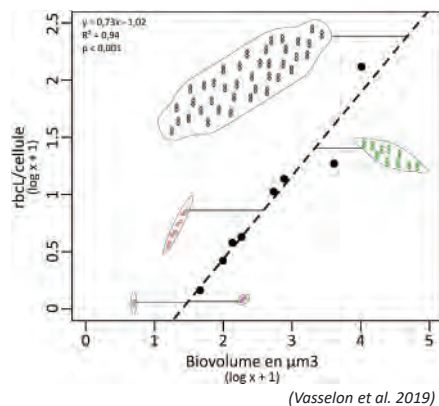
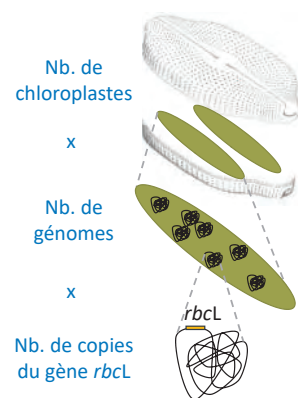
Biais
méthodologiques

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Quantification relative des diatomées en Métabarcoding

- Besoin d'estimer le nombre de copie du gène *rbcl* par cellule

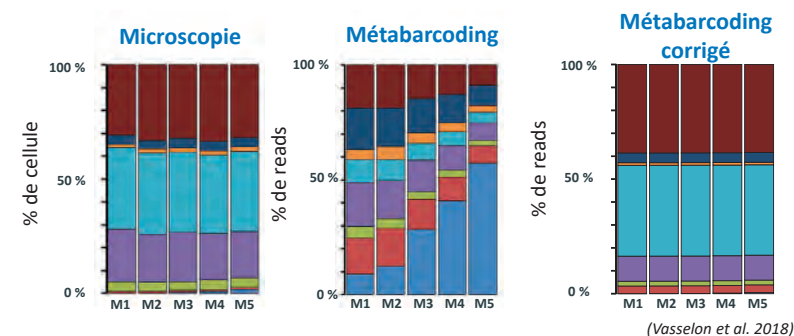
- Nombre de copie du gène *rbcl* corrélé au biovolume cellulaire



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Quantification relative des diatomées Facteur de correction

- Développement d'un facteur de correction basé sur le biovolume
- Testé sur 5 mélanges composés de 8 espèces
- Modification du nb. de cellules d'une espèce à gros biovolume
- Abondances relatives : Microscopie vs. Métabarcoding

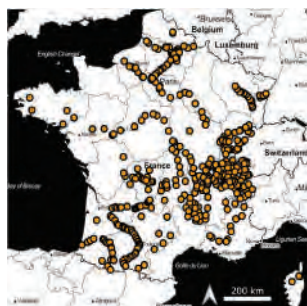


Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

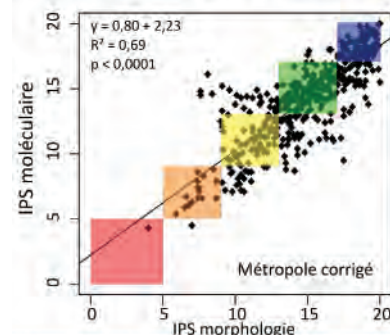
Evaluation de l'état écologique des cours d'eau

- Développement et application aux cours d'eau de Mayotte (INRA-AFB, 2013-2018)
- Test en métropole (INRA-AFB, 2016-2018) lors des campagnes DCE 2016 et 2017
- Collaboration nationale avec les Agences de l'eau, Dreal, bureaux d'études
- Comparaison notes d'indice diatomique (IPS) morphologique et moléculaire

461 sites



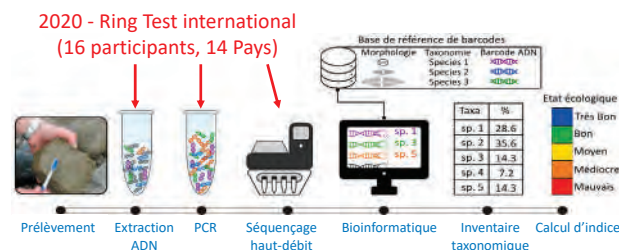
(Vasselon et al. 2018, Rivera et al. 2020)



Journée ADN Environnemental | 15 janvier 2020 | ZABR

Vers l'implémentation en routine ?

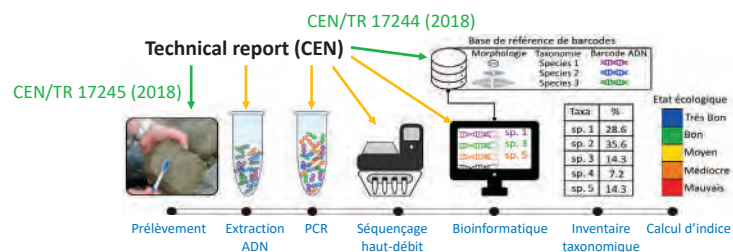
- Besoin de stabilité méthodologique (e.g. PCR, séquençage,...) = intercalibration



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Vers l'implémentation en routine ?

- Besoin de stabilité méthodologique (e.g. PCR, séquençage,...) = intercalibration
- Définir les bonnes pratiques et enclencher le processus de standardisation
- Transfert des outils et des connaissances aux acteurs de la bioindication



Réfléchir à la place des outils ADNe en bioindication ?
(éviter le « modèle anglais », Kelly 2019)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Merci pour votre attention

« La diversité des méthodes et des connaissances
est une richesse »



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Références bibliographiques

- Keck, F., Vasselon, V., Tapolczai, K., Rimet, F., & Bouchez, A. (2017). Freshwater biomonitoring in the Information Age. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15(5), 266–274. doi:10.1002/fee.1490
- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., & Packmann, A. I. (2016). The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 251–263. doi:10.1038/nrmicro.2016.15
- Mann, D. G., Crawford, R. M., & Round, F. E. (2016). Bacillariophyta. In J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, C. H. Slamovits, L. Margulis, M. Melkonian, D. J. Chapman, & J. O. Corliss (Eds.), *Handbook of the Protists* (pp. 1–62). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-32669-6_29-1
- Mann, D. G., & Vanormelingen, P. (2013). An Inordinate Fondness? The Number, Distributions, and Origins of Diatom Species. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(4), 414–420. doi:10.1111/jeu.12047
- Zelinka, M., & Marvan, P. (1961). Zur präzisierung der biologischen klassifikation der reinheit fließender gewässer. *Archiv Für Hydrobiologie*, 57(3), 389–407.
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., ... Zhang, Q. (2018). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, jeu.12691. doi:10.1111/jeu.12691
- Werner, P., Adler, S., & Dreßler, M. (2016). Effects of counting variances on water quality assessments: implications from four benthic diatom samples, each counted by 40 diatomists. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2287–2297. doi:10.1007/s10811-015-0760-9
- Stein, E. D., White, B. P., Mazor, R. D., Jackson, J. K., Battle, J. M., Miller, P. E., ... Sweeney, B. W. (2014). Does DNA barcoding improve performance of traditional stream bioassessment metrics? *Freshwater Science*, 33(1), 302–311. doi:10.1086/674782
- Vasselon, V., Rimet, F., Domaizon, I., Monnier, O., Reyjol, Y., & Bouchez, A. (2019). Évaluer la pollution des milieux aquatiques avec l'ADN des diatomées : où en sommes-nous ? *Techniques Sciences Méthodes*, (5), 53–70. doi:10.1051/tsm/201905053
- Vasselon, V., Bouchez, A., Rimet, F., Jacquet, S., Trobajo, R., Corniquel, M., ... Domaizon, I. (2018). Avoiding quantification bias in metabarcoding: Application of a cell biovolume correction factor in diatom molecular biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(4), 1060–1069. doi:10.1111/2041-210X.12960
- Kelly, M. (2019). Adapting the (fast-moving) world of molecular ecology to the (slow-moving) world of environmental regulation: lessons from the UK diatom metabarcoding exercise. *Metabarcoding and Metagenomics*, 3. doi:10.3897/mbmg.3.39041

L'ADNe du miel d'abeilles domestiques : vers un nouvel outil pour la flore terrestre ?

