



**Interreg**   
Alpine Space  
**Eco-AlpsWater**  
European Regional Development Fund

# Guide technique pour la surveillance de l'ADNe dans les eaux alpines

2021

POUR LES PARTIES PRENANTES ET LES  
UTILISATEURS FINAUX



# Eco-AlpsWater

Évaluation écologique et stratégie de gestion de l'eau innovantes pour la protection des services écosystémiques dans les lacs et rivières alpins

**ÉDITEUR** Tina Elersek

## AUTEURS

**TEXTE** d'Isabelle Domaizon, Marine Vautier, Giulia Riccioni, Massimo Pindo, Valentin Vasselon, Rainer Kurmayer, Adriano Boscaini, Camilla Capelli, Agnes Bouchez, Frederic Rimet, Cécile Chardon, Maxime Logez, Jean Marc Baudoin, Josef Wanzenböck, Hans Rund, Stefanie Dobrovolny, Peter Hufnagl, A. Gandolfi, Jonas Bylemans, Ute Mischke, Tina Elersek, Nico Salmaso

**REVISION** de Hans Rund et Marine Vautier

**PHOTOS** de National Institute of Biology (Maša Zupančič, Tina Eleršek), ARPAV (Giorgio Franzini). LFUI (Hans Rund) and FEM (Nico Salmaso)

**FIGURES SCHÉMATIQUES** de Nico Salmaso, Marine Vautier

**DESIGN** de Tina Elersek

**PUBLIÉ** par National Institute of Biology

Copyright © National Institute of Biology 2021  
Electronic edition  
Ljubljana, 2021

**INFO** [tina.elersek@nib.si](mailto:tina.elersek@nib.si)

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani  
[COBISS.SI-ID 93177091](https://nib.si/)  
ISBN 978-961-7144-14-7 (PDF)



Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani  
[COBISS.SI-ID 93177091](https://nib.si/)  
ISBN 978-961-7144-14-7 (PDF)

**Interreg**  
Alpine Space  
**Eco-AlpsWater**  
European Regional Development Fund





# Contenu

I. État de l'art des méthodes d'analyse de l'ADN environnemental dans les lacs et les rivières.....	4
II. Protocoles d'échantillonnage (Fig. 1, étape 1).....	7
Échantillonnage du plancton .....	7
Échantillonnage de biofilms en rivières et lacs.....	8
Echantillonnage de l'ADNe poisons dans les rivières et lacs .....	9
III. Protocoles pour l'extraction de l'ADNe (Fig. 1, étape 2).....	10
Extraction de l'ADNe pour l'étude du plancton .....	10
Extraction de l'ADN à partir de biofilms.....	11
Extraction d'ADNe pour les inventaires de poissons (3 méthodes) .....	12
IV. Protocoles pour la préparation des bibliothèques ADN (Fig. 1, étapes 3-4).....	14
Bibliothèques ADN pour le métabarcoding des diatomées .....	14
Bibliothèques ADN pour le métabarcoding des bactéries .....	15
Bibliothèques ADN pour le métabarcoding des protistes .....	16
Bibliothèques ADN pour le métabarcoding des poissons .....	17
V. Protocoles pour les analyses bioinformatiques des données de lectures ADN (Fig. 1, étapes 5-6) .	17
Pipelines bioinformatiques pour le métabarcoding des diatomées (gène rbcL).....	18
Pipeline bioinformatique pour le métabarcoding des bactéries (gène ARNr 16S).....	19
Pipelines bioinformatiques pour le métabarcoding des protistes (gène ARNr 18S) .....	20
VI. Harmonisation des approches dans la Communauté européenne et en Suisse .....	21
Exigences de l'EU-WFD et du CH-WPO .....	21
Les approches de surveillance prochaine génération.....	24
VII. FAQ - perspectives générales.....	25



# I. État de l'art des méthodes d'analyse de l'ADN environnemental dans les lacs et les rivières

Les lacs et rivières fournissent des biens et des services d'une importance capitale pour les sociétés humaines du monde entier ; la protection et la préservation de ces écosystèmes aquatiques constituent donc un défi majeur. La biosurveillance des milieux aquatiques sous-tend désormais une grande partie des choix de gestion et de conservation des eaux douces, et est devenue une tâche essentielle en Europe en raison des fortes pressions anthropiques qui affectent la santé des lacs et des rivières. Une évaluation efficace de la qualité/état des écosystèmes aquatiques nécessite des données complètes sur divers groupes d'organismes aquatiques (des micro-algues aux poissons) utilisés comme indicateurs de la « santé » de l'écosystème. Les estimations de biodiversité requises pour ces diagnostics écologiques sont obtenues en collectant des organismes bioindicateurs, qui sont souvent identifiés au niveau de l'espèce, pour constituer des listes taxonomiques et *in fine* des indices de qualité découlant de ces listes taxonomiques. Ces approches nécessitent un haut niveau d'expertise taxonomique et sont généralement invasives (par exemple, la pêche électrique), chronophages, techniquement complexes et donc coûteuses à déployer sur de grandes échelles temporelles et spatiales. Des méthodes de criblage génétique à haut débit, telles que le métabarcoding de l'ADN environnemental (ADNe), ont récemment été proposées comme alternatives. Cette nouvelle génération de biosurveillance présente de nombreux avantages par rapport à l'approche traditionnelle en termes de rapidité, de comparabilité et de coûts, offrant la possibilité de surveiller la biodiversité aquatique par une approche non invasive et plutôt facile à standardiser. L'ADNe est l'ADN extrait d'échantillons environnementaux (ici, l'eau ou les biofilms), y compris l'ADN présent dans les cellules vivantes (par exemple, les bactéries, les micro-algues) et l'ADN libéré dans l'environnement par tous les types d'organismes (par exemple, les poissons). À partir des échantillons d'ADNe, de courtes régions d'ADN appelées "codes-barres" peuvent être amplifiées, séquencées à l'aide de technologies de séquençage à haut débit (HTS) et comparées à une librairie ADN de référence permettant ainsi d'identifier les taxons présents dans l'eau/les biofilms échantillonnés. Bien que le métabarcoding de l'ADNe ait été reconnu comme très prometteur pour la nouvelle génération de biosurveillance, les méthodologies associées ne sont pas encore normalisées et chaque étape du flux de travail de l'ADNe doit être normalisée et validée au niveau européen avant de pouvoir être mise en œuvre pour la surveillance de routine des lacs et des rivières. L'un des principaux objectifs du projet Eco-AlpsWater est (i) de formaliser des protocoles d'ADNe standards pour inventorier les bactéries, les micro-algues et les poissons, et (ii) de mettre en œuvre ces protocoles à l'échelle alpine pour des lacs et des rivières pilotes. Comme le montre la Fig. 1, les protocoles de pointe référencés ici comprennent des informations pour chaque étape du processus d'analyse de l'ADNe, c'est-à-dire l'échantillonnage, l'extraction de l'ADN et la préparation en laboratoire (y compris la sélection des codes-barres et l'amplification par PCR), ainsi que le séquençage et les traitements bioinformatiques permettant de produire des listes taxonomiques. Bien que comprenant un nombre commun d'étapes, les protocoles doivent être adaptés aux différents types d'éléments biologiques. Un exemple illustratif, avec les principales étapes et méthodes appliquées pour les poissons, est donné



dans la Fig. 2. A partir de la synthèse fournie dans ce document technique, le consortium Eco-AlpsWater a fait quelques choix méthodologiques qui aident à formaliser des stratégies appropriées pour l'analyse de l'ADNe et transférables pour la surveillance de routine des eaux douces. Les principales questions abordées dans cette synthèse bibliographique sont : (i) quand, comment et où échantillonner l'ADNe, (ii) comment concentrer et préserver l'ADNe, (iii) quelle est la méthode d'extraction d'ADN la plus appropriée à appliquer, (iv) quels sont les codes-barres à utiliser en fonction de l'objectif de la biosurveillance, et (v) quelles sont les technologies de séquençage et les pipelines bioinformatiques à sélectionner pour obtenir des inventaires taxonomiques robustes pour les groupes biologiques étudiés.

Tous les protocoles décrits font partie de ceux proposés par le consortium Eco-AlpsWater pour promouvoir la mise en place de l'analyse de l'ADNe avec des méthodes HTS dans la biosurveillance et l'évaluation écologique des lacs et des rivières.

