



ADN-O

1er Meeting ADN-O : 15-16 nov 2021 - Lyon Villeurbanne

Résumés des présentations

Table des matières

Résumés des présentations.....	1
L'ADN pour analyser les communautés de diatomées pour la biosurveillance	2
Développements d'outils de biomonitoring basés sur l'ADNe du phytoplancton des plans d'eaux.	2
Essai inter-laboratoires en vue de comparer les protocoles de métabarcoding ADN des diatomées utilisés pour le biomonitoring des eaux douces.....	2
Revisiting global biogeography of freshwater diatoms: new insights from molecular data	3
Unravelling global patterns and drivers of river biodiversity during dry phases	4
Bio-indication diatomique en cours d'eau et interfaçage ADNe : rappel des principes sous-tendant l'évaluation diatomique actuelle, réseau de contraintes, pistes en vue d'un passage plus rapide de la métagénomique vers l'utilisation opérationnelle	4
Evaluation de différents protocoles d'extraction ADN pour la description du macrozoobenthos de rivière	5
Projet Algo-PAM-Barcode : Couplage PAM-Barcoding pour l'étude des communautés microalgales des milieux d'eau douce.....	6
Improving the detectability of Dragonflies species in alpine ponds: with larvae, exuviae , adults or metabarcoding from environmental DNA?.....	6
L'ADNe trophique pour décrypter la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques	7
Compétition entre espèces microbiennes: une question renouvelée par le métabarcoding des diatomées.....	7
Biofilms aquatiques: capteurs d'ADNe des poissons	8
Développement d'un capteur passif à ADNe pour le biomonitoring des écosystèmes aquatiques.....	8

L'ADN pour analyser les communautés de diatomées pour la biosurveillance

Bouchez Agnès (INRAE CARRTEL)

Parmi les diverses applications des approches basées sur l'ADN environnemental (ADN(e)) pour l'évaluation de la biodiversité développées au cours de la dernière décennie, le métabarcoding ADN des diatomées benthiques a rapidement montré son potentiel pour l'évaluation de la qualité des eaux douces. Plusieurs optimisations et développements ont été proposés pour les principales étapes (e.g. barcodes ADN, méthodes d'extraction de l'ADN, complétion de la base de données de référence des codes-barres et quantification). Toutes ces améliorations mises bout à bout permettent d'obtenir des résultats comparables à l'approche morphologique traditionnelle (microscopie) et font du métabarcoding une approche précieuse pour l'avenir de la bioévaluation des masses d'eau.

Développements d'outils de biomonitoring basés sur l'ADNe du phytoplancton des plans d'eaux.

Canino Alexis (INRAE - UMR CARRTEL)

Les méthodes de biomonitoring basées sur le phytoplancton évoluent rapidement grâce à l'utilisation croissante de l'ADN environnemental (ADNe) et offrent une grande complémentarité avec celles actuellement en place, basées sur les observations microscopiques. Cependant, les comparaisons de ces deux approches restent difficiles et méritent d'être investiguées d'avantage. Ce projet a pour but principal de développer et d'optimiser des outils visant à utiliser l'ADNe du phytoplancton pour les suivis de biomonitoring en routine, et assurer une complémentarité avec ceux basés sur la microscopie. Des outils bio-informatiques développés pour initier le projet seront présentés. Ces derniers permettent de faciliter le lien entre les approches moléculaires et les observations microscopiques et sont accessibles à tous. Les résultats obtenus sur un premier run de séquençage seront présentés. Ce run a permis de tester l'efficacité (in vitro) de couples de primers présélectionnés (in silico) lors du début du projet.

Essai inter-laboratoires en vue de comparer les protocoles de métabarcoding ADN des diatomées utilisés pour le biomonitoring des eaux douces

Chardon Cécile (INRAE - UMR CARRTEL)

Les diatomées sont des microalgues que l'on retrouve dans tous les milieux aquatiques. Dans les milieux d'eaux douces, elles se développent entre autre sur le fonds des rivières et des lacs où elles forment avec d'autres organismes des biofilms aquatiques. La composition de la communauté des

1er Meeting ADN-O : 15-16 nov 2021 - Lyon Villeurbanne

diatomées varie en fonction du degré de pollution du milieu. Les diatomées sont donc utilisées comme bio-indicateur pour évaluer l'état écologique des milieux aquatiques. Actuellement, l'identification normalisée des diatomées est réalisée par microscopie.