Julie CHARTON, Matthieu LE BRUN, EDF-R&D

RÉSUMÉ

Après avoir investigué les possibilités offertes par l'ADNe dans les milieux aquatiques et les sols, la R&D d'EDF, à la recherche d'outils novateurs pour étudier la biodiversité terrestre, s'est intéressée à une nouvelle matrice : le miel produit par les abeilles domestiques.

Le métabarcoding sur pollen de miel est une démarche en plein développement qui a montré des avancées techniques récentes et qui permet l'identification de taxons végétaux (Valentini et al 2010, Bell et al. 2016). Cette approche complète la palynologie et présente des avantages (simplicité, robustesse, coût, meilleure discrimination spécifique, analyse de mélanges dans une matrice complexe).

Des essais ont donc été réalisés en 2019 sur un site de la R&D d'EDF (Chatou, 78) doté de plusieurs ruches, afin de tester la faisabilité de l'approche et de juger des apports potentiels notamment en matière de caractérisation de la flore terrestre.

Il est ainsi prévu de : i) comparer les données issues des analyses ADN du miel à celles d'un inventaire floristique de terrain, ii) étudier l'évolution de la composition en pollen des miels au cours de la saison apicole, iii) identifier les limites de l'approche ainsi que les usages potentiels pour EDF.

Les premiers résultats obtenus sont en cours d'étude et sont prometteurs. Les travaux vont se prolonger en 2020 avec notamment de nouveaux essais de terrain dans d'autres contextes environnementaux.



L'ADNe DU MIEL D'ABEILLES DOMESTIQUES : VERS UN NOUVEL OUTIL POUR LA FLORE TERRESTRE ?

Julie CHARTON et Matthieu LE BRUN, EDF-R&D

Laboratoire National Hydraulique et Environnement - Chatou

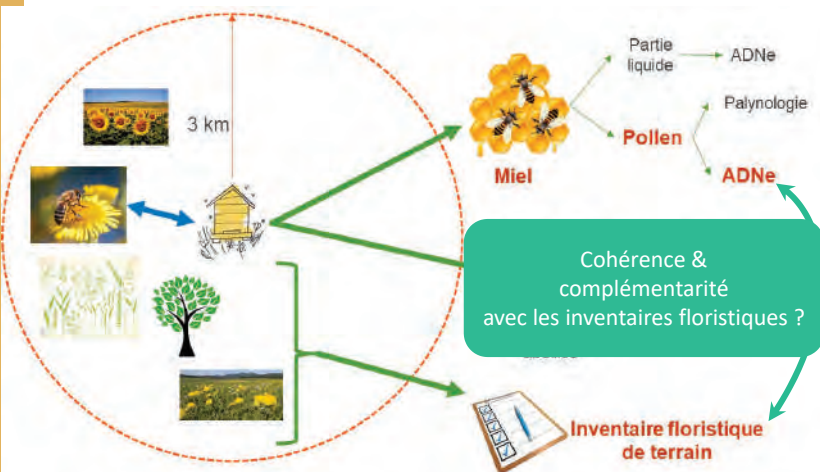
Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Pourquoi travailler sur l'ADN dans le miel des abeilles ?

- Retour d'expérience EDF R&D sur d'autres matrices
- Miel des abeilles domestiques : intégrateur spatial et temporel
- Métabarcoding sur pollen du miel : démarche en plein développement, avancées techniques récentes => identification des taxons végétaux (Valentini et al 2010, Bell et al. 2016)
- Alternative à la palynologie
ADNe : a priori, plus rapide, plus simple, plus robuste, meilleure discrimination spécifique, analyse de mélanges dans matrice complexe, standardisable, traitement de nbx échantillons, peu cher (si la base de données existe)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Schéma de principe



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Tests de faisabilité de l'approche

- 2018 : analyser la biblio et structurer le programme 
- 2019 : tester la faisabilité sur un site (Chatou - m. urbain)
ADNe miel vs inventaire floristique
 - Construction et mise en œuvre du protocole exp.
 - Comparaison des résultats obtenus
 - Analyse du REX : 😊 / ☹️ et propositions d'adaptation, usages pot.



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

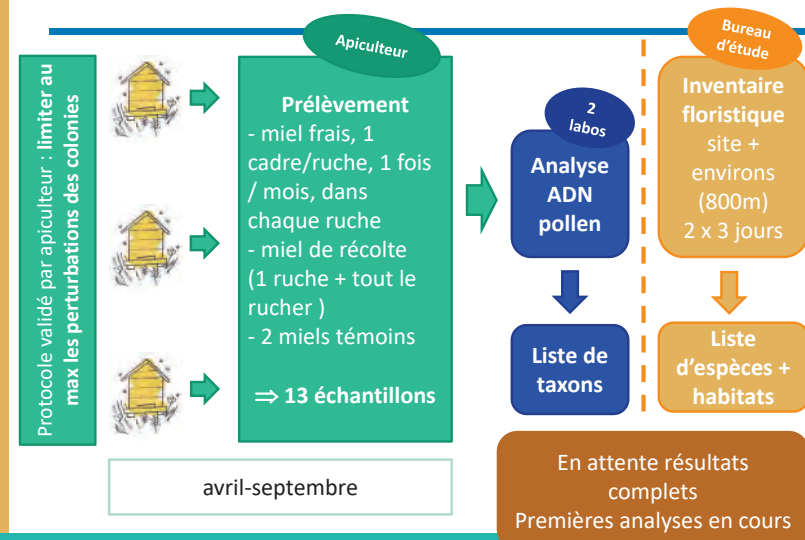
Contexte du site R&D Chatou (78)



- Ile sur la Seine, en milieu urbain, espaces verts, golf
- Site : 13 ha, bâti + espaces verts en gestion différenciée
- 6 ruches, entretenues par apiculteur professionnel et volontaire pour expérimentation

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Protocole d'essai 2019 à Chatou



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Analyse des premiers résultats

- De la matière, malgré une saison apicole difficile (météo)
- **Inventaire floristique terrain** : site + environs
 - Plus de 300 relevés floristiques
 - **545 taxons identifiés** dont 2 espèces patrimoniales et 9 espèces exotiques envahissantes
- **Analyses ADN en cours** mais déjà les **résultats d'un labo**
 - Plus de 800 données, avec 370 taxons identifiés ⇒ présence/absence
 - Niveau discrimination taxonomique des données : 39 % espèce, 30 % genre, 14 % famille, 3 % ordre
 - Identification de **180 espèces et 116 genres** avec forte représentation : Rubus, Rosa, Tilia, Acer, Castanea, Prunus, Trifolium, Papaver...
⇒ **moins complet que l'inventaire floristique** : a priori normal car essentiellement les plantes à fleurs, visitées par les abeilles