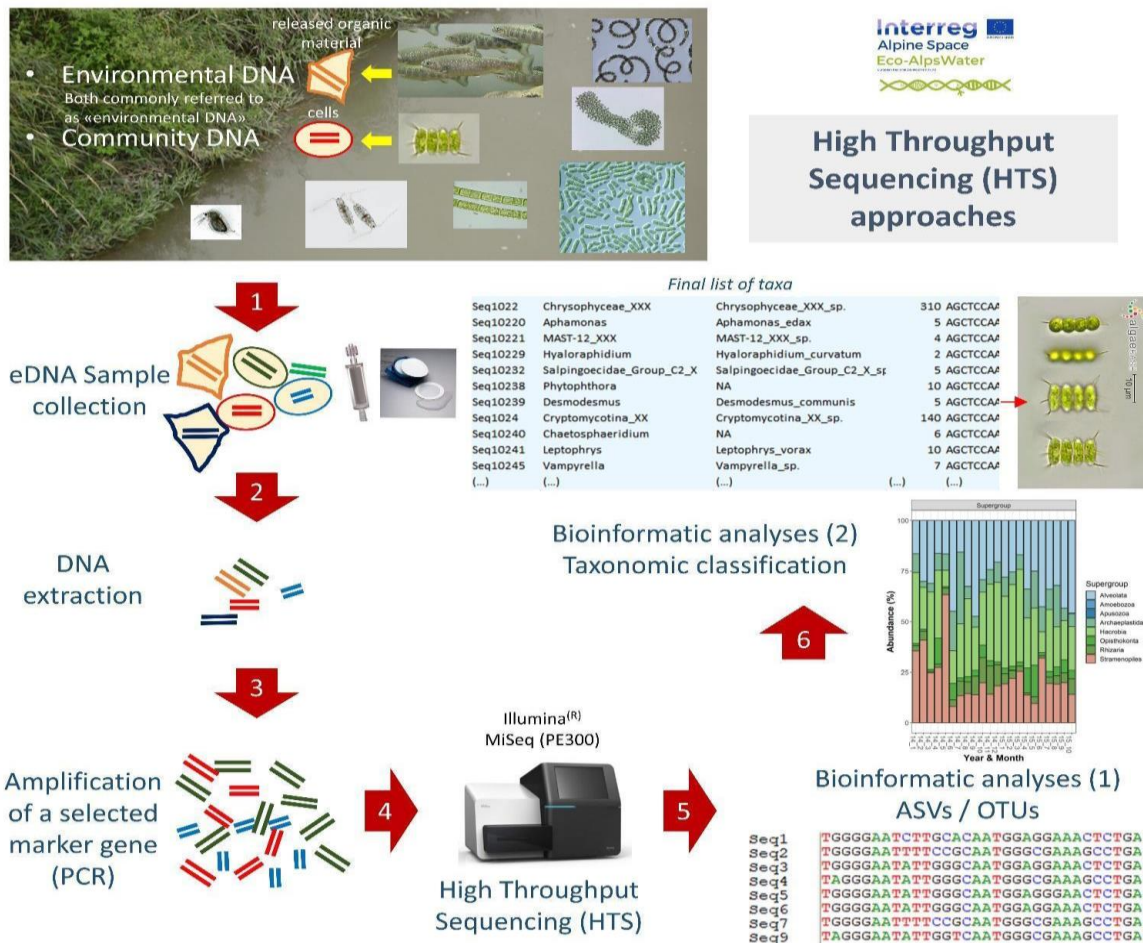


Fig. 1. Représentation synthétique des principales étapes communes appliquées à l'analyse de l'ADNe dans les écosystèmes d'eau douce (lacs et rivières). La figure comprend un exemple d'amplification, de séquençage et de classification des organismes protistes (séquences d'ADN en rouge, bleu et vert foncé), mais les étapes sont les mêmes pour les autres organismes aquatiques. Cependant, chaque élément biologique nécessite des adaptations spécifiques des procédures dans les six étapes du HTS (voir par exemple la figure 2).

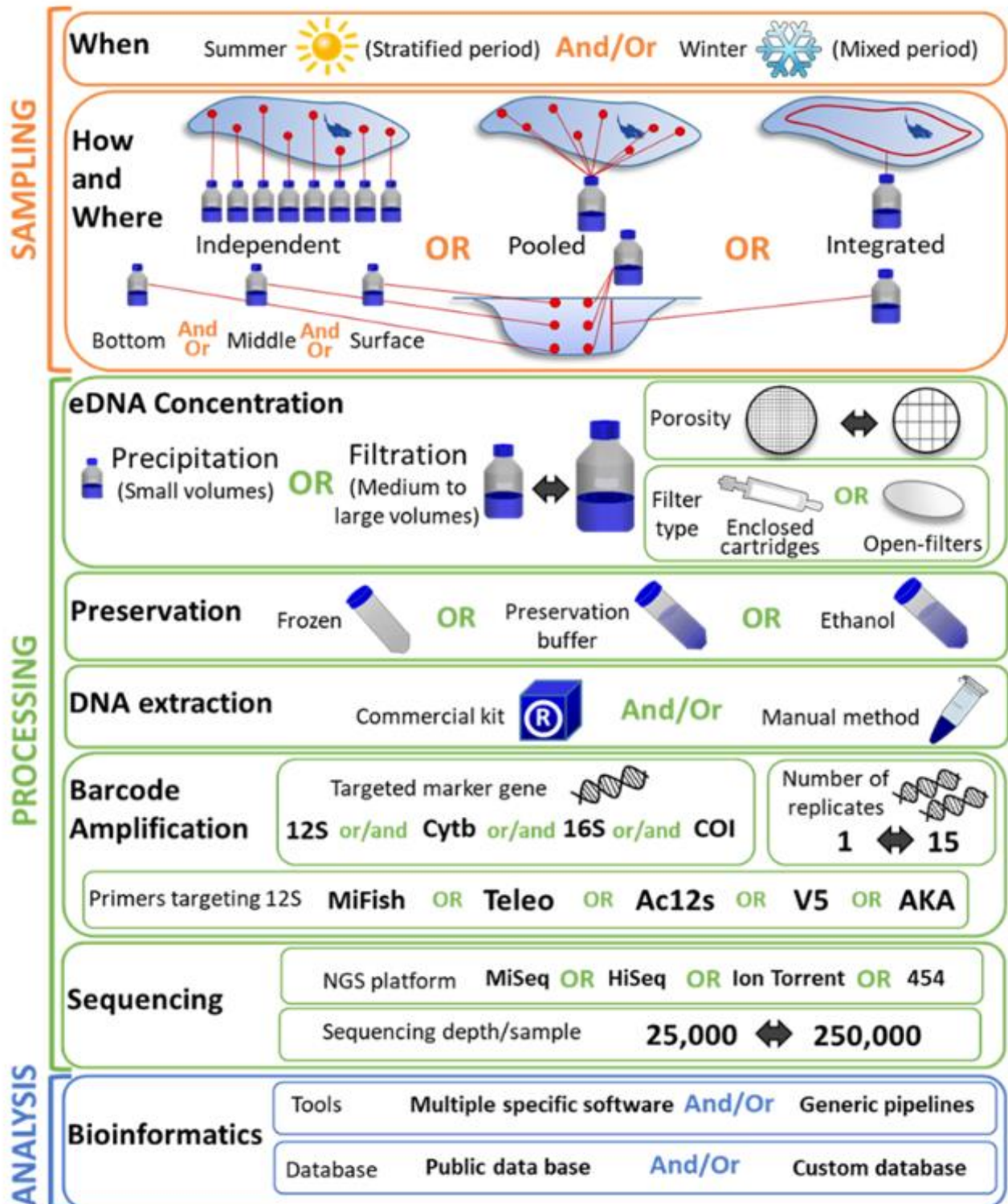


Fig. 2. Représentation synthétique des principales étapes et méthodes appliquées dans la littérature pour le métabarcoding de l'ADNe de poissons dans les écosystèmes d'eau douce (lacs et rivières).



## II. Protocoles d'échantillonnage (Fig. 1, étape 1)

### Échantillonnage du plancton

#### *Échantillonnage de plancton en lacs en vue d'une analyse moléculaire*

L'objectif de ce protocole est de fournir une méthode fiable et reproductible pour l'échantillonnage du micro-plancton lacustre en vue d'une analyse moléculaire. L'application proposée ici, dans le cadre d'Eco-AlpsWater, vise à comparer les inventaires ADN aux inventaires phytoplanctoniques classiques et à caractériser plus largement la diversité microplanctonique par l'analyse de l'ADNe (y compris les bactéries). La stratégie d'échantillonnage est similaire à celle utilisée pour l'inventaire phytoplanctonique classique centré sur la zone euphotique (Fig. 3), mais la procédure de filtration et de conservation est adaptée aux échantillons d'ADN.

