

# Intérêt du DNA-metabarcoding dans la bioévaluation des cours d'eau peu profonds basée sur le compartiment des macroinvertébrés benthiques

Albin Meyer<sup>1</sup>, Philippe Usseglio-Polatera<sup>1</sup>, Alice Valentini<sup>2</sup>, Frédéric Boyer<sup>3</sup>,  
Jean-Nicolas Beisel<sup>4</sup>, Aurélie Bonin<sup>3</sup>, Jonathan Bouquerel<sup>1</sup>, Tony Dejean<sup>2</sup>,  
G. Francesco Ficetola<sup>5</sup>, Philippe Wagner<sup>1</sup>, Pierre Taberlet<sup>2</sup>

1 - Lab Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC-CNRS UMR 7360), Université de Lorraine, Metz, France

2 - SPYGEN, Le Bourget du Lac, France

3 - Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA-CNRS UMR 5553), Univ. Grenoble Alpes, Grenoble, France

4 - Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement de Strasbourg, Strasbourg, France

5 – Département de Biosciences, Université de Milan, Italie

# Un protocole normalisé homogène utilisé depuis 2007

## Bioévaluation des cours d'eau peu profonds



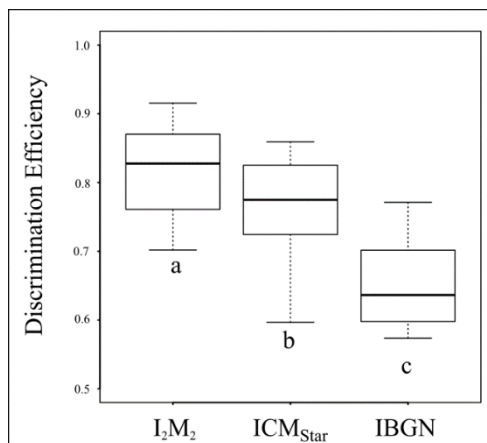
IBGN (norme NF T90-350, 1992, 2004)



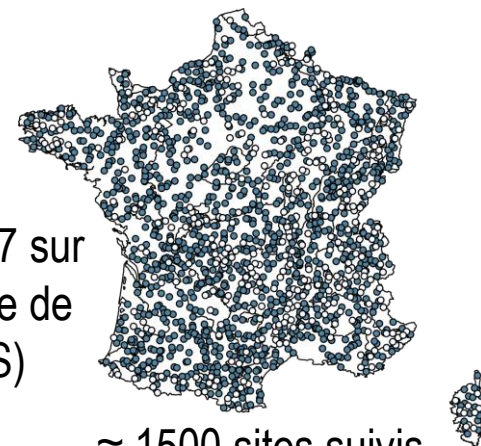
Faible DCE-compatibilité

- ➡ Nouveau protocole de **terrain**  
Norme AFNOR NF T90-333 (Sept. 2016)
- ➡ Nouveau protocole de **laboratoire**  
Norme AFNOR XP T90-388 (Juin 2010)
- ➡ Nouvel **indice multimétrique**  
L'Indice Invertébrés Multimétrique ( $I_2M_2$ , Mondy *et al.* 2012)

➡ **Meilleur pouvoir de discrimination**  
(sur 17 types de pression)



Appliqué depuis 2007 sur le réseau de contrôle de surveillance (RCS)



≈ 1500 sites suivis annuellement

➡ Effort d'échantillonnage **plus élevé** (12 vs 8 relevés)

➡ Effort de tri/détermination (générique) **plus élevé**

➡ **Coût de l'évaluation plus important**

# Quel apport des analyses ADN en bioévaluation ?

## Quatre phases



1 – Echantillonnage (terrain)



2 - Tri au laboratoire



Un gain de temps sur cette opération longue et fastidieuse est-il possible ?



3 - Identification taxonomique



Peut-on fiabiliser les identifications difficiles ? (jeunes stades, individus altérés)



Peut-on obtenir plus d'information écologique par une identification plus précise ?