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Suivi temporel et comparaison des ruches

- **Prélèvements mensuels**
 - Miel frais : représentatif des dernières semaines
 - **Évolution de la composition du miel au cours du temps**, cohérente avec les floraisons observées ou théoriques : à confirmer
- **Composition différente selon les ruches**, à une même date
 - Hypothèses : pas les mêmes comportements de butinage, pas les mêmes sous-espèces (noire, jaune, buckfast)
- **Suivi mensuel ou récolte en fin de saison ?**
Information plus fine avec un suivi mensuel
Nb taxons récolte < Nb taxons Σ (suivi mensuel)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Ripisylves

- Expérience apiculteur : miel de bords de Seine a un goût différent ⇒ **composition particulière ?**
- **Résultats à creuser :**
 - Comparaison avec les miels témoins issus d'autres régions
 - Identification d'un « bouquet » propre à ce milieu avec des plantes inféodées
 - Biais : milieu urbain avec nombreuses plantes ornementales, berges aménagées anthropisées, aire de butinage pas limitée aux berges
 - Avoir d'autres essais, avec un protocole adapté

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Espèces Exotiques Envahissantes

Identification de 7 EEE

Ailante glanduleux (*Ailanthus altissima*), Vigne-vierge à 5 feuilles (*Parthenocissus quinquefolia*), Cerisier noir (*Prunus serotina*), Sumac de Virginie (*Rhus typhina*), Acacia faux-robinier (*Robinia pseudoacacia*), Cresson d'Autriche (*Rorippa austriaca*), Sénéçon du Cap (*Senecio inaequidens*) = **toutes des espèces de berges et de ripisylves**

Mais incomplet

2 espèces bien présentes et mellifères mais pas identifiées par ADN

- Renouée du Japon (*Reynoutria japonica*) : floraison tardive, après dernier prélèvement de miel
- Buddleia (*Buddleja davidii*) : pas de sonde ADN ? ADN qui se dégrade ? Pas butinée ? Floraison courte en 2019 ?



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Suites en 2020

- **Analyse approfondie des résultats** : comparaison entre ruches, évolutions temporelles, suivi mensuel vs récolte, ADN vs inventaire terrain, regard de l'apiculteur / connaissance ruches et environnement local, intercomparaison des résultats des 2 labos d'analyse ADN...
- Plus-values, limites et incertitudes de la démarche
- Voies d'amélioration : Adaptation protocoles, pression d'inventaire floristique terrain selon particularités des abeilles, données ADN de référence...
- **Essais sur un ou plusieurs sites EDF dans d'autres contextes enviro.**



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Usages potentiels de l'approche à EDF

- **Étape préliminaire**, avant des inventaires floristiques approfondis (notamment quand les sites à investiguer sont nombreux, ou de très grandes tailles) ⇒ Optimisation de la pression d'inventaire.
- Après inventaire floristique de terrain approfondi, **inventaire « light » ou ciblé**.
- Détection et suivi de la **présence d'espèces d'intérêt** (ex : espèces protégées, espèces exotiques envahissantes).
- **Suivi d'actions** de restauration et de gestion – espèces, et habitats (ex : prairies fleuries, végétal local, haies, agriculture...).
- **Suivi des effets du CC**, aires de répartition d'espèces cibles (moyen et long termes) ?

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

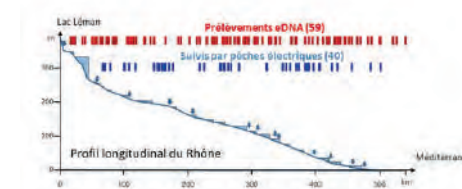
Conclusion



- **En attente des résultats complets des essais 2019**
- Des premières pistes intéressantes mais à creuser lors de **l'analyse approfondie 2020**
- Pas de difficulté de mise en œuvre sur site ni de blocage technique majeur
- De **nouveaux tests terrain en 2020**
- Des usages opérationnels potentiels si approche validée

Autres travaux R&D – LNHE sur ADNe

- Avec des partenaires
- Dans les milieux aquatiques,
 - Stratégie et robustesse d'échantillonnage, persistance du signal ADN dans l'eau - rivières alpines (R. Civade, thèse 2016)
 - Comparaison ADNe et pêches électriques - Rhône (A. Maire, voir Pont et al. 2018 et 2019)



- Dans les sols
 - Faisabilité et intérêt des mesures ADNe dans les sols - Combe-Madame (Alpes)

Propositions de scénario et de plan d'action pour le déploiement de ces outils

Philippe BLANCHER, Estelle LEFRANÇOIS, Eco in'Eau

RÉSUMÉ DU PROJET SYNAQUA

SYNérgie transfrontalière pour la bio-surveillance et la préservation des écosystèmes AQUAtiques

WP3.2.1 : Ateliers d'échange pour les décideurs publics et professionnels de la gestion environnementale

La politique environnementale de l'UE¹ (2019) invite les pays membres à redoubler les efforts pour améliorer la qualité de l'eau. Selon les statistiques les plus récentes, seulement 40% des eaux de surface en Europe ont atteint le bon ou très bon état écologique tel que prévu par la Directive Cadre Eau (DCE)². En France, le nombre de masses d'eau ayant un statut ou potentiel écologique jugé insatisfaisant a augmenté³.

Face à la perte de biodiversité et la dégradation des écosystèmes et des services qu'ils rendent, la mobilisation s'organise. Afin d'assurer la restauration et la préservation des milieux naturels, il est nécessaire de disposer d'outils de diagnostic et de surveillance performants, mis en œuvre dans un cadre opérationnel efficace, assurant une bonne maîtrise des coûts.

Les développements récents dans l'utilisation de l'ADN environnemental⁴ (ADNe) pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques à partir d'espèces indicatrices (bioindication), représente une véritable révolution : la possibilité d'identifier rapidement et à coût modéré l'ensemble des espèces présentes dans un simple échantillon prélevé in situ. Cette méthode peut être utilisée à des fins d'inventaires des espèces présentes dans un milieu donné, mais elle peut également permettre de calculer un indice de qualité biologique sans le recours au microscope (ce dernier requérant des opérateurs une grande expertise et du temps, et produisant des inventaires souvent dépendants de l'opérateur).

Dans cette perspective, le projet franco-suisse SYNAQUA (INTERREG France-Suisse 2017-2019) a mené des actions visant au développement et à la validation de méthodes utilisant l'ADNe des diatomées (algues microscopiques) et des oligochètes (petits vers enfouis dans les sédiments). Grâce à l'organisation d'ateliers prospectifs associant l'ensemble des parties-prenantes, il a aussi permis de concevoir des scénarios différenciés d'application des outils basés sur l'ADNe, puis de bâtir un « scénario vertueux » et d'élaborer un plan d'action. (*Suite page suivante*)

¹ https://europa.eu/rapid/press-release_IP-19-1934_fr.htm

² European Environment Agency (2018): European waters — Assessment of status and pressures 2018, 85 pp.