Protocole:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.xn6fmhe](https://doi.org/10.17504/protocols.io.xn6fmhe)

Court film présentant l'échantillonnage du plancton pour les analyses d'ADNe

<https://www.youtube.com/watch?v=du5dfjNQr1E>

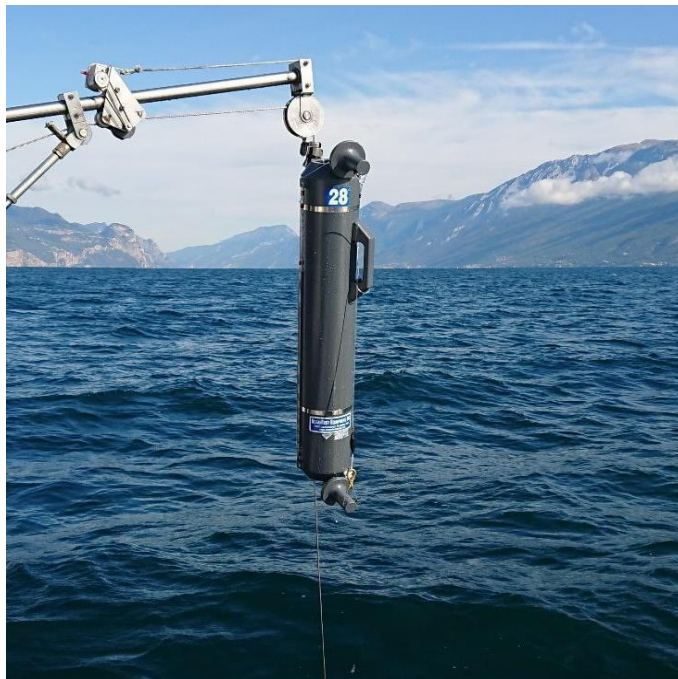


Fig. 3. Bouteille Niskin utilisée pour le prélèvement d'échantillons d'eau à des profondeurs précises dans le lac de Garde.



## Échantillonnage de biofilms en rivières et lacs

### *Échantillonnage de biofilms en rivières et lacs en vue d'une analyse moléculaire et de comptages microscopiques*

L'objectif de ce protocole est de fournir une méthode fiable et reproductible pour l'échantillonnage du micro-phytobenthos de rivière et des microbes associés dans les biofilms, à utiliser à la fois en vue d'une analyse de l'ADN et pour les comptages d'algues en microscopie. Le protocole de terrain est optimisé pour un échantillonnage de routine et est en accord avec les directives du CEN (NF EN 13946) et le rapport technique du CEN (FprCEN/TR 17245) pour l'analyse des diatomées benthiques des rivières (ex. Fig. 4) et des lacs. L'application proposée ici dans le cadre d'Eco-AlpsWater vise à comparer les inventaires ADN aux inventaires traditionnels (microscopie).

Protocole pour l'échantillonnage de biofilms en lacs :  
[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.br2xm8fn](https://doi.org/10.17504/protocols.io.br2xm8fn)

Protocole pour l'échantillonnage de biofilms en rivières :  
[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ben6jdhe](https://doi.org/10.17504/protocols.io.ben6jdhe)

Court film présentant l'échantillonnage de biofilms pour les analyses d'ADN  
<https://www.youtube.com/watch?v=6Q48nSMjNA>



Fig. 4. Photo prise lors d'un échantillonnage de biofilms de la rivière Bistrica river (prélèvement avec brosse stérilisée et gants).





## Echantillonnage de l'ADNe poissons dans les rivières et lacs

### *Collecte de l'ADNe relargué par les poissons en lacs et rivières en vue d'analyses moléculaires*

L'objectif de ce protocole est de fournir une méthode fiable et reproductible pour l'échantillonnage de l'ADNe poissons en lac et rivière. L'application proposée ici, dans le cadre d'Eco-AlpsWater, vise à comparer les inventaires d'ADNe aux inventaires de poissons traditionnels. Trois approches d'échantillonnage différentes sont décrites, elles diffèrent de par les types de filtres utilisés pour filtrer l'eau échantillonnée, le nombre d'échantillons et le volume filtré par échantillon (cf. Fig. 2). Chacune de ces méthodes d'échantillonnage et les procédures d'extraction d'ADN associées (décrites dans la section III) ont leurs avantages et leurs inconvénients, et le choix final dépend de la question de recherche. Ces méthodes et protocoles doivent être considérés comme encore en cours de développement. Tous les membres du consortium Eco-AlpsWater ont contribué à l'optimisation du protocole.

Protocol:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/final-results-and-deliverables/d.t1.1.2---4-lake-river-fish-edna-sampling.pdf>



Fig. 5. Fish *Perca fluviatilis*.



### III. Protocoles pour l'extraction de l'ADNe (Fig. 1, étape 2)

#### Extraction de l'ADNe pour l'étude du plancton

*Protocole Eco-AlpsWater appliqué aux filtres Sterivex à l'aide du kit DNeasy® PowerWater Sterivex QIAGEN*

Ce protocole fait partie du workflow ADN appliqué dans le cadre du projet Eco-AlpsWater pour caractériser la diversité planctonique dans les lacs. Traditionnellement, l'analyse du phytoplancton est réalisée à l'aide d'observations en microscopique, mais les technologies de séquençage à haut débit (HTS) offrent la possibilité d'examiner rapidement des échantillons environnementaux avec la capacité de prendre en compte une grande diversité de taxons qui n'étaient traditionnellement pas pris en compte dans les études planctoniques traditionnelles. L'étape méthodologique décrite ici est l'extraction de l'ADN. Il s'agit d'une étape critique pour l'obtention de résultats pertinents, car l'ADN est stocké dans les cellules (voir la figure ci-dessous) et les méthodes de lyse cellulaire et d'isolement de l'ADN doivent être efficaces pour permettre une extraction non biaisée des acides nucléiques, même à partir d'espèces à parois cellulaires résistantes. Pour le projet Eco-AlpsWater, le plancton prélevé dans les lacs est filtré sur des cartouches Sterivex® (Sterivex® GP 0,22 µm) et stocké à -20°C, comme décrit dans le protocole ci-dessus. La méthodologie choisie pour l'extraction de l'ADN est donc adaptée au type de matériel/filtre utilisé pour la collecte du plancton (i.e. cartouche Sterivex®). Le protocole présenté ci-dessous utilise le kit DNeasy® PowerWater Sterivex® (QIAGEN) avec des modifications spécifiques adaptées à l'extraction d'ADN de plancton.

Protocole:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bvgzn3x6](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bvgzn3x6)

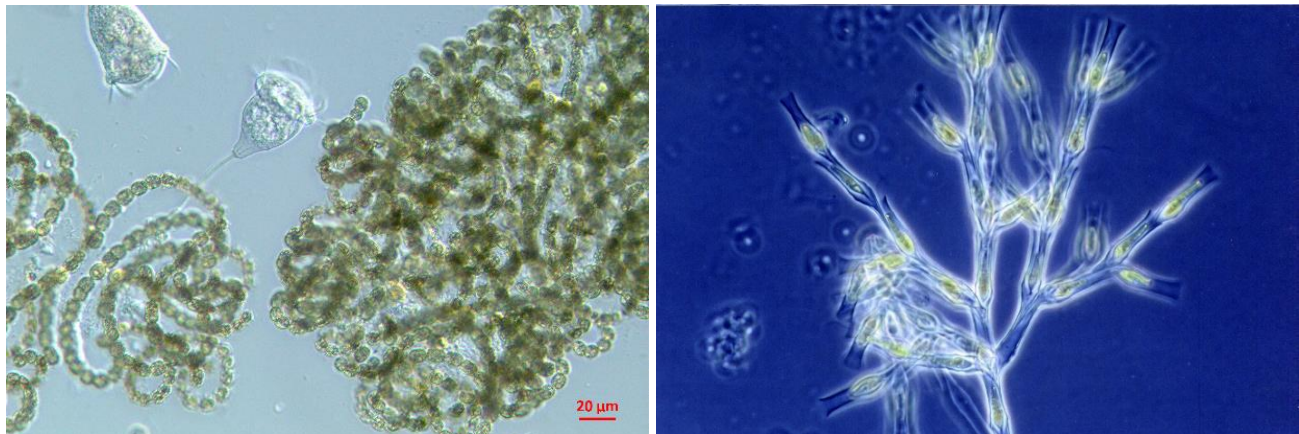


Fig. 6. Phytoplancton du Lac de Garde. A gauche, filaments de la cyanobactérie *Dolichospermum lemmermannii* avec des vorticellides attachés. A droite, la chrysophyte *Dinobryon divergens*. L'extraction de l'ADN fournit l'ADN génomique de tous les organismes présents dans un échantillon.