Au cours des dernières années, de nombreux développements méthodologiques ont été réalisés afin de permettre une optimisation du métabarcoding ADN des diatomées. Cette approche a été appliquée avec succès pour la biosurveillance des cours d'eau à l'échelle de réseaux nationaux de surveillance dans plusieurs pays du monde. Cependant les protocoles et méthodes utilisés varient d'un laboratoire à l'autre ce qui limite la transférabilité de cet outil et la capacité à comparer les données obtenues.

Dans le cadre d'un groupe de travail européen issu du COST DNAqua-Net, un essai inter-laboratoires a été mis en place afin d'évaluer la transférabilité et la reproductibilité de deux étapes du processus : l'extraction d'ADN à partir de biofilm et l'amplification par PCR d'un barcode ciblant les diatomées.

Cet essai a regroupé 18 laboratoires de 12 pays différents. D'une part, il a permis d'évaluer la transférabilité et la reproductibilité entre les participants de ces deux étapes, chaque étape étant associée à un protocole défini. Et d'autre part, d'évaluer la variabilité introduite par les différents protocoles actuellement appliqués par la communauté scientifique.

Les résultats obtenus montrent qu'un transfert des 2 protocoles évalués est possible. De plus, ils montrent que l'utilisation de différents protocoles induit de la variabilité dans la composition de la communauté de diatomées mais que la variabilité de la note de l'état écologique est acceptable.

Revisiting global biogeography of freshwater diatoms: new insights from molecular data

Chonova Teofana (INRAE, UMR Carrtel)

Due to their high dispersal rates, microorganisms are often expected to be cosmopolitan. However, recent studies have demonstrated that microorganisms indeed may show biogeographical patterns. Diatoms have for a long time been used as models to study microbial biogeography. They are unicellular eukaryotic microalgae that are taxonomically diverse, and different species have marked species-specific ecological preferences. Most studies on diatoms dispersion and endemism are based on microscopy data and therefore suffer from drawbacks associated with the optical identification at large scale. Metabarcoding technologies provide higher resolution data and enable analyzing genetic diversity. Recent bioinformatics tools allow reliable comparison of large datasets, overcoming biases in species identification. In this study, we assembled a large metabarcoding dataset of benthic diatom samples collected from rivers in seven geographic regions (four continental areas and three tropical islands) covering the subpolar (Fennoscandia), temperate (France Mainland) and tropical (West Africa, French Guyana, New Caledonia, Tahiti island and Mayotte island) climate zones. We analyzed diatom diversity patterns to address two main questions: 1) the presence of a latitudinal gradient in diversity and 2) the cosmopolitanism of diatoms. Our data showed a decrease in diatom richness with a decrease in latitude. However, testing the effect of land type (island vs. mainland) showed that this factor explains the actual variability of richness along the climatic gradient. Differences in community structure between regions and climate zones were significant. The proportion of endemic diatoms varied strongly depending on the selected level of genetic similarity.

Unravelling global patterns and drivers of river biodiversity during dry phases

Datry Thibault (INRAE, UR Riverly)

Rivers and streams are among the most threatened hotspots of biodiversity on Earth. A major limitation in our understanding of their biodiversity continues to be stands in the exclusion of intermittent rivers and ephemeral streams (IRES) despite these systems conducted to date, which representing over half of the global river network. Here, using a global, coordinated sampling effort and a metabarcoding approach targeting multiple taxa, we identify patterns and drivers of sediment biodiversity in 84 IRES during their dry phase. Both proximal (e.g. resource availability in the form of carbon and nutrients) and distal drivers (e.g. latitude and climate) were identified as important predictors of sediment local diversity (alpha-diversity) for most taxa. Using correlation networks, we show that fungi and bacteria have a major role in driving the turnover of community composition (beta-diversity) is mostly driven by fungi and bacteria for multiple taxa. Our multigroup approach provides new insights for understanding the mechanisms driving community assembly in IRES and predicting biodiversity responses under global change.

Bio-indication diatomique en cours d'eau et interfaçage ADNe : rappel des principes sous-tendant l'évaluation diatomique actuelle, réseau de contraintes, pistes en vue d'un passage plus rapide de la métagénomique vers l'utilisation opérationnelle

Delmas François (INRAE, UR EABX)

En l'application nationale de la DCE, depuis 2005, l'évaluation de l'état diatomique de nos cours d'eau de France se réalise selon une méthode de prélèvement-préparation-détermination-comptage normalisée (Norme AFNOR NF-T90-354) et utilise les résultats d'un indice diatomique morphologique (actuellement, l'IB D2007) pour calculer un écart à la référence adéquate dans la région naturelle considérée. Pour diverses raisons, l'évaluation des impacts anthropiques réalisée à partir de ce maillon est essentiellement centrée sur l'altération de la qualité des eaux (physico-chimie, enrichissement en nutriments).