³ Commission Européenne (2019) : L'examen de la mise en œuvre de la politique environnementale 2019 - Rapport par pays – France, 44 pp.

⁴ ADN extrait directement à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement (eau, biofilms aquatiques, sédiments...), sans avoir besoin d'isoler au préalable le ou les organismes recherchés.

SITUATION RECHERCHEE A L'HORIZON 2027

L'année 2027 correspond au démarrage du 4ème plan de gestion DCE. L'objectif est qu'à cette échéance l'ADNe soit utilisée en routine dans le cadre des démarches réglementaires.

La place de l'ADNe dans la bioindication en 2027

Le scénario considéré comme « vertueux » s'appuie sur une bonne complémentarité entre les méthodes basées sur l'ADNe et les méthodes traditionnelles. Dans ce scénario, la méthode ADNe est utilisée comme un outil massif de surveillance environnementale, en première intention (screening pour identifier les « points-chauds » de contamination ou de dysfonctionnement) et en routine, tandis que les approches traditionnelles sont mises en œuvre notamment pour la calibration ou pour affiner le diagnostic sur des sites.

Il suppose que les décideurs ont été convaincus de la nécessité d'une intégration des méthodes ADNe dans les protocoles d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, et qu'ils ont décidé des investissements nécessaires dans les efforts de développement, de normalisation et de déploiement. De façon plus fondamentale, les pouvoirs publics (nationaux et européens) ont maintenu des objectifs élevés en matière de qualité des milieux et de biosurveillance, et ont été incités à le faire par la pression des citoyens.

Enfin, un accompagnement et une implication adéquate des acteurs de la « filière bioindication » (bureaux d'études et laboratoires en particulier) ont permis de ne pas la déstabiliser complètement et de ne pas perdre des compétences critiques.

Les effets sur la gestion et l'état des milieux aquatiques en 2025-2030

Grâce à l'utilisation de l'ADNe, la biodiversité est mieux évaluée. On dispose d'une bien meilleure connaissance de tous les milieux, y compris les moins étudiés. Ceci permet une grande réactivité, par exemple face aux espèces invasives et aux évolutions liées au changement climatique. Les actions de restauration/conservation deviennent plus pertinentes et se développent. La qualité des milieux aquatiques s'améliore ou a minima la dégradation est enrayée. Ceci se traduit par des impacts positifs sur l'environnement, le cadre de vie et la santé, répondant à des préoccupations fortes des citoyens.

PLAN D'ACTION A METTRE EN ŒUVRE

La réalisation d'un tel scénario nécessite d'agir dans six domaines d'action de façon coordonnée et d'assurer la continuité dans la mise en œuvre des différentes actions.

- Le développement, l'expérimentation et la normalisation des méthodes ;
- Une réglementation et une organisation permettant une mise en œuvre optimale des outils de bioindication basés sur l'ADNe ;
- La formation / mobilisation des professionnels ;
- La sensibilisation / mobilisation des décideurs et maîtres d'ouvrages ;
- La sensibilisation / mobilisation de la société civile
- La mise en place d'un dispositif de pilotage de l'ensemble pour qu'il y ait cohérence et intégration des domaines.



PROPOSITIONS DE SCÉNARIO ET DE PLAN D'ACTION POUR LE DÉPLOIEMENT DES OUTILS ADNe

Philippe Blancher, Conseil
Estelle Lefrançois, Eco-In'Eau

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Le projet SYNAQUA

- SYNérgie transfrontalière pour la bio-surveillance et la préservation des écosystèmes AQUAtiques

- Les partenaires :



- Les financeurs :



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Une prospective orientée vers l'action

Concevoir un scénario basé sur l'ADNe permettant de :

- améliorer la bioindication au niveau **quantitatif** (extension et intensification dans temps et espace) et **qualitatif**
- améliorer le **biomonitoring** des milieux aquatiques
- améliorer leur **protection** et leur **restauration**



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Trois séminaires associant les parties-prenantes

Janvier 2019 : séminaires Lyon (Franco-Suisse) et Paris



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Forte participation de toutes les parties-concernées



3 séminaires (Lyon-Paris)



46 personnes, représentant 34 organisations, ont participé à au moins un séminaire

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Scénario vertueux à l'horizon 2025-2030

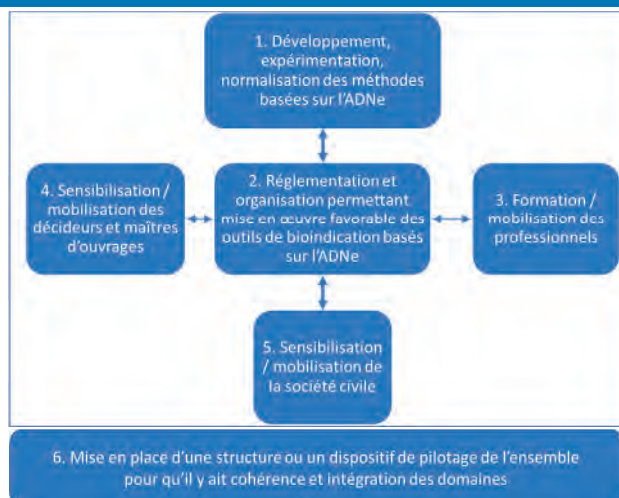
- Méthodes ADNe de bioassessment, principalement pour des évaluations haut-débit
- Méthodes traditionnelles sur sites spécifiques ou pour comparaisons avec résultats ADNe

Nécessite :

- Volonté/décisions politiques
- Investissements au départ dans recherche, standardisation, implémentation
- Maintien d'une filière technico-économique efficiente

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Un plan d'action dans six domaines



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Domaine 1 : Le développement, l'expérimentation et la normalisation des méthodes basées sur l'ADNe

- Preuve de concept et démonstration acquises, **développements requis pour usage en routine** :
 - Optimiser protocoles, automatiser certaines phases (extraction)
 - Mesurer et diminuer les incertitudes
 - Adapter et améliorer la bancarisation des données (contextualisation, mise à disposition plus rapide pour un meilleur usage)
- Poursuite travaux de **normalisation**
- Poursuite travaux de **recherche** :
 - Complétude BDD de référence
 - Nouvel indice adapté à l'ADNe, et plus généralement nouvelles méthodes indicelles de bioindication
 - Connaissance sur les autres compartiments (autres algues, bactéries) et test de leur potentiel en tant que bioindicateur
 - Méthode pour résoudre les problèmes taxonomiques
- **Mutualisation**, au niveau national et européen, **des actions et moyens de financement** pour atteindre ces objectifs

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Domaine 2 : Une réglementation et une organisation permettant une mise en œuvre favorable des nouveaux outils

- Respect calendrier → outil ADNe pour 4ème plan gestion DCE (2027-2033) :



- Garantir pérennisation méthodes traditionnelles (poursuivre recherche sur taxonomie et méthodes traditionnelles, imposer double compétence chez opérateurs, définir statut d'expert en taxonomie)
- Développer méthode au bénéfice de la gestion des milieux naturels (lien avec besoins du terrain, économies affectés à l'intensification de la surveillance, à des actions des restaurations, de sensibilisation)
- Communiquer sur la stratégie choisie afin que filière socioprofessionnelle puisse s'adapter et opérer la mutation nécessaire et, ainsi, conserver compétence et expérience en écologie + diversité des opérateurs

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Domaine 3 : La formation / mobilisation des professionnels

Bonne visibilité sur échéances de développement et de mise en application des méthodologies ADNe

→ favoriser la mutation de la filière professionnelle

- Formations aux nouveaux métiers dédiés à la technique (techniciens de laboratoire, experts en séquençage, bio-informaticiens), tout en garantissant culture minimale dans taxonomie et écologie
- Formation à ces nouveaux outils (ADNe, bioinformatique) dans tous les cursus d'écologues pour qu'ils soient à même de les utiliser au mieux et d'interpréter les résultats (connaissance biais, faux positifs...)
- Actions de formation continue pour mise à niveau ou reconversion professionnels en poste
- Accompagnement des entreprises dans démarches de changement : stratégies de mutualisation, nouveaux modèles économiques...