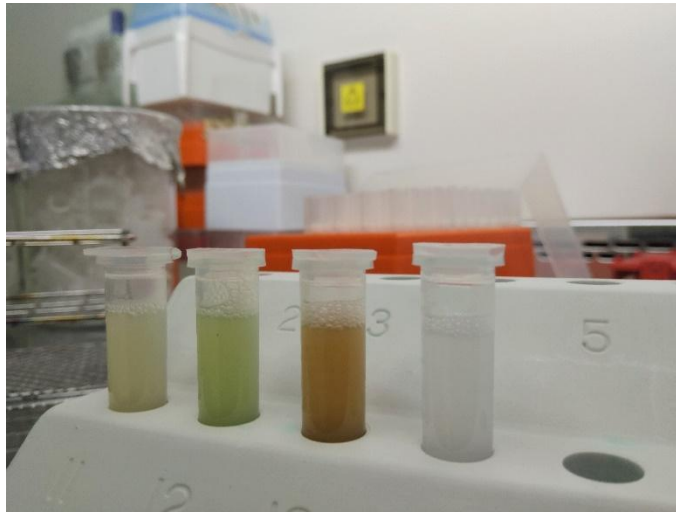
## Extraction de l'ADN à partir de biofilms

*Protocole Eco-AlpsWater appliqué aux biofilms en utilisant le kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL)*

L'étape méthodologique décrite ici est l'extraction de l'ADN, une étape critique pour obtenir des résultats pertinents puisque les inventaires moléculaires peuvent être influencés par la méthode d'extraction utilisée. La méthodologie d'extraction de l'ADN des biofilms a été choisie en testant 5 méthodes différentes basées sur divers types de lyse cellulaire et de purification de l'ADN à partir de cultures pures de diatomées et d'échantillons provenant de lacs et de rivières. Pour le projet Eco-AlpsWater, après avoir été échantillonnés dans des lacs ou des rivières (ex. Fig. 7), les biofilms sont stockés dans des tubes de 50 ml dans de l'éthanol et préservés à 4°C pendant un maximum de 3 mois avant l'extraction de l'ADN (l'extraction doit être effectuée de préférence dans le mois suivant l'échantillonnage). Le protocole d'extraction d'ADN présenté ci-dessous a été utilisé dans plusieurs études récentes axées sur l'application du métabarcoding des diatomées ; cette extraction est basée sur un protocole adapté du kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL) avec des modifications spécifiques pour l'extraction de l'ADN des biofilms.

Protocole:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd52i88e](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bd52i88e)



*Fig. 7. Extraction d'ADN à partir de biofilms de différents milieux aquatiques.*



## Extraction d'ADNe pour les inventaires de poissons (3 méthodes)

*(1) Protocole Eco-AlpsWater appliqué pour l'extraction d'ADNe de poisson à partir de la cartouche de filtration VigiDNA® en utilisant une adaptation du kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL)*

Le choix de la méthodologie d'extraction de l'ADN de poisson est basé sur des études précédentes, avec quelques adaptations pour le projet Eco-AlpsWater. Pour l'approche intégrée d'échantillonnage de l'ADNe poisson dans le cadre du projet Eco-AlpsWater, les échantillons d'eau sont collectés avec une cartouche de filtration VigiDNA® (0,45- $\mu\text{m}$ ), adaptée au traitement de grands volumes d'eau (30 litres). Après filtration, un tampon de conservation est ajouté à la cartouche qui est stockée à température ambiante jusqu'à l'extraction, qui doit être réalisée au plus tard dans le mois qui suit le prélèvement. Le protocole d'extraction d'ADN utilisé pour cette approche a été adapté du kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL) avec des modifications spécifiques. Le test du protocole a été réalisé dans le cadre du projet Eco-AlpsWater (Protocole Eco-AlpsWater appliqué pour l'extraction d'ADN poisson à partir de la cartouche de filtration VigiDNA® en utilisant une adaptation du kit NucleoSpin® Soil - MACHEREY-NAGEL).

Protocole:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.2.--8.2-fish dna extraction vigidna.pdf>

*(2) Protocole Eco-AlpsWater appliqué pour l'extraction d'ADNe de poisson à partir d'une cartouche Sterivex® conservée avec un tampon de préservation et utilisant une adaptation du kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL)*

Le choix de la méthodologie d'extraction de l'ADN de poisson est basé sur des études antérieures, et adapté aux cartouches de filtration Sterivex®. Pour l'approche d'échantillonnage ponctuel d'ADNe de poisson dans le cadre du projet Eco-AlpsWater, les échantillons d'eau (2 litres) sont collectés avec des cartouches de filtration Sterivex® (0,45- $\mu\text{m}$ ), après la filtration, les cartouches sont remplies de tampon de conservation et stockées à température ambiante jusqu'à l'extraction de l'ADN. L'extraction doit être effectuée dans un délai de 1 mois après le prélèvement. Le protocole d'extraction d'ADN présenté ci-dessous est basé sur un protocole adapté du kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL) avec des modifications spécifiques (protocole Eco-AlpsWater appliqué pour l'extraction d'ADN poisson à partir de cartouches Sterivex conservées avec un tampon de conservation et utilisant le kit NucleoSpin® Soil).

Protocole:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.2.--8.1-fish dna extraction sterivex.pdf>



### *(3) Extraction d'ADNe de poisson à partir de filtres en fibre de verre à l'aide du kit DNeasy PowerWater®*

Pour des raisons de comparaison, une méthodologie supplémentaire qui s'est avérée efficace lors de tests précédents pour l'extraction de l'ADNe de poisson est utilisée dans le cadre du projet Eco-AlpsWater. Pour l'approche d'échantillonnage ponctuel de l'ADNe de poisson, des échantillons d'eau (5 litres) ont été collectés dans des plans d'eau alpins et filtrés à travers des filtres en fibre de verre GFC (1,2  $\mu\text{m}$ ). Après la filtration, les échantillons sont stockés à -20 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN. L'extraction d'ADN est réalisée selon le protocole décrit par le fabricant (Qiagen) pour l'extraction à partir des membranes filtrantes (y compris GFC) à l'aide du kit DNeasy PowerWater.



*Fig. 8. Truites brunes juvéniles (Salmo trutta) dans une rivière alpine.*



## IV. Protocoles pour la préparation des librairies

### ADN (Fig. 1, étapes 3-4)

#### Librairies ADN pour le métabarcoding des diatomées

*Amplification par PCR du gène *rbcl* en vue d'analyses bioinformatiques et de la classification taxonomique des diatomées (Bacillariophyta, Fig. 9)*

Différentes études ont déjà révélé le potentiel des applications du métabarcoding pour les inventaires de diatomées en vue de l'évaluation de la qualité des eaux douces. Le choix du gène marqueur et de la région du code-barres est essentiel pour obtenir des inventaires pertinents de la diversité et une affectation taxonomique précise. Pour les diatomées benthiques, le gène *rbcl* s'est avéré être un marqueur taxonomique approprié pour la biosurveillance et une bibliothèque de référence de codes-barres bien fournie est déjà disponible pour attribuer des noms d'espèces aux séquences *rbcl* (R-Syst::diatom). Dans le cadre du projet Eco-AlpsWater, des échantillons de biofilms dans les rivières et au bord des lacs sont collectés et l'ADN est extrait. Nous présentons ci-dessous les différentes étapes du processus de travail basé sur l'ADN (c'est-à-dire l'amplification PCR des codes-barres sélectionnés, et les méthodes de laboratoire pour préparer la librairie pour le séquençage MiSeq). Ce protocole a été utilisé dans des études récentes où le métabarcoding des diatomées a été appliqué pour l'évaluation écologique des rivières.

Protocole:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd94i98w](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd94i98w)



Fig. 9. Espèces de diatomées sous microscope optique (*Diatoma*, *Achnantheidium*, *Navicula*).



## Librairies ADN pour le métabarcoding des bactéries

*Amplification par PCR de gènes de l'ARNr 16S en vue d'analyses bioinformatiques et de la classification taxonomique des bactéries (incluant les cyanobactéries).*

Ce protocole fournit les éléments de base qui ont été utilisés pour l'identification des bactéries dans le cadre du projet Eco-AlpsWater. Les analyses ont été appliquées à de l'ADN extrait d'échantillons collectés dans la colonne d'eau des lacs et dans des biofilms collectés dans les rivières et sur les rives des lacs (ex. Fig. 10). Le marqueur utilisé pour l'identification des bactéries est le gène de l'ARNr 16S, qui est encore largement utilisé dans la détermination taxonomique et les analyses phylogénétiques des communautés bactériennes. En particulier, l'amplification par PCR de ce marqueur dans l'ADN génomique extrait d'échantillons environnementaux a été réalisée en ciblant un fragment de ~ 460 pb (paires de bases) dans les régions variables V3-V4. Outre l'ensemble des classes bactériennes, les librairies moléculaires préparées de cette manière comprennent également des fragments d'ADN de cyanobactéries, qui sont l'un des éléments biologiques les plus importants dans la biosurveillance environnementale et dans la biosurveillance des eaux destinées à la consommation et aux loisirs. Les amorces PCR utilisées sont : 341F (5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3') et 805Rmod (5' GACTACNVGGGTWTCTAATCC 3') avec des adaptateurs Illumina en extension. Cette paire d'amorces a été largement utilisée dans l'évaluation de la biodiversité bactérienne dans les environnements aquatiques du monde entier. La préparation de la bibliothèque a suivi une procédure standard décrite dans le protocole indiqué ci-dessous.