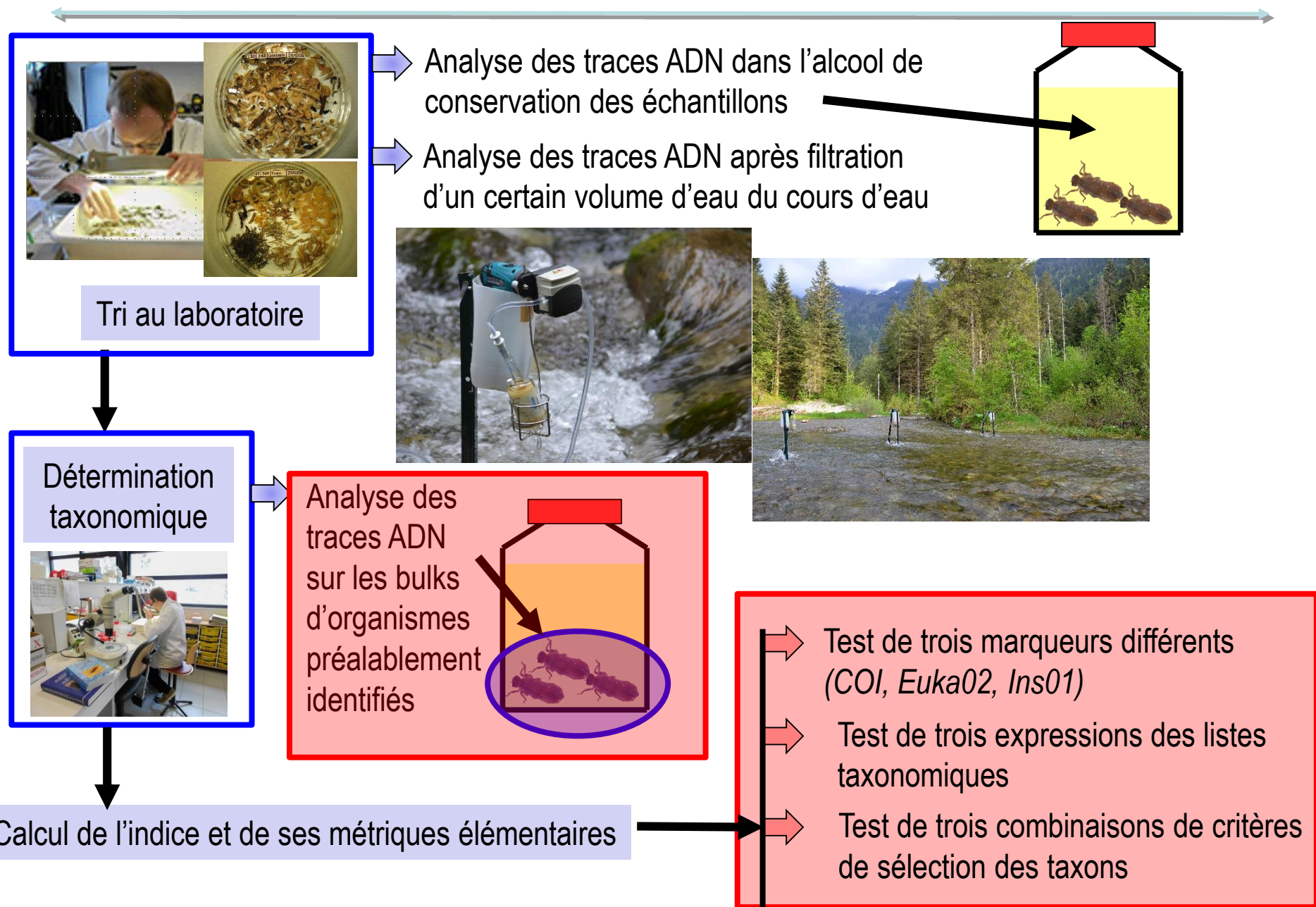
4 - Calcul de l'indice et de ses métriques élémentaires

➡ Quelle capacité à recalculer l'I<sub>2</sub>M<sub>2</sub> ?

➡ Une forme de quantification des abondances taxonomiques est-elle utilisable ?