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Domaine 4 : La sensibilisation / mobilisation des décideurs et maîtres d'ouvrages

- Amener décideurs et maîtres d'ouvrages à s'engager dans une biosurveillance de qualité basée sur l'ADNe, les accompagner dans cette démarche

- Au niveau européen et national :
 - Maintenir niveau d'ambition et moyens (humains et financiers) de la politique de l'eau
- Au niveau des territoires :
 - Démontrer gains économiques liés à des outils plus performants : réactivité plus forte face à nouvelles pressions, comme arrivée espèces exotiques
 - Elaborer ouvrage de synthèse et clés d'aide à la décision : dans quelles situations l'ADNe est pertinent techniquement et économiquement ?
 - Bien expliquer les éventuelles évolutions dans le classement et accompagner les maîtres d'ouvrage pour restaurer la situation avec des moyens techniques et financiers spécifiques en cas de déclassement suite au changement de méthode

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Domaine 4 : La sensibilisation / mobilisation des décideurs et maîtres d'ouvrages

- Au niveau des entreprises :
 - S'appuyer sur manques liés aux outils actuels ; par ex., montrer qu'une meilleure connaissance des milieux récepteurs des rejets permet de mieux mesurer leurs impacts et de comprendre les non-améliorations persistantes
 - S'appuyer sur les démarches de RSE (responsabilité sociale et environnementale) et viser un impact global positif sur la biodiversité
- Mobiliser des fonds au service de l'amélioration de la qualité des milieux aquatiques
 - Développer les stratégies d'utilisation et les modèles économiques efficaces
 - Evaluer les gains éventuels/à terme, à l'échantillon et au niveau global
 - Etablir stratégie d'utilisation de ces gains en vue de l'amélioration de la qualité des milieux → bien analyser quand et comment l'amélioration de la qualité passe par celle de la biosurveillance
 - Préserver le système français des redevances afin qu'elles restent prioritairement affectées à l'amélioration de la qualité de l'eau et des milieux aquatiques

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Domaine 5 : La sensibilisation / mobilisation de la société civile

Faire en sorte que la société civile continue à se mobiliser en faveur de la transition écologique et fasse pression sur les décideurs (publics et privés)

Les actions doivent s'inscrire dans le cadre des démarches plus larges concernant l'eau et la biodiversité et s'appuyer sur les organismes spécialisés (associations de protection de l'environnement, Maison de la rivière, Conservatoires des espaces naturels, Centres Permanents d'Initiatives pour l'Environnement-CPIE...), **qui doivent être intégrés dans les cibles du domaine 4**

- Développer les collaborations entre chercheurs, opérateurs et associations d'éducation à l'environnement
- Développer des démarches de science participative
- Faire en sorte que des sensibilisations soient aussi présentes dans des formations non liées à l'écologie, mais ouvrant à des métiers ayant un impact sur l'environnement (ingénieurs, managers, financiers...)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Domaine 6 : La mise en place d'une structure ou d'un dispositif de pilotage de l'ensemble

Création d'un point focal / guichet unique / centre de ressources :

ADN – BIOSURVEILLANCE - *La génomique pour l'environnement et la biodiversité*

➤ Avec pour missions de :

- Identifier / formuler / cartographier les besoins en matière de biosurveillance sur la base des approches génomiques
- Promouvoir les méthodes disponibles auprès des gestionnaires
- Accompagner les actions de recherche répondant aux besoins identifiés, y. c. aide à la mobilisation des financements
- Mettre en œuvre le transfert aux opérateurs (guides/protocoles, accréditation, standards, formations...)
- Être une instance de conseil et d'appui aux politiques publiques (forte valeur ajoutée si intégration des différents experts/acteurs)

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Domaine 6 : La mise en place d'une structure ou d'un dispositif de pilotage de l'ensemble

➤ **Eléments du cahier des charges :**

- S'inscrire dans la structuration actuelle pour ne pas se déconnecter du besoin / de la demande et pour utiliser au mieux les compétences existantes
- Concevoir une structure ouverte associant toutes les parties-prenantes (y. c. politiques, acteurs économiques et représentants de la société civile).
- Être suffisamment attractive pour agréger les initiatives et être un lieu de synergie

➤ **Les points d'appui et opportunités :**

- L'Interreg SYNAQUA (France et Suisse)
- Le réseau européen et français mis en place par le COST DNAqua-Net qui permettra d'assurer un bon tuilage et de garder le lien / la visibilité avec l'UE [congrès de clôture fin 2020 à Evian]

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Quelle mise en œuvre à l'échelle nationale et européenne ?

Agnès BOUCHEZ, UMR CARTEL, INRAE

RÉSUMÉ

Suite aux premiers travaux de la fin des années 2000 faisant la preuve du concept de la possibilité d'utiliser l'ADN environnemental pour la biosurveillance des milieux aquatiques, plusieurs tests à plus large échelle ont été réalisés et sont réalisés au niveau national et international.

Au niveau européen, les développements de ces approches ont été fortement stimulés par le réseau COST DNAqua-Net (Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe – CA15219) qui rassemble plus de 400 participants de 49 pays.

Les 5 groupes de travail de DNAqua-Net balayent les différents domaines allant des bases de référence de barcode ADN aux aspects d'implémentation dans la réglementation, en passant par les métriques bioindicateurs, les techniques de laboratoire et la bioinformatique pour le traitement des données de séquençage ADN.

Pour appuyer l'implémentation de ces outils pour la biosurveillance des milieux aquatiques, la standardisation est un pilier majeur. Sous l'impulsion de DNAqua-Net, un nouveau groupe de travail a été créé en 2019 au Comité Européen de Normalisation (CEN). Ce groupe (TC230-WG28) est en charge des méthodes basées sur l'ADN et l'ADNe pour l'évaluation de l'état écologique. Il possède un groupe miroir dans les différents pays européens (à l'AFNOR pour la France).

Enfin, au niveau national, des ateliers de prospective menés en 2019 dans le cadre du programme SYNAQUA ont permis de définir un plan d'action pour une implémentation optimale de ces méthodes à l'horizon 2030. Ce plan d'action identifie notamment le besoin d'une structure nationale d'accompagnement du changement, structure pour laquelle un projet de préfiguration a été déposé sous l'égide d'Aquaref auprès de l'Office Français de la Biodiversité.