La DCE-compatibilité du niveau d'évaluation de cette méthode a été vérifiée et parfois ajustée pas à pas par des exercices répétés d'intercalibration européenne. Par ailleurs, toute une connaissance taxonomique et autoécologique pré-existe sur les taxons de France et la régionalisation des flores, que les opérateurs ne souhaitent pas voir perdre. Cette méthode par ailleurs assez robuste présente cependant quelques limitations du fait : 1) d'une pression d'observation un peu basse, et 2) de limites techniques liées à la fois à l'observation optique et au recul taxonomique de l'intervenant, qui peuvent induire un effet-opérateur assez important. Moyennant certaines précautions, dont une augmentation des bases de séquences assignées, l'évolution vers l'ADNe est porteuse d'une plus-value incontestable vis-à-vis des 2 aspects précités.

1er Meeting ADN-O : 15-16 nov 2021 - Lyon Villeurbanne

Le but de la présente communication est de présenter les contraintes contextuelles et, dans le contexte où la méthode de détermination des inventaires diatomiques évoluera probablement vers l'ADNe à court-moyen terme, d'envisager des principes et pistes permettant un passage plus rapide de la métagénomique vers l'utilisation opérationnelle et réglementaire."

Détection non létale d'un pathogène émergent chez la truite grâce à l'ADN excrété via les urines
Duval Eloïse (CNRS SETE - Moulis, INRAE UMR ESE - Rennes)

La maladie proliférative rénale (PKD en anglais) est une maladie infectieuse qui émerge chez les poissons salmonidés depuis deux décennies, à la fois en Europe du Nord et Amérique du Nord et cause d'importantes pertes en aquaculture ainsi que d'inquiétants déclin chez plusieurs populations de salmonidés sauvages. La PKD est causée par *Tetracapsuloides bryosalmonae*, un parasite myxozoaire avec un cycle de vie complexe impliquant deux hôtes : un salmonidé (hôte intermédiaire) et un bryzoaire (hôte principal). Le développement de la PKD dépend fortement de la température et de la qualité de l'eau, c'est pourquoi davantage d'épidémies sont attendues dans le contexte de changement global. Pour mieux comprendre la dynamique de la PKD, un dépistage à grande échelle des infections par *T. bryosalmonae* s'avère nécessaire. Le dépistage du statut d'infection et la quantification de la charge parasitaire des poissons reposent sur l'observation de *T. bryosalmonae* sur coupes histologiques ou sur l'amplification d'ADN à partir d'échantillons de rein, organe cible du pathogène. Ce dépistage implique donc l'euthanasie des poissons, et réduit la taille des échantillons prélevables pour quantifier la prévalence d'infection. Dans ce contexte, nous avons développé une méthode non létale de détection du pathogène chez le poisson hôte basée sur l'excrétion des spores via l'urine des poissons infectés. L'application de cette nouvelle méthode nous a ensuite permis de cartographier la prévalence d'infection au sein de 50 populations sauvages de truites fario dans le massif pyrénéen et d'identifier les principaux facteurs environnementaux responsables de cette maladie.

Evaluation de différents protocoles d'extraction ADN pour la description du macrozoobenthos de rivière

Gauthier Mailys (UMR5023-LEHNA)

La caractérisation du macrozoobenthos de rivières se base classiquement sur des critères morphologiques. Cette approche est parfois associée à une identification à résolution taxinomique grossière ou incorrecte. L'identification basée sur l'ADN a ainsi été proposée comme une alternative pour surmonter les limites liées à l'identification morphologique mais possède elle-même son propre lot de limites. Notamment, lors des échantillonnages, le prélèvement du macrozoobenthos est composé d'une part « désirée » (i.e. les organismes) et d'une part « non désirée » (i.e. substrats). Ainsi, les organismes doivent être séparés de leur substrats avant extraction de la communauté (bulk DNA), ce qui est chronophage. Le projet MISTRAL (Metabarcoding pour le Suivi des opérations de Restauration de l'Albarine) vise à développer et à tester différents protocoles d'identification moléculaire des communautés de macrozoobenthos via l'extraction d'ADN à partir de l'éthanol de conservation (etDNA) et via l'extraction de l'échantillon total (bulk in toto DNA), ces deux méthodes permettant de s'extraire de la phase de prélèvement des organismes dans les échantillons. Les différents protocoles ont d'abord été testés sur des communautés composées en laboratoire où leur qualité, répliquabilité, capacité à détecter les espèces présentes ont été évalués. Ces différents résultats ainsi que les perspectives associées au projet MISTRAL seront présentés lors de ce séminaire.