➡ **Objectif : Fiabilisation et réduction du coût de l'évaluation**

## Comment le tester ?



## Plan d'échantillonnage

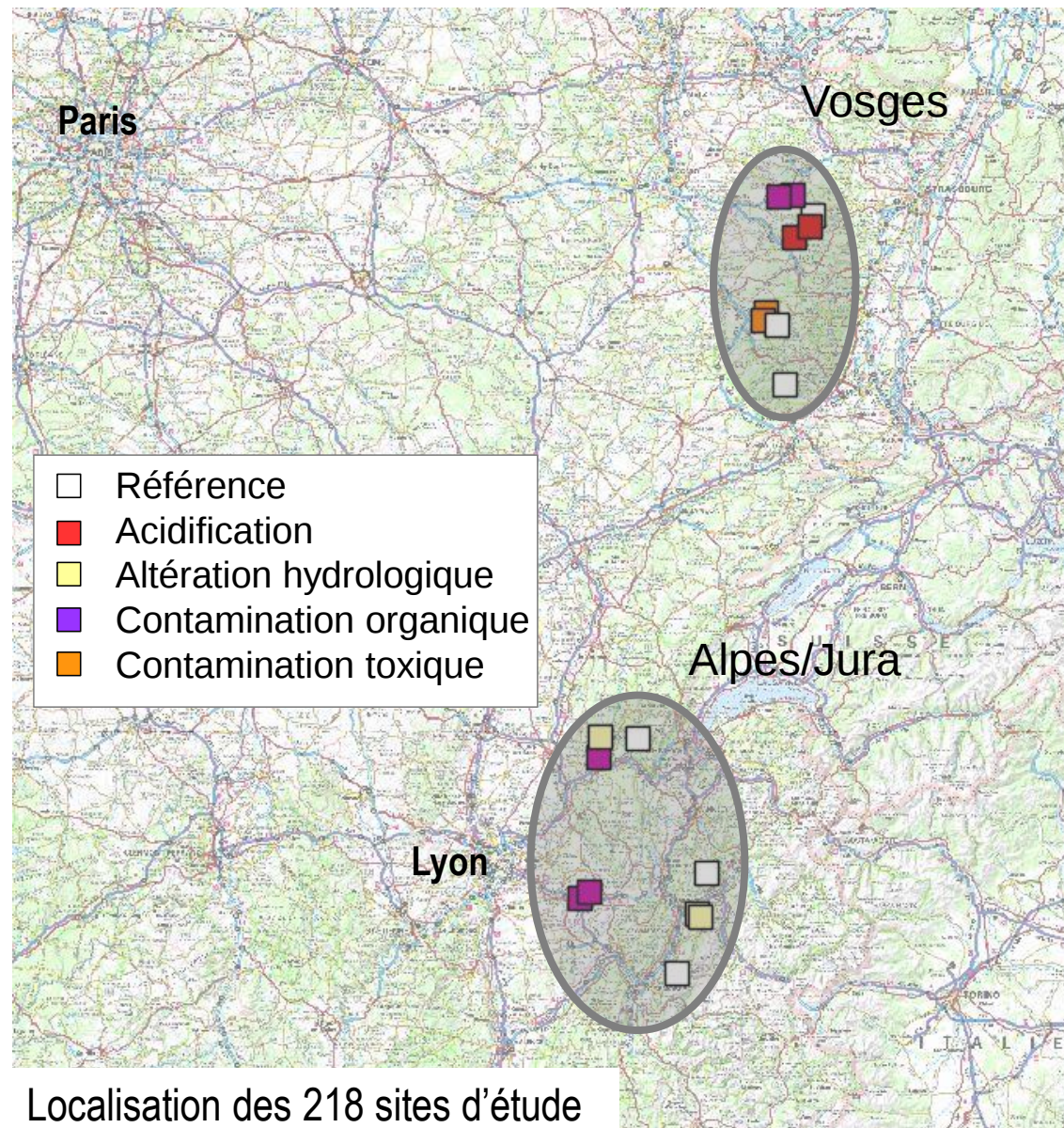
→ **18 stations échantillonnées**  
(protocole I<sub>2</sub>M<sub>2</sub>; 12 prélèvements élémentaires)  
  
= **2 zones biogéographiques**  
x **3 types de pression**  
x **3 stations échantillonnées**  
(**Référence**/Pression **faible**/Pression **modérée**) :