QUELLES MISES EN ŒUVRE À L'ÉCHELLE NATIONALE ET EUROPÉENNE

Agnès Bouchez **INRAE**

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

ADN environnemental & surveillance des milieux aquatiques

- **'Microbiome'** : les années 2000 (e.g. Riesenfeld et al 2004, Schloss et al 2005...)
- **'Environmental DNA'** : Ficetola et al 2008, Valentini et al 2009, Dejean et al 2011, Taberlet et al 2012, etc...
- **DCE – bioindicateurs**
 - **Diatomées** : Kermarrec 2012, Kermarrec et al 2013-2014 ...
 - **Macroinvertébrés** : Hajibabaei et al 2011, ...
 - **Poissons** : Dejean et al 2011, Civade et al 2016, Pont et al 2018 ...

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Des projets nationaux

■ Biomonitoring



Diatomées : Mayotte (2014-15), Guyane (2013-17), DREAL (2016-17) – **INRAE & ONEMA/AFB**



Macroinvertébrés : ANR AquaDNA (2013-16) – **LECA & LIEC**



Poissons : *SpyGene* & **ONEMA/AFB**

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Des projets internationaux

■ SYNAQUA (Interreg France-Suisse) :

- INRAE / Uni Genève
- Diatomées, oligochètes
- Carte de qualité
- Ateliers de prospective
- Ateliers de sensibilisation



■ Eco-AlpWater (Interreg AlpineSpace)

- Coordination Italie - INRAE et AFB pour la France
- Diatomées, cyanobactéries, poissons
- Protocoles



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

DNAqua-Net : réseau européen

“Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe”

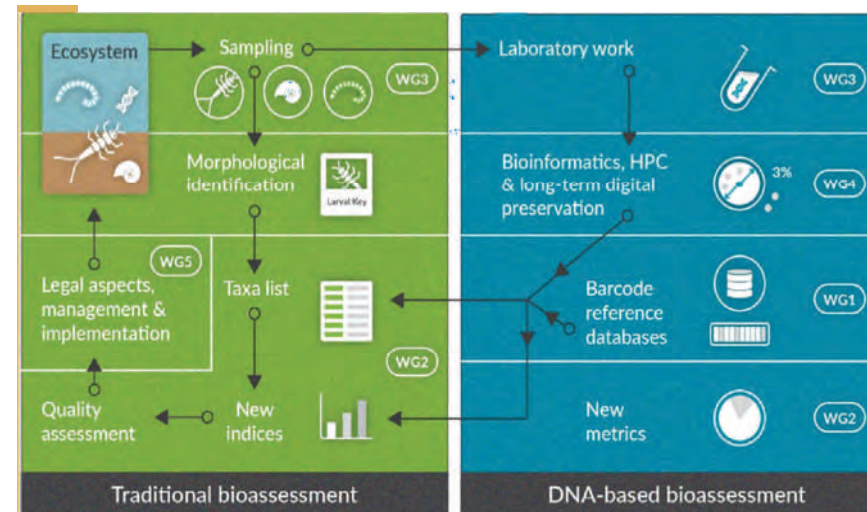
- Démarrage en octobre 2016
- > 400 participants, 49 pays
- Scientifiques, porteurs d'enjeux, SMEs



COST Action CA15219 – coord. Florian Leese



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR



- 5 groupes de travail
- <https://dnaqua.net/>



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Normalisation

- CEN TC 230 : Normalisation dans le domaine de l'analyse de l'eau
 - WG2 : des normes adaptées à la DCE afin d'évaluer correctement l'état écologique des masses d'eau dans toute l'Europe.
 - **Nouveau WG28** : « DNA and eDNA methods »
 - Un item soumis en 2019, plusieurs en préparation

- Groupe miroir à l'AFNOR



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Accompagnement national

- Ateliers de prospective de SYNAQUA :
 - Suite au franchissement d'un front de recherche, c'est désormais **un front technologique et stratégique** qu'il faut traverser.
 - **De nombreux écueils** peuvent conduire à dégrader la qualité de la biosurveillance, pénalisant in fine la capacité à préserver et restaurer les écosystèmes.
 - **De nouveaux acteurs** (entreprises de biotechnologie) arrivent dans la sphère de la biosurveillance par le biais des analyses génomiques.
 - **Les acteurs actuels**, institutionnels comme opérationnels, doivent être formés pour intégrer ces nouvelles approches

Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR

Accompagnement national

- Sous l'égide d'AQUAREF 'innovation' :
 - préfiguration d'une structure nationale d'accompagnement du changement (demande de soutien OFB 2020)
 - **Ouverte.** Pouvoir intégrer différents partenaires
 - **Evolutive.** Adapter à l'évolution du contexte
 - **Souple.** Rapide et facile à mettre en place
 - **Susceptible d'évoluer** vers une autre forme au regard des premiers retours d'expérience



Journée ADN Environnemental | 23 janvier 2020 | ZABR



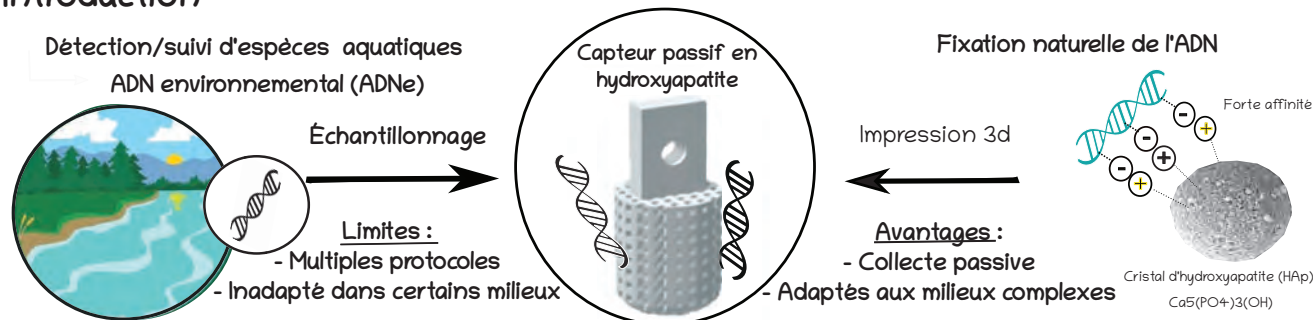
POSTERS

POTENTIEL DES CAPTEURS PASSIFS EN HYDROXYAPATITE POUR ECHANTILLONNER L'ADN ENVIRONNEMENTAL

Verdier H.^{1,2,3}, Konecny-Dupré L.¹, Datry T.², Barthès A.³,
Bouchez A.⁵, Marquette C.⁴, Lefébure T.¹

¹Université de Lyon - LEHNA, France, ²INRAE-Villeurbanne, France, ³Eurofins Hydrobiologie France,
⁴ICBMS, France, ⁵INRAE-Carrtel, France