Protocole:

[https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.3.1-10-validated\\_library\\_prep\\_16s.pdf](https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.3.1-10-validated_library_prep_16s.pdf)



*Fig. 10. Bloom cyanobactérien de *Planktothrix rubescens* dans le lac Ledro (Alpes italiennes).*



## Librairies ADN pour le métabarcoding des protistes

*Amplification par PCR de gènes de l'ARNr 18S en vue d'analyses bioinformatiques et de la classification taxonomique des protistes (y compris les microalgues)*

Les protistes constituent un assemblage polyphylétique d'organismes eucaryotes qui comprend des groupes très diversifiés, certains étant plus étroitement apparentés aux plantes, aux champignons ou aux animaux qu'aux autres protistes. Outre les protistes hétérotrophes et les champignons microscopiques, les protistes photosynthétiques et mixotrophes, ou "algues", sont présents dans de nombreux supergroupes avec de nombreux autres protozoaires, à l'exception des Archaeplastida, qui forment un groupe à part. Ce protocole fournit les éléments de base qui ont été utilisés dans le cadre du projet Eco-AlpsWater pour l'identification des protistes par métabarcoding. Les analyses ont été appliquées à de l'ADN extrait d'échantillons collectés dans la colonne d'eau des lacs et dans les biofilms de rivières et de lacs (voir sections précédentes). Le marqueur utilisé pour l'identification des protistes est le gène de l'ARNr 18S. L'amplification par PCR des gènes de l'ARNr 18S est effectuée en ciblant un fragment de ~380 pb de la région variable V4 du gène de l'ARNr 18S en utilisant l'ensemble d'amorces spécifiques : TAREuk454FWD1 (5' CCAGCASCYGC GGTAATTCC 3') et TAREukREV3\_modifié (5' ACTTTCGTTCTTGATYRATGA 3'). Cette paire d'amorces a été largement utilisée dans l'évaluation de la biodiversité microeucaryote dans les environnements aquatiques. La préparation de la bibliothèque de gènes d'ARNr 18S a suivi une procédure standard décrite dans le protocole indiqué ci-dessous.

Protocole:

[https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.3.1-11-validated\\_library\\_prep\\_18s.pdf](https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.3.1-11-validated_library_prep_18s.pdf)

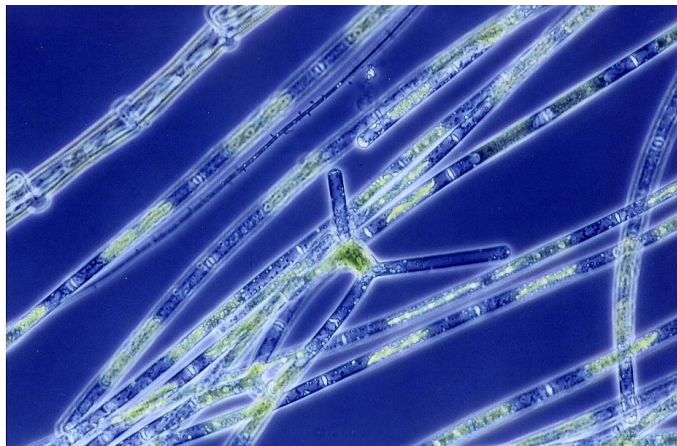


Fig. 11. La microalgue verte *Mougeotia* sp. du Lago di Garda, Italie ; les filaments ont une largeur d'environ 7  $\mu$ m.





## Librairies ADN pour le metabarcoding des poissons

*Amplification par PCR de gènes de l'ARNr 12S en vue d'analyses bioinformatiques et de la classification taxonomique des poissons*

L'objectif de ce document est de fournir une description détaillée du protocole de préparation des librairies Illumina pour les analyses de metabarcoding de l'ADNe des communautés de poissons d'eau douce ; ce protocole a été préalablement évalué et vérifié par un test d'intercalibration. Ce protocole a été utilisé à la plateforme de séquençage et de génotypage de FEM (IT) pour l'analyse des échantillons collectés en 2019 dans le cadre du projet Eco-AlpsWater. Le protocole dans sa forme actuelle reste toutefois perfectible et l'évaluation de la réplicabilité et de la robustesse des approches basées sur différents protocoles est encore en cours de test.

Protocole:

[https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.1.2.-12library\\_preparation\\_12s.pdf](https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.1.2.-12library_preparation_12s.pdf)



*Fig. 12. European eel (Anguilla anguilla), a snake-like, migratory fish species.*



## V. Protocoles pour les analyses bioinformatiques des données de lectures ADN (Fig. 1, étapes 5-6)

### Pipelines bioinformatiques pour le métabarcoding des diatomées (gène *rbcl*)

*Pipeline bioinformatique de métabarcoding de l'ADN des diatomées, utilisant le logiciel "Mothur", pour traiter les lectures ADN obtenu par Illumina Miseq sur une portion de gène de *rbcl* (312 bp).*

Ce protocole décrit en détail les principales étapes des processus bioinformatiques appliqués pour analyser les données de séquençage à haut débit (HTS), en particulier pour le métabarcoding des diatomées.

Protocole:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.3.--1-bioinformatic-diatoms.pdf>

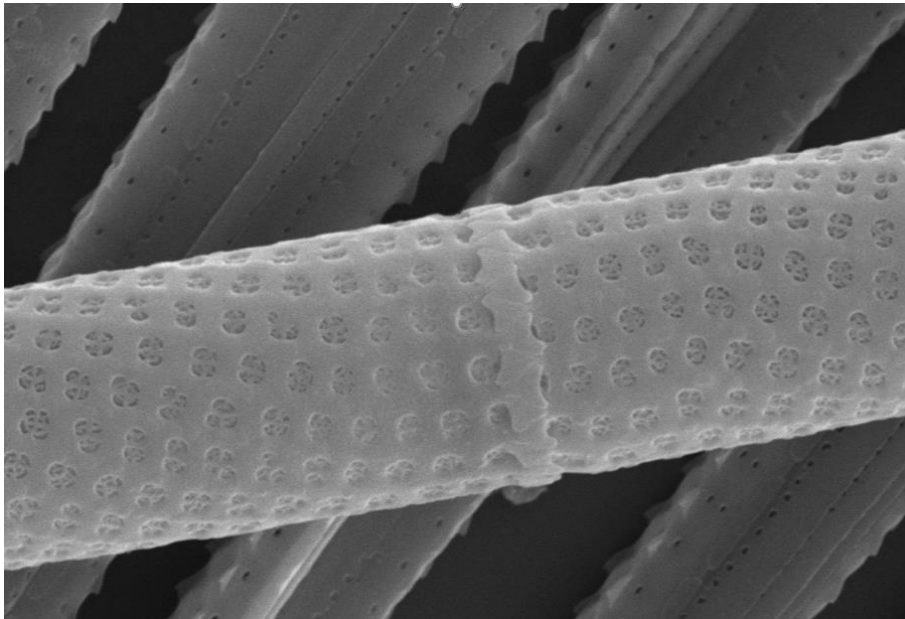


Fig. 13. Micrographie électronique à balayage d'*Aulacoseira granulata* et (arrière-plan) de *Fragilaria crotonensis* du Lac de Garde.



## Pipeline bioinformatique pour le métabarcoding des bactéries (gène ARNr 16S)

### *Analyse bioinformatique sur les lectures ADN du gène de l'ARNr 16S et du pipeline DADA2*

Ce protocole détaille les principales étapes du pipeline bioinformatique appliqué pour analyser les données issues du gène de l'ARNr 16S, obtenues par séquençage à haut débit (HTS), spécifiquement pour la détermination taxonomique des bactéries et cyanobactéries (Fig. 14). Le pipeline est basé sur l'identification de séquences exactes (Amplicon Sequence Variants, ASVs) en utilisant l'approche DADA2. Le protocole et les fichiers de test peuvent être téléchargés sur le site Zenodo.

Protocole:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5232772>

Fichiers test:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5215815>

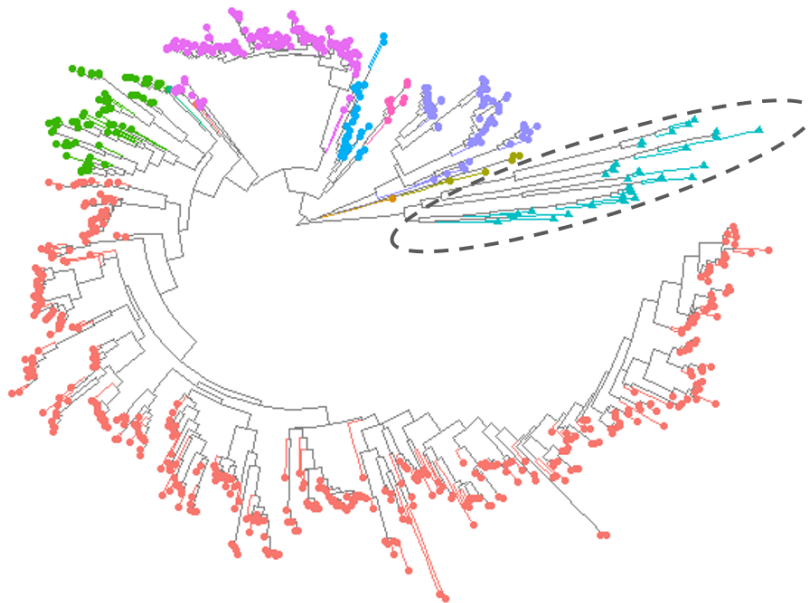


Fig. 14. Arbre phylogénétique basé sur l'alignement du gène de l'ARNr 16S (environ 400 pb) obtenu avec les techniques HTS dans la région de l'Espace alpin (projet Eco-Alpswater). Seules les séquences les plus abondantes (ASVs) ont été incluses dans l'analyse. Par rapport aux techniques traditionnelles, les approches métagénomiques environnementales permettent d'explorer des groupes auparavant indétectables, tels que les bactéries non photosynthétiques (ligne pointillée grise). D'autres groupes plus nombreux comprennent les Cyanobacterales (orange), les Limnotrichales (vert) et les Synechococcales (violet).