→ **2 campagnes d'échantillonnage** :  
automne 2014 et printemps 2015

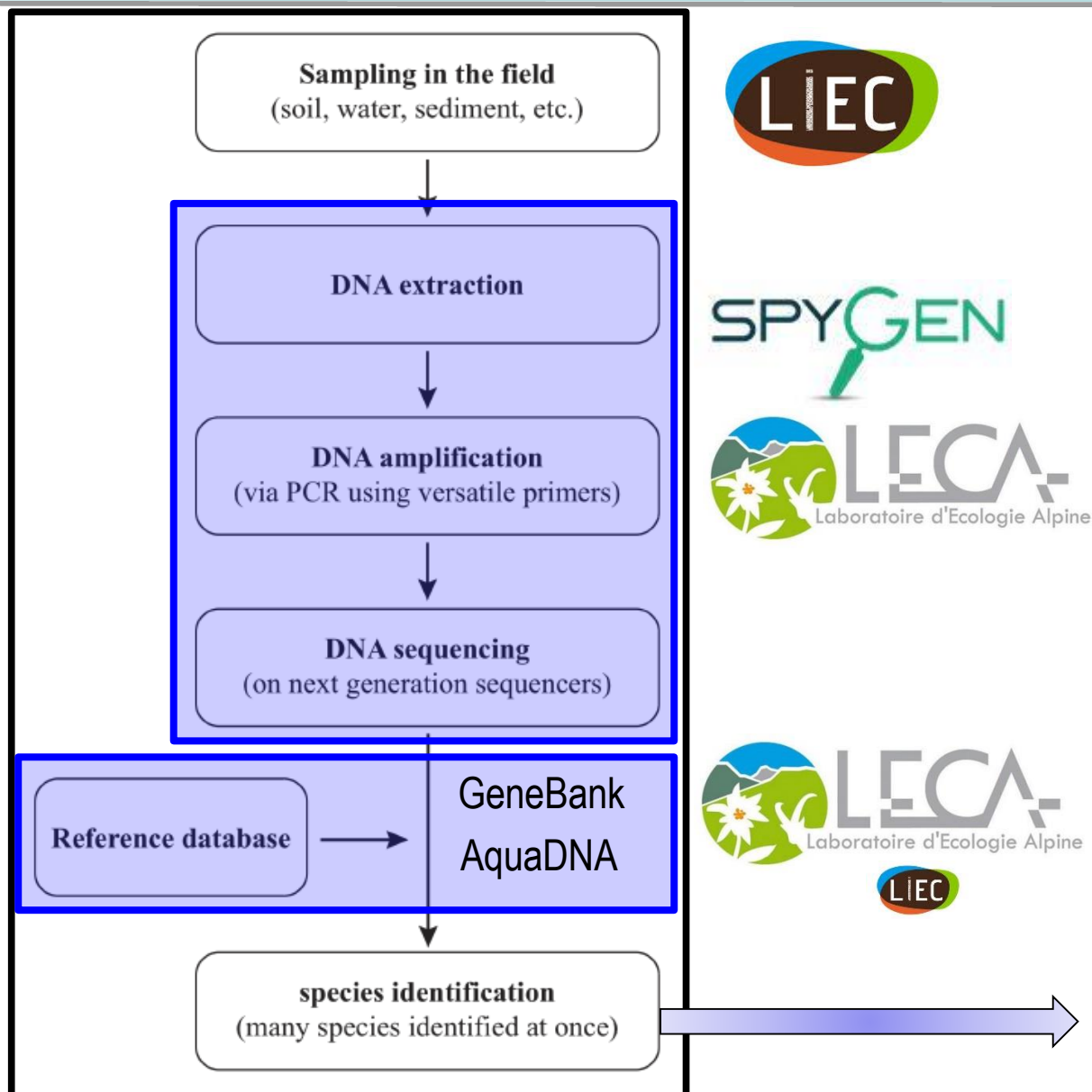
**432 échantillons  
élémentaires**



**Soumis à analyse ADN**

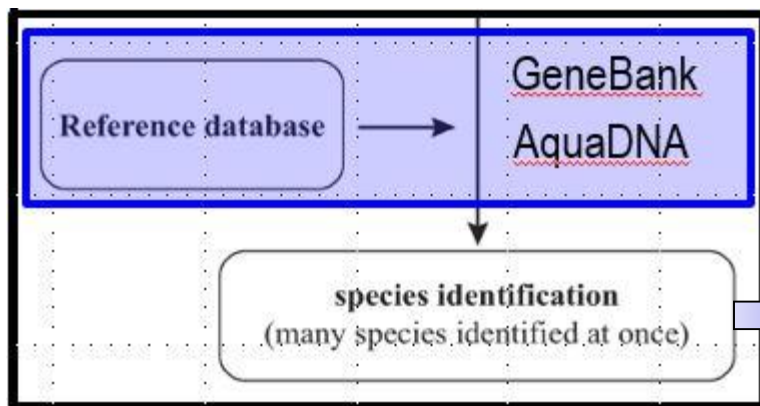


## Démarche metabarcoding



Approche par metabarcoding (Taberlet *et al* 2012)

## Préparation des données et design expérimental



### Quels critères de sélection ?

- Le nombre minimum de lectures ADN par replicat PCR, pour chaque marqueur  
3 seuils testés : **50**, **100** et **200** lectures (par marqueur).
- Le nombre minimum de réplicats PCR pour lesquels ce seuil doit être atteint :  
au moins **3 sur 4**.