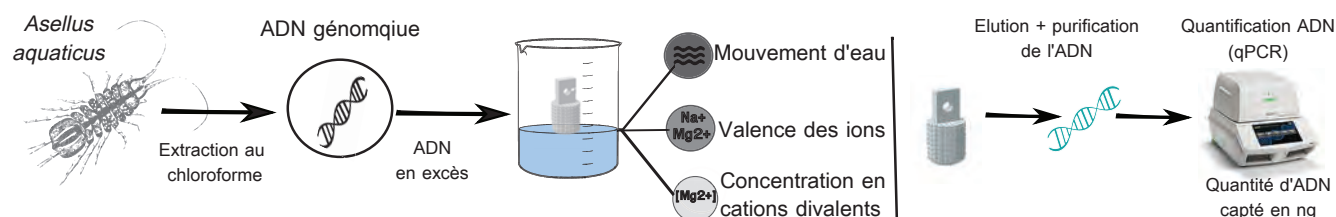
Introduction



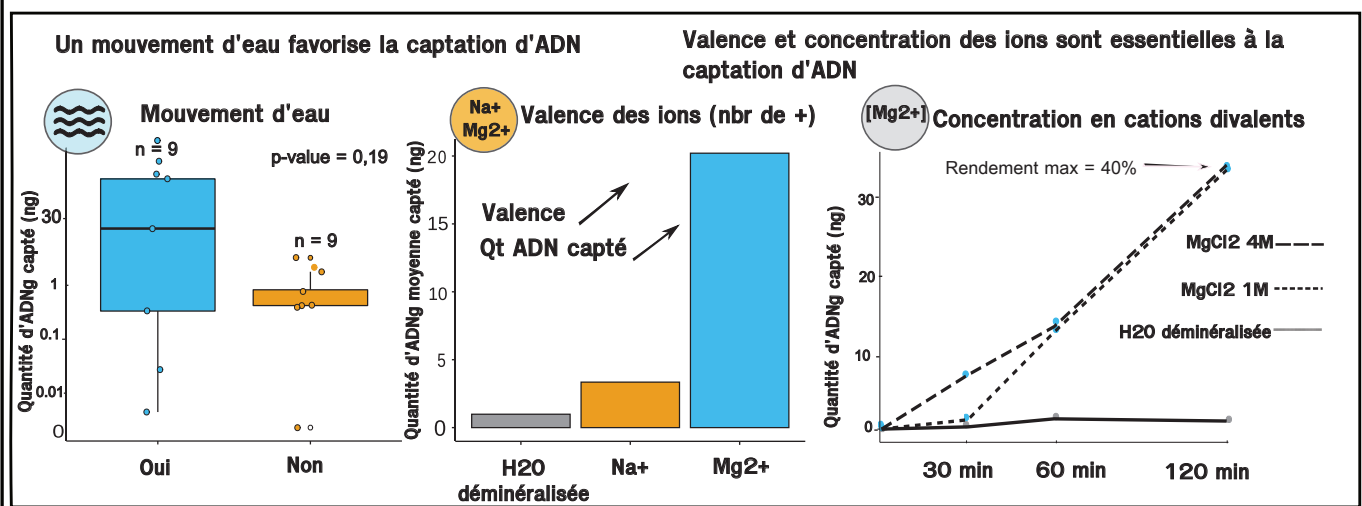
Questions de recherche :

Un capteur en hydroxyapatite peut-il capter de l'ADN libre dans l'eau ?
Quels sont les facteurs clés de la captation d'ADNe ?

Matériels et méthodes



Résultats



Conclusion

- Un capteur en hydroxyapatite peut capter l'ADN libre dans l'eau, jusqu'à 4-0% de la quantité d'ADN initiale.
- Présence de cations divalents dans l'eau essentielle à la captation d'ADN.
- La présence d'un mouvement d'eau augmente la quantité d'ADN capté.

Perspectives

- Tester l'applicabilité du capteur : allonger le range de concentrations en cations et le temps d'incubation.
- Tester les capteurs in-vivo (en mésocosmes + organismes vivants).

Références

1. Okazaki et al., 2000
2. Lorenz and Wackernagel, 1987
3. Paget et al., 1992

May stream biofilms act as macroinvertebrates eDNA samplers?

Sinziana F. Rivera¹, Valentin Vasselon², Nathalie Mary³, Olivier Monnier⁴, Frédéric Rimet¹ & Agnès Bouchez¹

¹ INRAE, Université Savoie Mont-Blanc, UMR CARTEL, 75bis av. de Corzent, FR-74200 Thonon-les-Bains

² OFB, Pôle R&D «ECLA», INRAE, UMR CARTEL, 75bis av. de Corzent, FR-74200 Thonon-les-Bains

³ ETHYC'O, B.P. 13821, 98803 Nouméa, Nouvelle-Calédonie

⁴ OFB, Service Mobilisation de la Recherche, 5 square Félix Nadar, FR-94300 Vincennes

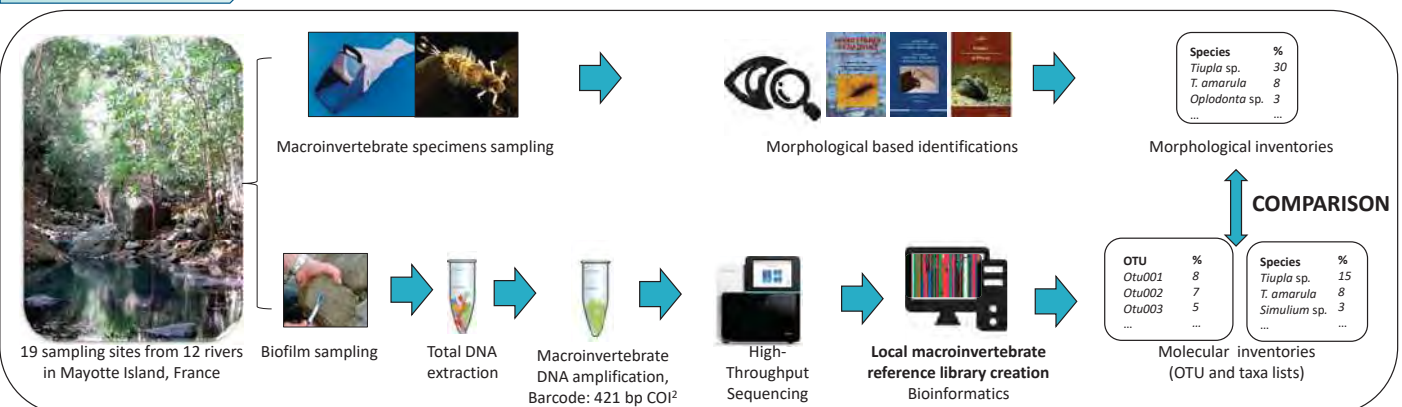


Context

Metabarcoding studies on macroinvertebrate communities are usually performed on DNA extracted from bulk samples. However this approach remains time consuming and is destructive. A non-invasive approach is proposed by extracting macroinvertebrate eDNA directly from aquatic biofilms¹.

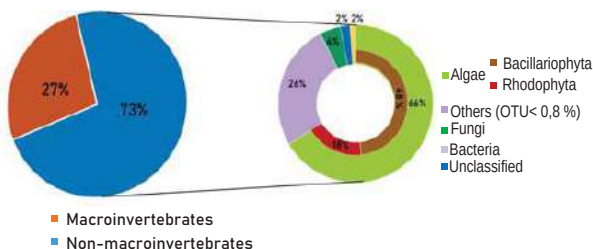
Hypothesis: Aquatic biofilms can catch macroinvertebrate eDNA, therefore macroinvertebrate community structure assessed from eDNA in biofilm samples will be correlated to that assessed with the conventional morphological method.