## Pipelines bioinformatiques pour le métabarcodng des protistes (gène ARNr 18S)

*Analyses bioinformatiques appliquées pour les inventaires de protistes (y compris les microalgues) en ciblant le gène de l'ARNr 18S et à l'aide du pipeline DADA2.*

Ce protocole détaille les principales étapes du pipeline bioinformatique appliqué à l'analyse des données du gène de l'ARNr 18S par séquençage à haut débit (HTS), spécifiquement pour le métabarcoding des protistes et des microalgues (Fig. 15). Le pipeline est basé sur l'identification de séquences exactes (Amplicon Sequence Variants, ASVs) en utilisant l'approche DADA2. Le protocole et les fichiers de test peuvent être téléchargés sur le site Zenodo.

Protocole:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5233527>

Fichiers test:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5215919>

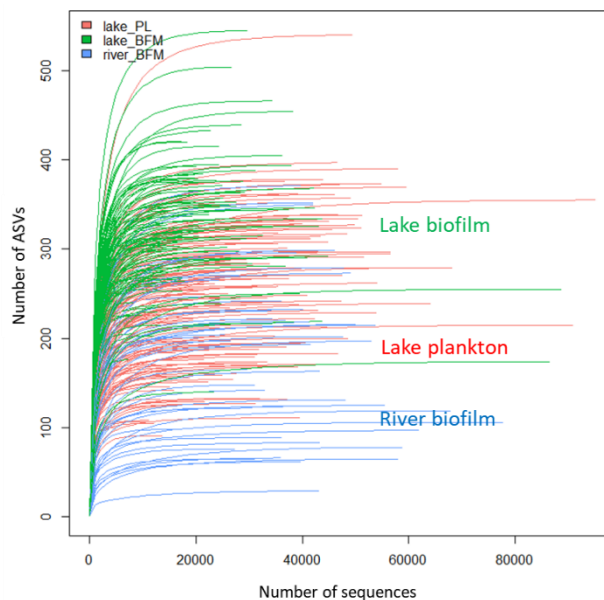


Fig. 15. Courbes de raréfaction des protistes et des champignons montrant l'augmentation du nombre d'ASVs avec l'augmentation du nombre de séquences. La raréfaction est utilisée pour estimer la richesse en ASVs pour un nombre donné de séquences. Dans la figure, chaque courbe correspond à un seul échantillon. En moyenne, le plus grand nombre d'ASVs est trouvé dans le biofilm des lacs.



## VI. Harmonisation des approches dans la Communauté européenne et en Suisse

L'adoption d'approches et de protocoles transnationaux communs pour la surveillance de la qualité de l'eau dans la région alpine est l'un des principaux objectifs du projet Eco-AlpsWater. Dans ce domaine, la plupart des pays adoptent des méthodes nationales/régionales conformes à la DCE. Cependant, de nombreuses différences entre les pays ont été soulignées. De plus, la Suisse, en tant que pays non membre de l'UE, applique des méthodes basées sur l'ordonnance suisse sur la protection des eaux (WPO). Il est donc recommandé d'harmoniser les méthodes d'évaluation de la qualité de l'eau dans la région alpine. Le projet EAW a évalué comment des approches innovantes basées sur l'ADNe et les technologies HTS pourraient combler les lacunes et les faiblesses des méthodes traditionnelles, afin de développer une approche de surveillance de nouvelle génération partagée par les pays de l'espace alpin.

Les six lacs (Bled, Bourget, Garda, Lugano, Mondsee et Starnberg) et les cinq rivières (Adige, Drome, Soča, Steyr et Wertach), sélectionnés comme sites pilotes dans le projet Eco-AlpsWater, ont été utilisés pour une comparaison des méthodes adoptées dans la détermination de l'état écologique sur la base des éléments de qualité biologique (phytoplancton, phytobenthos et poissons). Cette vaste étude dans la région alpine a mis en évidence les faiblesses et le potentiel de mise en œuvre des approches intra et inter pays, dans le contexte des processus d'intercalibration précédents.

### Exigences de l'EU-WFD et du CH-WPO

Les pays de la région alpine, appartenant à l'UE, adoptent des méthodes régionales/nationales basées sur la DCE. Ces dernières années, des processus d'intercalibration (IC) ont été réalisés, ce qui a permis d'harmoniser les approches entre les pays (par exemple, le phytoplancton). Bien que des indices différents soient utilisés dans chaque pays, l'évaluation de l'état écologique est rapportée en cinq classes de qualité (élevé, bon, modéré, faible, mauvais) pour une comparaison correcte des masses d'eau (<https://ec.europa.eu/environment/pubs/pdf/factsheets/water-framework-directive.pdf>).

En Suisse, la Procédure modulaire suisse par étapes a été développée, ce qui implique des classes d'état comparables au système de classes écologiques défini dans la DCE. Sur la base de la DCE, des méthodes de détermination de l'état écologique à l'aide des éléments de qualité biologique ont été conçues par l'Office fédéral de l'environnement (OFEV). Toutefois, ces protocoles constituent des lignes directrices pour les cantons, qui ont le pouvoir législatif de décider des modalités de leur application sur leur propre territoire. Pour l'instant, seules les méthodes concernant les diatomées et les poissons dans les rivières ont été publiées. Néanmoins, au fil des ans, chaque canton a également appliqué des protocoles internes (par exemple pour le phytoplancton) et la normalisation au niveau fédéral est en cours de développement. De plus, les eaux transfrontalières (Suisse-UE) sont sous le contrôle de commissions internationales (CIPAI, CIPEL, IGKB) qui ont des objectifs spécifiques et impliquent différents types d'indicateurs de qualité, parfois différent de la DCE et de la WPO. Par exemple, dans le lac de Lugano, à la frontière entre la Suisse et l'Italie, les conditions de référence varient selon les réglementations concernées : dans la DCE, le bon état écologique doit être atteint ou maintenu ; dans la WPO, un état écologique proche de l'état naturel doit être atteint, avec une



diversité et une abondance d'espèces spécifiques aux eaux non polluées ou faiblement polluées ; dans la CIP AIS, l'état de référence est représenté par des conditions mésotrophes. Les différentes approches adoptées en Suisse pour l'évaluation de la qualité des eaux illustrent clairement les besoins d'homogénéisation.

Outre la Suisse, l'enquête menée d'abord dans les principaux lacs et rivières, puis étendue à l'ensemble de la région alpine, a également mis en évidence des différences dans l'application de la DCE entre les pays de l'UE. Dans quelques pays, la standardisation des méthodes pour certains BQE est encore en cours de développement ou n'a pas encore commencé. Les principales différences concernent le phytobenthos, qui est en cours de mise en œuvre. Un résumé de l'application des méthodes BQE pour l'évaluation de la qualité de l'eau dans la région alpine est présenté en tableau 1 ; les similitudes et différences dans la région alpine sont présentées en tableau 2.

*Tableau 1. Un résumé de l'application des méthodes BQE pour l'évaluation de la qualité de l'eau dans la région alpine (phytoplancton, diatomées et microalgues benthiques, et poissons).*

Méthodes BQE		Phytoplancton	Diatomées benthiques	Microalgues benthiques (sauf diatomées)	Poissons
<b>Autriche</b>	<b>Lacs</b>	Oui	non	Oui	Oui
	<b>Rivières</b>		Oui	Oui	Oui
<b>France</b>	<b>Lacs</b>	Oui	non *	non	Oui
	<b>Rivières</b>		Oui	non	Oui
<b>Italie</b>	<b>Lacs</b>	Oui	Oui	non	Oui
	<b>Rivières</b>		Oui	Oui †	Oui
<b>Allemagne</b>	<b>Lacs</b>	Oui	Oui	non	Oui
	<b>Rivières</b>		Oui	Oui †††	Oui
<b>Slovénie</b>	<b>Lacs</b>	Oui	Oui	Oui ††	Oui
	<b>Rivières</b>		Oui	Oui ††	Oui
<b>Suisse</b>	<b>Lacs</b>	Oui	non	non	non
	<b>Rivières</b>		Oui	non	Oui

\* méthode en cours de développement

° méthode disponible au niveau du canton

† Les microalgues benthiques sont prises en compte dans la surveillance des macrophytes de rivière lorsqu'elles forment des agrégats macroscopiques.