3 marqueurs testés

#### 7 combinaisons de marqueurs

COI  
Euka02  
Ins01  
COI + Euka02  
COI + Ins01  
Euka02 + Ins01  
COI + Euka02 + Ins01

X

#### 3 nombres minimum de lectures / réplicat

50  
100  
200

X

#### 3 stratégies de quantification des taxons

- P/A (présence/absence)
- RF (fréquence relative des lectures ADN du taxon dans un échantillon donné)
- Nombre de lectures brut (si seulement un marqueur)

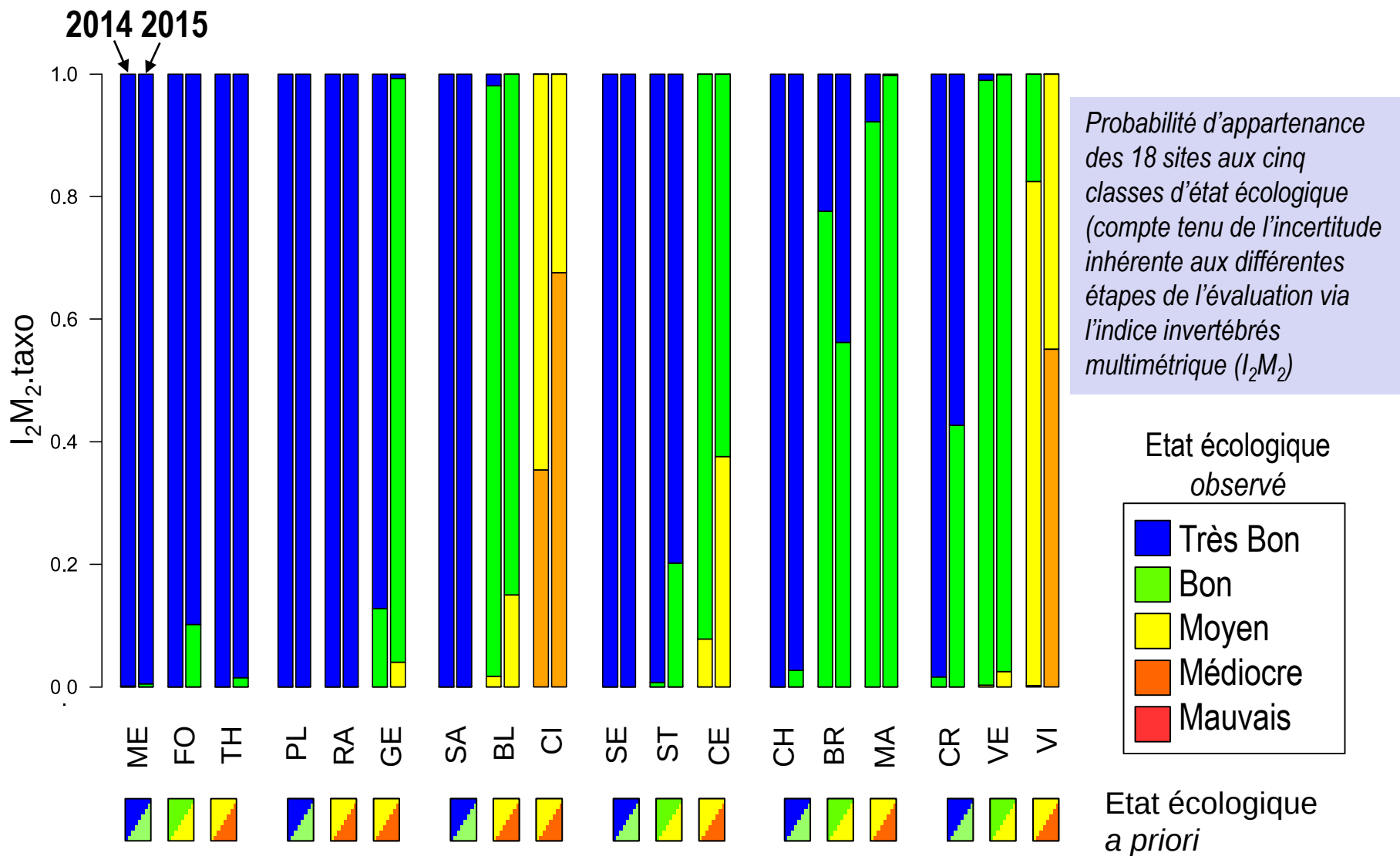
135 combinaisons différentes testées

27 combinaisons avec 1 marqueur  
54 combinaisons avec 2 marqueurs  
54 combinaisons avec 3 marqueurs