Projet Algo-PAM-Barcode : Couplage PAM-Barcoding pour l'étude des communautés microalgales des milieux d'eau douce

Gorzerino Caroline (INRAE - UMR ESE)

L'objectif du projet Algo-PAM-Barcode est de tester la possibilité, l'intérêt de combiner des méthodes d'étude des communautés de microalgues d'eau douce (identification et quantification des taxons présents) en tenant compte du temps d'analyse, du coût, et de l'expertise nécessaire par rapport au niveau de précision obtenu. Ce projet, comprenant la mise au point d'outils moléculaires puis la comparaison des résultats obtenus avec ceux issus de méthodes non moléculaires (microscope, quantification de chlorophylle au spectrophotomètre / utilisation d'une sonde fluorimétrique le PhytoPAM) permettra, selon les projets de recherche, de choisir le ou les outils les plus adapté(s).

La présentation se focalisera sur le développement de la méthode moléculaire, sur les résultats du séquençage MiSeq d'un fragment de la sous-unité 23S de l'ARN ribosomique pour des échantillons de phytoplancton artificiels et issus de milieux naturels, et sur les problèmes rencontrés.

Improving the detectability of Dragonflies species in alpine ponds: with larvae, exuviae , adults or metabarcoding from environmental DNA?

Lamouille-Hébert Marie (INRAE, UR Riverly)

Current climate change has a strong impact on species distribution, especially in mountains where the species are pushed toward higher altitudes, in areas where they might be trapped by a lower habitat availability. To study these ongoing changes, we need to survey these species and to map their present distribution. This can nevertheless be a problematic task, for groups with a low detectability as boreo-alpine dragonfly species (Odonata). Our study took place in the Western Alps, in the region of Chamonix (France). We visited 125 wetlands on a 193 km² area situated above 1900 masl in 2017, 2018 and 2019. We assessed the presence of different species of dragonflies by combining several detection methods. Three methods focused on the detectability of the different life stages of the dragonflies : larvae, exuviae and adults. To improve the detectability we also used the metabarcoding of the free environmental DNA (eDNA) found in the water in a subset of 36 wetlands. Dragonflies have been detected in 43% of the 125 wetlands, and were represented by six species. Their presence has been highlighted by the exuviae (in 56% of the occupied sites), larvae (76%) and adults (74%). In 22 out of the 36 sites of the subset, we detected dragonflies with at least one of the four methods: the presence of dragonflies has been highlighted by metabarcoding in 14 sites, by exuviae in 12, by larvae in 18 and by adults in 17 sites, respectively. Discrepancies were evidenced, depending the method put into action. Several false negative records were obtained with all methods. Our study demonstrates that the four methods are complementary in order to improve the detectability of the six target species. The methodology linked with eDNA has nevertheless still to be improved to increase the detectability of the dragonflies.

Author(s): Marie LAMOUILLE-HEBERT^{1,2,3*}; Julien CROVADORE¹; François LEFORT¹; Aurélien BESNARD^{3,4}; Beat OERTLI¹

Affiliation(s): 1HEPIA, HES-SO, Geneva, Switzerland; 2FNE Haute-Savoie, Pringy, France; 3EPHE, PSL Research University, Paris, France; 4CEFE, UMR5175 Montpellier, France

L'ADNe trophique pour décrypter la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques

Quemere Erwan (INRAE - UMR ESE)

Pour comprendre les liens entre biodiversité et fonctionnement des écosystèmes, il est essentiel de connaître les réseaux d'interactions qui relient les espèces au sein des communautés. Les approches utilisées traditionnellement pour déterminer les préférences alimentaires (isotopie, micro-histologie des contenus stomacaux) sont difficiles à mettre en œuvre sur un nombre important d'individus/taxons et restent peu précises. Pour lever ces verrous, nous développons à l'INRAE ESE une approche de métabarcoding ADN « multi-marqueurs » basée sur l'ADNe dans les fèces/contenus stomacaux des mammifères, poissons et macro-invertébrés (« DNAquatroph »). Je présenterai les résultats de notre étude pilote ainsi que deux contextes d'application en milieu marin et dulcicole.

Compétition entre espèces microbiennes: une question renouvelée par le métabarcoding des diatomées

Rimet Frédéric (INRAE - UMR CARTELE)

Les écologues cherchent depuis longtemps à comprendre les patrons de distribution des communautés biologiques. Dans le monde microbien, et en particulier pour les microalgues, le filtrage environnemental joue un rôle majeur.