Methods



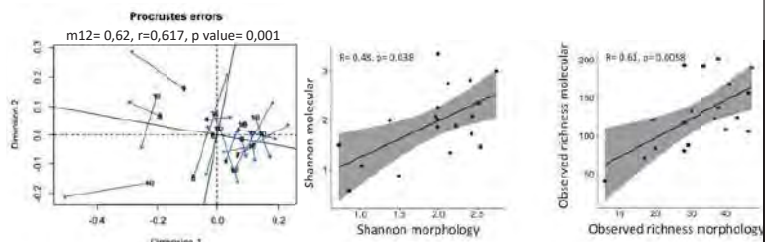
Results

Which percentage of the environmental COI sequences detected in the biofilm samples correspond to macroinvertebrates?



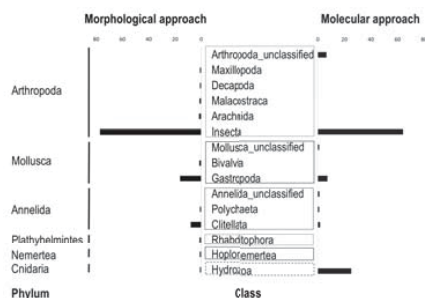
- Only 27% of the sequences corresponds to macroinvertebrates
- The highest percentage of non-macroinvertebrate sequences corresponds to algae which is the major component of biofilms (NCBI BLAST)

Community structure and diversity: do morphological and molecular approaches correlate?



- Structures of macroinvertebrate communities obtained with both approaches are correlated
- Diversity and richness metrics derived from both approaches are correlated

Do we detect the same taxa (phylum and class level) with both approaches?



- The 2 dominant phyla (*Arthropoda* and *Mollusca*) were detected with both approaches.
- In many cases, molecular sequences were not assigned to lower taxonomic levels than phylum and remained "phylum_unclassified".

Conclusions

- These results suggest that eDNA from macroinvertebrates is present in biofilms
- Morphological and molecular inventories provided similar structures and diversities for macroinvertebrate communities when working with unassigned OTU data
- Least good results were obtained when comparing both approaches after taxonomic assignment of the OTU data, some optimizations are still needed
- Experiments under controlled conditions are needed to evaluate more precisely the capacity of environmental biofilms to catch extracellular DNA
- The use of biofilms for macroinvertebrate metabarcoding represents a promising opportunity for biodiversity studies

Acknowledgments

We thank OFB for the financial support and DNAqua-Net for fruitful discussions. We also thanks Vasco Elbrecht for his constructive advice during DNA extractions and bioinformatics.

References

- Shogren et al. 2018. « Water Flow and Biofilm Cover Influence Environmental DNA Detection in Recirculating Streams ». *Environmental science & technology* 52 (15): 8530–8537
- Elbrecht & Leese. 2017. « Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment ». *Frontiers in Environmental Science* 5: 11



BI-O-RHÔNE: KNOWLEDGE OF SEASONAL AND INTER-ANNUAL FISH DENSITY VARIATIONS IN THE LIGHT OF SEDIMENT MANAGEMENT OPERATIONS ON THE SWISS AND FRENCH UPPER-RHÔNE RIVER

Bi-O-Rhône : Connaissance de la densité piscicole et de ses variations intra- et interannuelles dans le cadre des opérations de gestion sédimentaire du Haut-Rhône en Suisse et en France

Why the INTERREG 'Bi-O-Rhône' project?

- On the Upper-Rhône, dams are periodically operated to clear out the excessive load of fine sediment which deposits in the Swiss Verbois reservoir (Fig. 1).
 - Management operations include drawdown flushings, dredgings, and dam gates opening during floods.
- Ecological impacts of such operations are to be evaluated
 - Reservoirs are artificial waterbodies sheltering a typical biodiversity (e.g. birds, fish, beaver...)
- Fish assemblage composition and structure in reservoirs are poorly known, mostly because of sampling limitations
 - Sampling methods so far used are partial, selective, and invasive (e.g. electric fishing along banks, gillnets)



Fig. 1: The cross-boundary study area with the four dams and reservoirs.

Main objective

- To set up a global and non-invasive fish sampling methodology for reservoirs, based on hydroacoustics and eDNA:
 - Allowing both a quantitative and qualitative picture of the fish assemblage;
 - Sensitive enough to reflect potential impacts of sediment management operations, irrespective of other sources of variation.

Methodological developments

Hydroacoustics

- Suitable to monitor impacts of drawdown flushings (Grimardias *et al.* 2017)^a, but may be further optimized...
- Accounting for the surface layer by use of a horizontal transducer in addition to the vertical one
- Test in reservoirs of an autonomous aquatic drone (HARLE ©) equipped with a 120 KHz echosounder, and comparison with sampling by boat

eDNA

- Reliable to describe longitudinal fish assemblage patterns in a large river such as the Rhône river (Pont *et al.*, in press)^b but must be tested at a more precise scale in large reservoirs
- Test of the influence on the results of DNA from tributaries and from upstream the reservoirs



Fig. 2: eDNA sampling and analysis

Both hydroacoustics and eDNA

- Comparison / calibration with other sampling methods, e.g. gillnets, electric fishing, videocounting in fishways
- Determination of adequate sampling frequency and timing to best capture the natural variability of fish assemblages
- Combination of the strengths of both methods to qualitatively and quantitatively characterize fish assemblages

^a Grimardias D., Guillard J., Cattaneo F. (2017). Drawdown flushing of a hydroelectric reservoir on the Rhône River: impacts on the fish community and indicators for the sediment management. *Journal of Environmental Management*, 197, 239-249.

^b Pont D., Rodic M., Valentini A., Crivado R., Jean P., Maire A., Roset N., Schabus M., Zingg H., Dejean T. (in press). Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports*.



In sum... what is Bi-O-Rhône?

- A cross-boundary project for an improved ecological monitoring of the Upper-Rhône River
 - The Rhône is a shared French-Swiss water resource, its management should be collaborative between both countries
- A piece of the puzzle toward a more sustainable strategy to manage fine sediment, with preservation of fish assemblages
 - Impacts assessment compulsory to help improve sediment management strategy, and to mitigate future ecological impacts
- A multiple stakeholder project, where hydroelectric operators, scientists, and water managers work in close partnership

Cattaneo F.¹, Abadie F.², Barras J.³, Braise V.², Collilleux G.², Coulon D.², Dejean T.⁴, Goulon C.⁵, Grimardias D.¹, Guillard J.², Jean P.⁴, Lecomte E.³, Nawratil de Bono C.³, Pressiat F.², Rodic M.²

¹ Hepia Geneva - University of Applied Sciences and Arts Western Switzerland (frank.cattaneo@hepia.ch)

² CNR - Compagnie Nationale du Rhône, Lyon

³ SIG - Services Industriels de Genève, Geneva, Switzerland

⁴ SPYGEN, Le Bourget du Lac

⁵ INRA - CARTEL, Thonon-les-Bains



Projet soutenu et cofinancé par le fonds FEDER (Fonds Européens de Développement Régional) Interreg



Campus LyonTech la Doua
66 bd Niels Bohr – CS 52132
F-69603 Villeurbanne Cedex
Tel : 04 72 43 83 68
e-mail : asso@graie.org - www.graie.org