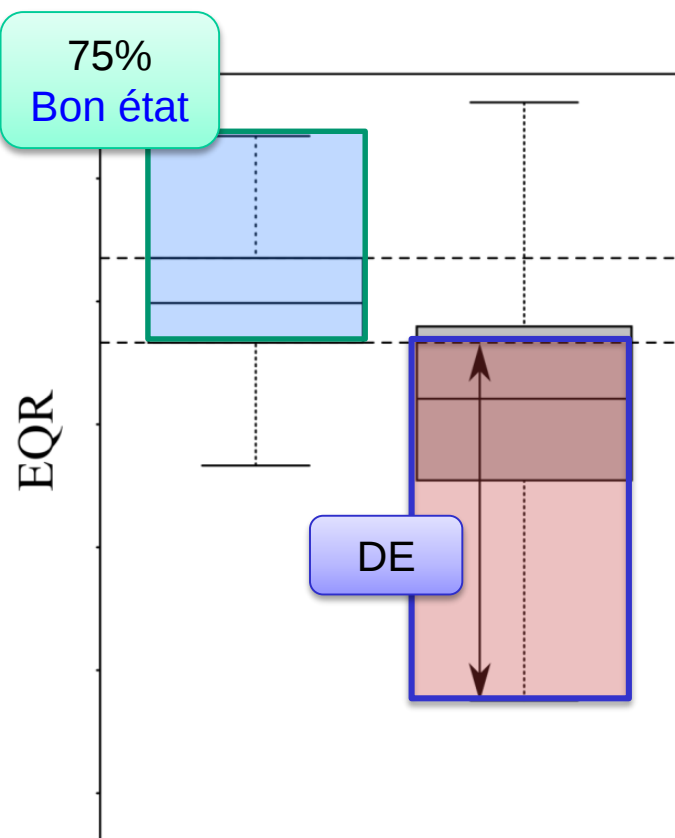


## Evaluation de l'état écologique

➔ Une évaluation de l'état écologique qui confirme le caractère modéré des pressions étudiées

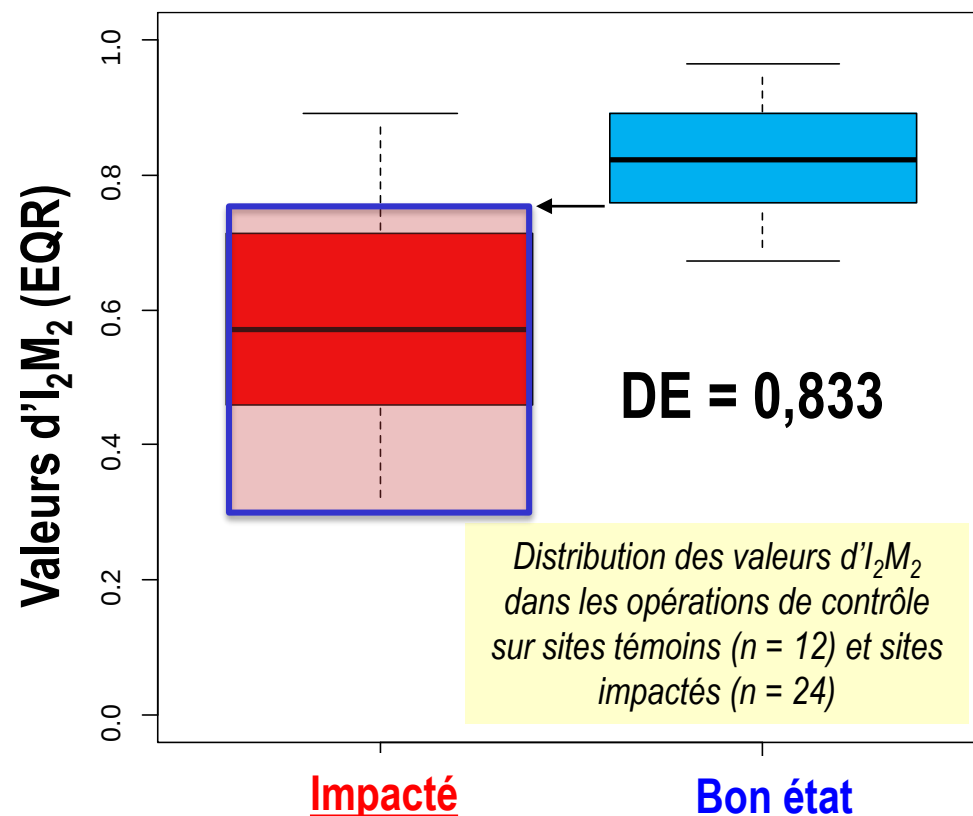
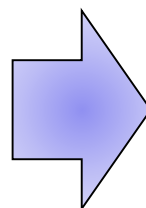
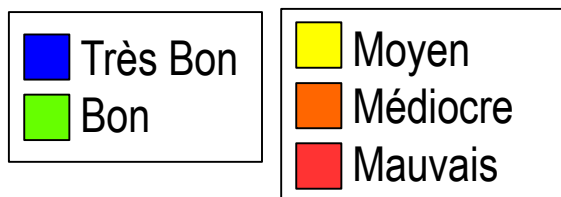