Les diatomées sont des microalgues très diversifiées que l'on trouve dans tous les milieux aquatiques. Dans leur revue, Soninen & Teittinen (2019) indiquent que les diatomées sont soumises à de forts gradients de stress environnementaux qui empêchent l'observation des phénomènes de compétition interspécifique. Jusqu'à présent, la plupart des études étaient réalisées ont été menées avec des analyses en microscopie et nous avons voulu voir si l'information ADN (métabarcoding) pouvait permettre d'observer de la compétition entre les taxons de diatomées.

Afin de réduire le gradient de stress environnemental, nous avons échantillonné des diatomées benthiques autour de la zone littorale d'un grand lac (Lac Léman, 73 km de long) qui présente une relative homogénéité environnementale. Nous avons utilisé des données ADN des communautés pour évaluer les patrons de distribution des taxons. Les échantillons ont été séquencés par métabarcoding (rbcl).

Nous avons construit une phylogénie des diatomées en utilisant la bibliothèque de référence Diat.barcode (Rimet et al. 2019) ; puis les séquences environnementales y ont été placées. Cette phylogénie a été utilisée pour calculer les indices NRI (Net relatedness Index) et NTI (Nearest Taxon Index). Ces indices ont montré à différents niveaux phylogénétiques (communauté entière, niveau intraspécifique) que le filtrage environnemental domine. Nous avons complété ces analyses par des analyses multivariées pour évaluer la limitation de la dispersion et le filtrage environnemental : ceux-ci étaient faibles. Par contre, l'effet de masse, mesuré avec le programme SourceTraker, montre qu'il

1er Meeting ADN-O : 15-16 nov 2021 - Lyon Villeurbanne

a un impact important, les communautés de rivière contaminent une part importante des communautés proches des estuaire et aussi plus loin dans le lac.

Cette étude montre l'importance d'évaluer d'autres phénomènes que le filtrage environnemental pour expliquer la variabilité des communautés de diatomées.

Cette étude fait partie du site <https://www6.inrae.fr/synaqua/>

Biofilms aquatiques: capteurs d'ADNe des poissons

Rivera Sinziana (INRAE - UMR CARTELE)

Des études récentes suggèrent que les biofilms aquatiques peuvent agir comme capteurs d'ADN environnemental (ADNe). Ainsi, nous proposons une nouvelle approche metabarcoding pour étudier les communautés de poissons à partir de cette matrice.

Afin d'évaluer la capacité des biofilms aquatiques à capturer l'ADNe des poissons, des échantillons d'eau et de biofilms ont été collectés en parallèle sur la zone littorale du Lac Léman. Les biofilms ont été collectés dans deux habitats différents. L'ADN de ces échantillons a été extrait et les communautés de poissons ont été ciblées en utilisant un court fragment du gène 12S. Les inventaires moléculaires obtenus à partir des échantillons d'eau et des biofilms ont permis d'obtenir des listes taxonomiques comparables. De plus, au travers des échantillons de biofilms, nous avons pu mettre en évidence des variations spatio-temporelles des communautés de poissons liées à leur écologie.

Nos résultats montrent que ces dernières peuvent être étudiées par metabarcoding à partir de biofilms tout en réduisant le temps et le coût d'analyse en comparaison aux méthodes traditionnelles.

Développement d'un capteur passif à ADNe pour le biomonitoring des écosystèmes aquatiques

Verdier Héloïse (LEHNA - Eurofins - INRAE)

L'échantillonnage de l'ADN environnemental (ADNe) libéré par les organismes aquatiques dans leur habitat est une approche non invasive, sensible et rapide pour détecter leur présence. Plusieurs méthodes existent pour échantillonner l'ADNe: la précipitation, la centrifugation et la filtration d'un volume d'eau, cette dernière étant principalement utilisée. Bien que de nombreux protocoles aient été développés pour chacune de ces méthodes, elles restent chronophages, nécessitent des équipements spécialisés et une intervention humaine. Comme alternative à ces méthodes, nous avons conçu des capteurs à ADNe passifs imprimés en 3D, simples d'utilisation et réutilisables. Ces capteurs ont été fabriqués à partir d'une résine en hydroxyapatite, un minéral connu pour sa capacité de liaison à l'ADN. La forme et la géométrie des échantillonneurs ont été étudiées pour faciliter leur manipulation en laboratoire et sur le terrain. Ici nous présentons le design des capteurs et démontrons leur capacité à capter de l'ADNe d'isopodes en conditions contrôlées et naturelles. Nous présentons également un projet à large échelle où nous comparons l'efficacité des capteurs par rapport à d'autres méthodes d'échantillonnage de l'ADNe (extraction à partir de sédiments et de biofilms, filtration d'eau) pour la biodiagnostic dans un système de rivière intermittente.