†† limitée à des groupes d'algues spécifiques

††† méthode disponible, mais non appliquée dans le projet

La comparaison fine des caractéristiques des méthodes BQE adoptées dans les principaux lacs et rivières a montré une bonne cohérence, ce qui soutient la faisabilité de l'homogénéisation. Comme indiqué dans le tableau ci-dessus, la méthode adoptée pour la surveillance du phytoplancton dans les lacs est presque entièrement partagée entre les pays, sauf pour la fréquence d'échantillonnage. Comme nous l'avons vu précédemment, la surveillance du phytobenthos est en cours de mise en œuvre, et certains pays ont appliqué cette BQE exclusivement sur les rivières. De plus, dans certains pays, les algues vertes filamenteuses sont également incluses (par exemple en Slovénie), alors que dans la plupart des pays, seules les diatomées sont prises en compte. Deux autres aspects principaux varient dans la surveillance du phytobenthos : le nombre de stations d'échantillonnage et la fréquence d'échantillonnage. Ces caractéristiques varient également dans la surveillance des poissons, ce qui suggère une amélioration potentielle des méthodes traditionnelles.



Tableau 2. Similitudes et différences dans la région alpine : surveillance des lacs et des rivières pour le phytoplancton, le phytobenthos et les poissons.

Éléments biologiques		Similitudes	Différences
Phytoplancton	Lacs	Point d'échantillonnage (profondeur maximale) Profondeur d'échantillonnage (épilimnion/profondeureuphotique) Biovolume (Utermöhl) et Chlorophylle-a (ISO) Identification au niveau des espèces	Fréquence d'échantillonnage
Phytobenthos	Lacs	Période d'échantillonnage Types de substrats Habitat Identification au niveau de l'espèce/genre	Communauté biologique (phytobenthos autre que les diatomées) Nombre de stations d'échantillonnage Fréquence d'échantillonnage
	Rivières	Période d'échantillonnage Caractéristiques du site d'échantillonnage Types de substrats Habitat Identification au niveau de l'espèce/genre	Communauté biologique (phytobenthos autre que les diatomées) Nombre de stations d'échantillonnage Fréquence d'échantillonnage
Poissons	Lacs	Période d'échantillonnage Stratégies d'échantillonnage Identification au niveau des espèces	Nombre de stations d'échantillonnage (surface/profondeur)
	Rivières	Période d'échantillonnage Stratégies d'échantillonnage Habitat Identification au niveau de l'espèce	Nombre de stations d'échantillonnage Fréquence d'échantillonnage

Les différences mises en évidence plaident pour l'utilisation des méthodes ADNe-HTS pour aller vers une amélioration et homogénéisation des approches dans la région alpine. En plus de la potentialité de la méthode ADNe-HTS dans l'étude de la biodiversité, cette méthode pourrait aider à augmenter la couverture spatio-temporelle et taxonomique dans la surveillance, en réduisant le temps et le coût de l'analyse. Les protocoles innovants présentés par Eco-AlpsWater ont été adaptés à la surveillance traditionnelle de la DCE/WPO, afin d'explorer en profondeur la biodiversité des écosystèmes aquatiques et de fournir un inventaire plus complet des taxons. Ce processus a été possible grâce à la coopération avec les observateurs et les parties prenantes, qui ont fourni leurs commentaires pour l'ajustement des approches.



## Les approches de surveillance prochaine génération

L'intégration de méthodes innovantes basées sur les analyses d'ADNe et les technologies HTS dans les prochaines approches de surveillance pour l'évaluation de la biodiversité et de l'état écologique des masses d'eau a été accueillie favorablement par les parties prenantes et les décideurs. Ils ont identifié des avantages et des opportunités potentielles :

- Plus d'informations obtenues par un seul échantillonnage.
- Augmentation de la couverture spatio-temporelle dans la surveillance.
- Possibilité d'échantillonner des endroits difficiles d'accès et d'étudier des environnements complexes.
- Investigation d'une plus grande partie de la biodiversité, y compris les groupes biologiques dont la taxonomie est complexe et prend du temps, et les taxons qui ne sont pas encore surveillés, ce qui permet d'obtenir un inventaire plus complet sur le plan taxonomique et de répondre à des questions écologiques supplémentaires.
- Détection d'espèces non indigènes et indigènes (par exemple, rares).
- Détection d'agents pathogènes et de vecteurs
- Réduction des approches invasives/destructives (par exemple pour les poissons et dans les écosystèmes vulnérables).
- Plus rapide, moins cher (analyse possible de nombreux échantillons).

Tous ces aspects favorables plaident pour l'utilisation de l'approche ADNe comme un outil complémentaire aux méthodes existantes pour l'évaluation de l'état écologique et la gestion de l'eau, et comme un moyen de faciliter l'harmonisation des approches de l'UE et de la CH. Pour atteindre cet objectif, des stratégies nationales sont nécessaires, y compris une standardisation des approches ADNe, l'établissement de bases de données de référence plus exhaustives, et l'acquisition de nouvelles compétences par les agences environnementales en charge de la surveillance de la qualité de l'eau. En conclusion, l'approche innovante transnationale représente un élément stratégique visant à améliorer la protection, la conservation et la connectivité écologique des écosystèmes de l'Espace Alpin, et a le potentiel d'être appliquée même à une échelle européenne plus large.





## VII. FAQ - perspectives générales

Nous avons recueilli des questions (FAQ) sur l'approche du métabarcoding lors de nos réunions avec les parties prenantes, opérateurs de terrain et décideurs. Nous fournissons ici quelques réponses générales, mais vous pouvez également trouver des réponses d'un point de vue scientifique sur notre page web ([FAQ Catalogue](#)).

*Pourquoi plusieurs amorces sont-elles utilisées dans l'approche de métabarcoding Eco-AlpsWater ?*

Nous avons besoin de plusieurs amorces car différentes régions de l'ADN cible sont utilisées pour distinguer de manière précise (niveau espèce) les organismes appartenant à des groupes phylogénétiques très divers (ex les bactéries, les microalgues et les poissons).

*Quelles sont les causes de l'incapacité à atteindre une résolution taxonomique fine (au niveau des espèces) avec l'approche de métabarcoding d'Eco-AlpsWater pour certaines microalgues ?*

Les microalgues appartiennent à des phyla très différents de l'arbre de l'évolution. Nous avons donc utilisé des marqueurs généralistes pour détecter les assemblages microbiens globaux. Ces marqueurs ont permis de retrouver un grand nombre d'espèces (dont certaines peu connues), mais à l'inverse, ils n'ont pas réussi à détecter les niveaux taxonomiques fins de certaines espèces indicatrices traditionnelles. De plus, plusieurs espèces qui ont été décrites dans la littérature ne sont pas encore représentées dans les bases de données de référence moléculaires.

*Comment comparer les inventaires de taxons avec un mélange d'espèces, de genres et d'ordres ?*

Les méthodes HTS et de microscopie optique peuvent détecter le même genre, mais des espèces différentes, ou s'arrêter au genre uniquement. L'outil d'analyse des taxons d'Eco-AlpsWater fournit des tableaux de correspondance sur le genre ou sur les espèces séparément pour les cyanobactéries et les micro-algues eucaryotes.

*Comment interpréter le nom de l'espèce figurant sous plusieurs séquences d'ADN dans les résultats du métabarcoding ?*

Le nombre de séquences d'ADN (variants de séquence d'amplicon, ASV, ou oligotypes), qui appartiennent à une espèce (taxon) unique, est un indicateur potentiel de la diversité génétique intra-spécifique (intra-taxon). L'outil d'analyse des taxons d'Eco-AlpsWater rassemble toutes les séquences qui appartiennent au même taxon et agrège le résultat en un seul enregistrement "présent".



*Comment sélectionner mes taxons cibles ? Je vois des listes de sortie de métabarcoding avec de nombreux noms de taxons dont je n'ai jamais entendu parlé auparavant.*

Les noms de taxons dans les listes de métabarcoding sont actualisés, et donc, de nombreux noms biologiques peuvent être nouveaux pour l'utilisateur. Les utilisateurs ne connaissent que ceux du suivi traditionnel, avec des noms de taxons souvent synonymes des noms de taxons mis à jour et regroupés dans une systématique ancienne. Les codes communs et les noms de taxons pour le phytoplancton et les diatomées benthiques sont utilisés dans l'outil d'analyse des taxons d'Eco-AlpsWater pour comparer les listes.