## Un critère d'évaluation : l'efficacité de discrimination (DE)



Bon état

Impacté



Une efficacité de discrimination de 0,833 des stations « impactées » par application de la norme (*i.e.* reconnaissance morphologique des taxons)

- ➡ Un pouvoir de discrimination médian nettement plus faible pour le marqueur COI ( $< 0.30$ ) par rapport aux marqueurs Euka2 ( $> 0.70$ ) et Ins01 ( $> 0.83$ )
- ➡ Mais des différences qui restent significatives entre valeurs d' $I_2M_2.dna$  et d' $I_2M_2.taxo$  sur sites LIRR (test de Wilcoxon III;  $p = 0.025$ ) : **faible robustesse des marqueurs isolés**

# Une solution robuste : la combinaison de plusieurs marqueurs

➔ Nécessité d'associer les résultats de plusieurs marqueurs pour obtenir une évaluation plus robuste

Meilleur compromis

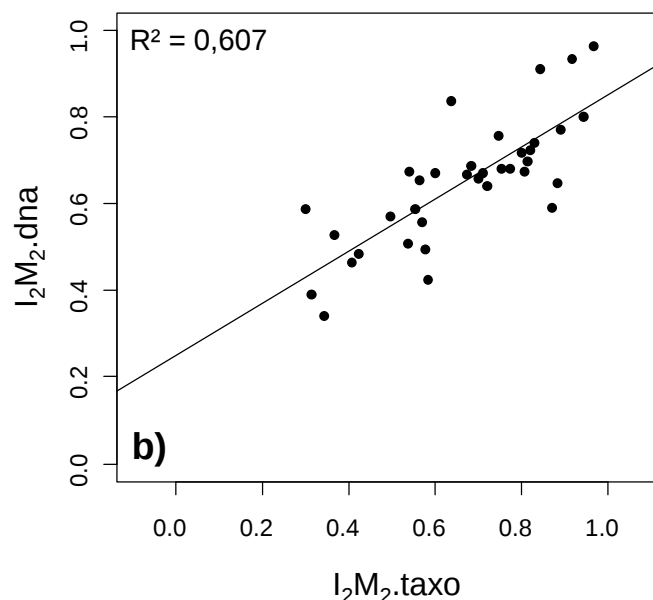
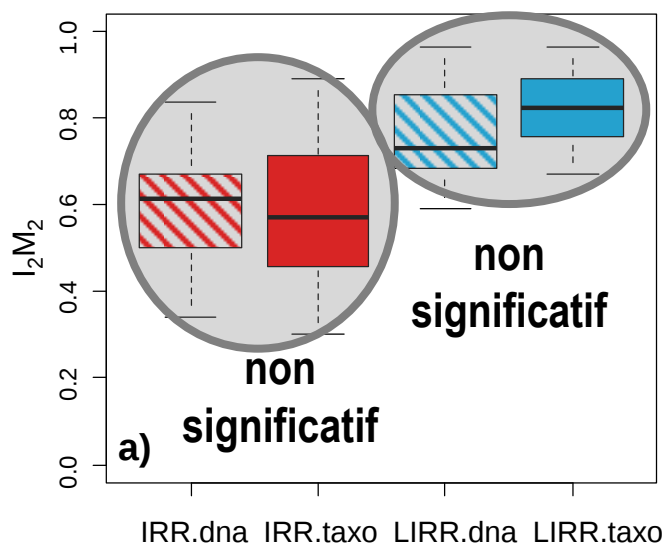
$$= [\text{COL.100.RF} \times \text{Euka02.100.RF} \times \text{Ins01.100.RF}]$$

marqueur

nb. minimal lectures/rép

fréquences relatives

**DE = 0,875**



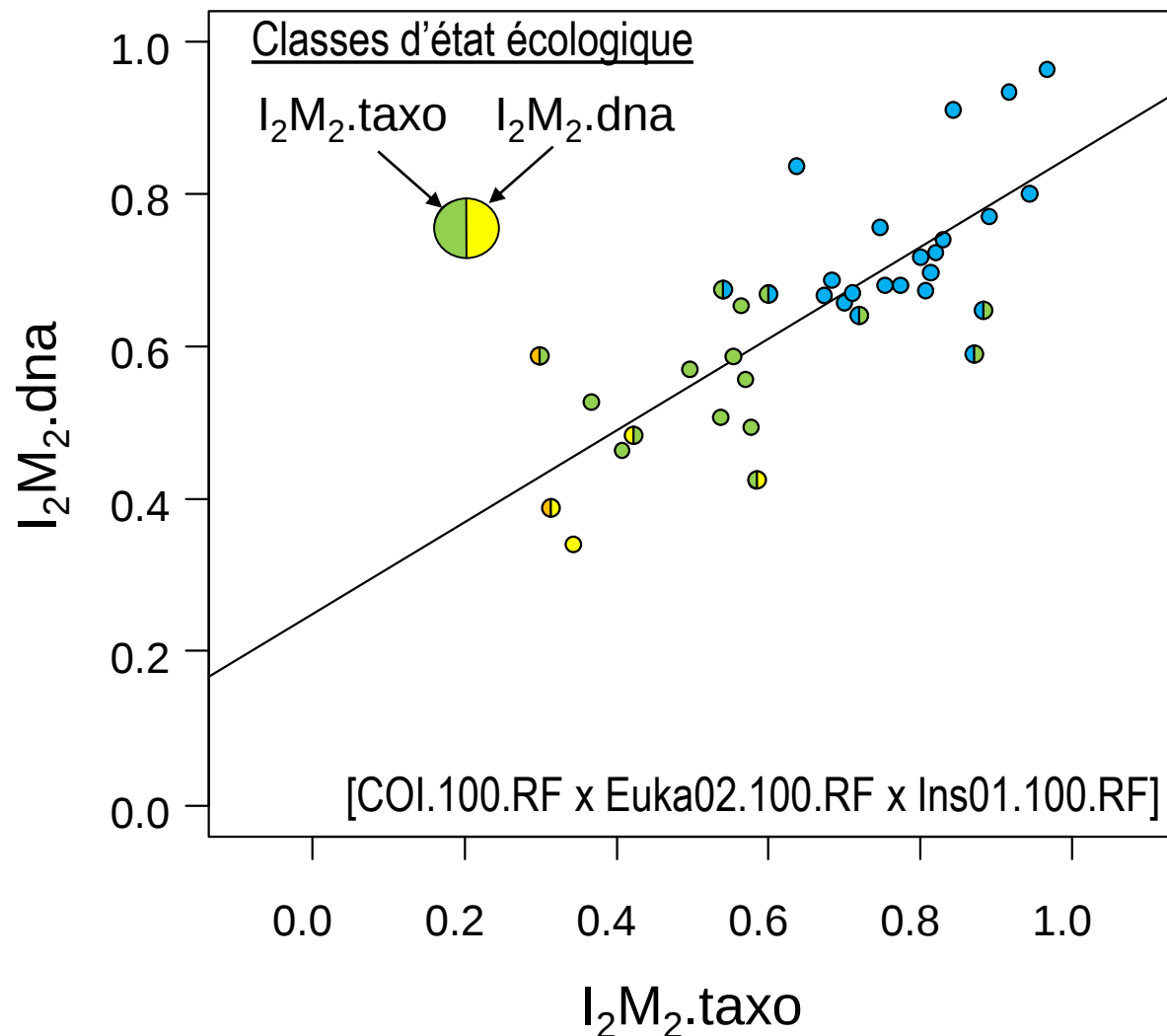
## Peu d'écart en termes de classes d'état écologique

Utilisation des limites de classe  $I_2M_2$  définies pour les différents types de cours d'eau

→ 75 % de classement identique

→ Sur les 25% d'évaluations différentes

- une classe d'écart dans  $\approx$  90% des cas
- équilibre entre surclassements (50%) et déclasssements (50%)



## Conclusions

- ➡ **Les marqueurs Euka02 et Ins01** discriminent efficacement le « bon état » et « état perturbé » mais restituent des valeurs d'I<sub>2</sub>M<sub>2</sub> significativement différentes de celles obtenues par application de la norme XP T90-388 (identification sur critères morphologiques)
- ➡ **L'association des trois marqueurs** permet d'obtenir des résultats plus conformes aux valeurs d'I<sub>2</sub>M<sub>2</sub> obtenues par application de la norme XP T90-388 (notamment si données exprimées en **RF**)  
**car complémentarité des 3 marqueurs :**
  - Marqueur Ins01 (**E,P,C,D** – faible sur **T**), Euka02 (**E,P,T,C** – faible sur **D**), COI (assez homogène sur tous les groupes d'insectes mais moins de taxons par groupe)
- ➡ La prise en compte **du nombre de lectures (RF) comme proxy de l'abondance relative des taxons** améliore sensiblement l'évaluation de l'I<sub>2</sub>M<sub>2</sub>
- ➡ **La traduction des valeurs obtenues en classe d'état** génère peu d'écarts « taxo » vs « dna » (mais gradients de pression avec peu d'impacts sévères)
- ➡ **Des résultats encourageants mais des voies d'amélioration à explorer sur un plus large jeu de données**