*Combien de temps l'ADNe reste-t-il dans l'eau ? L'ADNe de différents organismes est-il différemment résistant ? Combien de temps les organismes morts peuvent-ils excréter de l'ADNe ?*

Par le terme "ADN environnemental" (ADNe), nous entendons l'ensemble du matériel héréditaire de tous les organismes qui sont (ou ont été) présents dans l'environnement. Ce matériel génétique peut provenir directement des cellules des micro-organismes prélevés avec l'eau (par exemple, des algues ou des bactéries microscopiques). Chez les organismes plus grands (par exemple les poissons ou les humains), il est transféré dans l'environnement par les sécrétions corporelles, les peaux mortes, les poils et peut être stocké sous forme de molécules d'ADN dans l'environnement aquatique pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines. La stabilité de l'ADN dans le milieu aquatique dépend des conditions du milieu (température, pH, oxygène, lumière et autres substances présentes dans l'eau). Si l'ADN est piégé dans les sédiments au fond des plans d'eau, il peut y rester pendant des années ou des décennies, voire des millénaires dans certains cas, ce qui ouvre la porte à la recherche paléoécologique. Dans la colonne d'eau la durée de détection de l'ADN émit par les poissons a été étudié et varie de quelques dizaines d'heures à quelques jours, selon les conditions physico-chimiques et hydrodynamiques.

*Pourquoi avoir exclu les macrophytes et les invertébrés benthiques de tous les paramètres biologiques?*

En raison des contraintes financières du projet, ces deux éléments biologiques, par ailleurs extrêmement importants, n'ont pas été inclus.

*Le gène de l'ARNr 18S peut-il détecter les Euglena et autres euglènes?*

En général, aucune paire d'amorces ne peut cibler tous les protistes de manière égale. La paire d'amorces spécifique qui a été choisie pour amplifier le gène de l'ARNr 18S n'a pas pu détecter les euglènes dans les échantillons d'eau. Au lieu de cela, nous utilisons les informations du gène de l'ARNr 16S du chloroplaste pour détecter ce groupe.



### *Quel niveau taxonomique est atteignable avec quel marqueur?*

Cela dépend des groupes d'organismes et des régions génétiques sélectionnées, ainsi que de l'exhaustivité des bases de données de référence. Alors que les marqueurs génétiques des diatomées sont très bien conservés et spécialisés, les marqueurs utilisés ici pour les bactéries et le phytoplancton sont plus généraux. Par conséquent, le premier marqueur (rbcl) permet d'obtenir des classifications et assignations taxonomiques plus détaillées, tandis que le second groupe de marqueurs (ARNr 16S et 18S) détecte principalement les genres ou les rangs taxonomiques supérieurs. Pour identifier les organismes au niveau des espèces, il convient d'utiliser des amorces très spécifiques en relation avec des bases de données de référence taxonomiques spécifiques, curées et les plus complètes possible. Afin d'exploiter pleinement les informations présentes dans les séquences, des analyses phylogénétiques supplémentaires devraient également être effectuées pour soutenir et compléter les classifications obtenues à partir des pipelines bioinformatiques ou des analyses BLAST.

### *Quels taxons ont été détectés avec chaque marqueur dans le jeu de données Eco-AlpsWater?*

La liste complète des taxons et des génotypes détectés à l'aide du HTS dans l'ensemble de données d'Eco-AlpsWater est donnée dans la liste de taxonomie HTS de chaque marqueur. En se concentrant sur les espèces ou les genres des bio-composants (reliés aux codes communs d'Eco-AlpsWater), nous avons détecté 88 cyanobactéries, 582 taxa phytoplanctoniques (à l'exclusion des cyanobactéries), 226 diatomées et 54 taxa de poissons, dont beaucoup avec plusieurs génotypes. Les listes sont incluses dans l'outil d'analyse des taxons d'Eco-AlpsWater.

### *Quelles exigences logistiques spécifiques sont nécessaires lors de l'échantillonnage d'ADN à partir d'échantillons de plancton?*

Le projet Eco-AlpsWater recommande des filtres encapsulés stériles (Sterivex), des bouteilles exemptes d'ADN (nettoyées spécifiquement) et l'utilisation de gants pour réduire la contamination, mais vous trouverez tous les détails dans notre vidéo YouTube et les protocoles d'échantillonnage. Le stockage par congélation des filtres jusqu'à l'extraction de l'ADN jusqu'à 9 mois a été un succès dans notre test.

### *Qui m'aide à interpréter les résultats d'HTS lorsque des taxons inconnus ont été enregistrés?*

Des analyses supplémentaires, telles que les requêtes BLAST, peuvent permettre de mieux comprendre les taxons et groupes taxonomiques étroitement liés. Des bases de données de référence génétiques améliorées, qui sont conservées pour un groupe taxonomique spécifique et/ou des écorégions, peuvent augmenter la précision des classifications d'espèces.

### *En quoi consiste une analyse BLAST effectuée pour les cyanobactéries ?*

Pour les cyanobactéries et d'autres groupes taxonomiques biologiques, l'attribution automatique des taxons a été améliorée en utilisant des séquences de référence issues de la littérature taxonomique



pertinente, c'est-à-dire en utilisant des isolats (souches) (morphologiquement décrits) et en procédant à un blasting manuel contre les ASV de cyanobactéries obtenus. Les changements induits par BLASTn dans le nom du taxon pour les ASVs 16S sélectionnés ont été marqués dans l'outil d'analyse des taxons d'Eco-AlpsWater.

### *Comment fonctionne la méthode VigiDNA® d'échantillonnage de l'ADNe des poissons ?*

VigiDNA® est le nom de produit des cartouches filtrantes, utilisées dans le projet Eco-AlpsWater pour analyser la biodiversité des poissons dans les eaux alpines. Ces cartouches filtrantes fermées et encapsulées (VigiDNA®, Spygen®) sont utilisées pour filtrer de grands volumes d'eau (jusqu'à 30 litres ou plus) collectés le long des rives des lacs ou au milieu des rivières. Après filtration, la cartouche filtrante est remplie d'un tampon de conservation et stockée à température ambiante jusqu'à l'extraction de l'ADN.

### *Quels sont les types de rivières qui conviennent pour être analysés à l'aide du système VigiDNA® ?*

En principe, ce système convient à tout type de rivière et permet de filtrer jusqu'à 30 litres d'eau avec une seule cartouche. Cependant, il peut s'avérer difficile dans les rivières où la charge en particules de l'eau est élevée, car les sédiments fins peuvent boucher le filtre avant que les 30 litres souhaités aient été filtrés. Il est donc conseillé d'ajuster l'échantillonnage en conséquence, par exemple en évitant de prélever des échantillons pendant ou peu après les inondations.

### *Quelle paire d'amorces est utilisée pour l'analyse de l'ADNe des poissons ?*

Pour le séquençage des échantillons d'ADNe de poisson, les amorces MiFish-U ont été utilisées. Cette paire d'amorces est régulièrement utilisée pour les études de metabarcoding de poissons. D'autres amorces existent ; chaque paires d'amorces a des avantages et limitent spécifiques (voir travaux de synthèse publiés récemment).

### *Les détections d'ADNe peuvent-elles être attribuées à un tronçon de rivière spécifique ?*

Cela dépend du plan d'échantillonnage. Comme l'ADNe est constamment transporté en aval dans les rivières, seules les espèces de poissons présentes en amont du point d'échantillonnage peuvent être détectées dans l'analyse de suivi.

### *Peut-on déduire le nombre d'individus à partir de la fréquence des séquences détectées par espèce ?*

Non, jusqu'à présent il n'est pas possible de faire des déclarations précises sur les abondances absolues des différentes espèces de poissons sur la base du nombre de lectures détectées. Néanmoins les quantités relatives d'ADN sont bien en lien avec la biomasse, le nombre ou l'activité des espèces.



---

*Quelles différentes approches pour l'évaluation de l'ADNe des poissons ont été utilisées dans le cadre du projet Eco-AlpsWater ?*

Au total, 3 approches différentes ont été utilisées. L'approche VigiDNA, où 30 litres d'eau sont filtrés à travers une cartouche filtrante encapsulée. L'approche d'échantillonnage ponctuel utilisant les capsules Sterivex® (porosité de 0,45  $\mu\text{m}$ ), où 2 litres d'eau ont été collectés au début, au milieu et à la fin de chaque transect. Et une approche d'échantillonnage ponctuelle GFC (filtre en fibre de verre, porosité nominale de 1,2  $\mu\text{m}$ ), où 5 litres d'eau ont été collectés aux sites d'échantillonnage traditionnels.



Rejoignez notre réseau alpin Eco-AlpsWater à l'adresse suivante :

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/en/project-results/Eco-AlpsWater-alpine-network>

et suivez nos activités Eco-AlpsWater plus en détail !



Cette brochure a été créée dans le cadre du projet Eco-AlpsWater, qui est partiellement financé par l'Union européenne à partir du Fonds européen de développement régional (soutien de l'UE : 1 447 666,54 €). Le projet a été mis en œuvre dans le cadre du programme de coopération transnationale INTERREG Alpine pour la période 2014-2020.

