Accord Cadre ZABR - Agence de l'Eau

Fiche projet

2020-71-MISTRAL-UMR5023- MetabarcodIng pour le Suivi des opéraTions de Restauration de l'ALbarine

TITRE DU PROJET : MISTRAL -- MetabarcodIng pour le Suivi des opéraTions de Restauration de l'ALbarine

RESPONSABLE SCIENTIFIQUE DU PROJET : Tristan Lefébure (LEHNA, UMR 5023, équipe E3S)

EQUIPES DE RECHERCHES ZABR CONCERNEES et CONTACT SCIENTIFIQUE DE L'EQUIPE

- LEHNA E3S : Lefébure Tristan
- IRSTEA DYNAM : Datry Thibault

AUTRES PARTENAIRES
(*préciser leur degré d'implication et leur accord)*

- Recherche : *Arnaud Foulquier du LECA (Laboratoire d'Écologie Alpine, UMR 5553)*, sera impliqué dans la construction des protocoles de biologie moléculaire et l'analyse de données
- Institutionnel : *Florent Pellizzaro du SR3A (Syndicat de la Basse Vallée de l'Ain)*, sera impliqué dans le suivi des opérations de restauration

THEME DE RATTACHEMENT ZABR
Flux forme habitat biocénoses

THEME DE RATTACHEMENT AGENCE DE L'EAU -QUESTIONS AGENCE DE L'EAU

Thème de rattachement Agence de l'Eau (accord cadre)
Thème : La protection, la restauration des milieux et les gains écologiques
Thématique : Restauration, fonctionnement physique

Inventaire des besoins en matière de connaissance opérationnelle pour la gestion des milieux aquatiques :
3.1.1 – renforcer la panoplie de l'ingénierie écologique
2.1 – Compléter et optimiser la surveillance de l'état et la qualité des masses d'eau

SITE OU OBSERVATOIRE DE RATTACHEMENT ZABR : SARAM

RESUME DU PROJET GLOBAL (15 lignes max)

- Résumé 15 lignes :

Les opérations de restauration écologique (ORE) des cours d'eau se multiplient, notamment sur les nombreux affluents du Rhône tels que l'Albarine. L'efficacité de ces actions est aujourd'hui difficile à évaluer de par (1) la méconnaissance des états initiaux, (2) la forte variabilité associée à des contextes bruités par de multiples

facteurs, et enfin (3) la dynamique temporelle des ORE. De nos jours, les ORE sont évaluées grâce à des mesures de biodiversité (e.g. communautés de zoobenthos) qui dépendent de méthodes d'identification morphologique qui sont à la fois **peu sensibles** (Dolédec et al 2015) et qui nécessitent un fort effort d'échantillonnage (Vaudor et 2015) et sont donc **onéreuses**. De plus ces mesures de biodiversité classiques apportent une **vision incomplète de la biodiversité** car elle ne prennent pas en compte des groupes ubiquistes difficilement identifiables morphologiquement (e.g. diptères, acariens, nématodes) mais qui pourraient se révéler être de très bons indicateurs. L'identification moléculaire de communauté entière (**le métabarcoding**) pourrait lever ces verrous en apportant de la précision taxonomique mais également en réduisant les temps d'identification et le coût des suivis, permettant ainsi des suivis en routine plus longs et plus fréquents, avant et après restauration (Ji et al 2013). De plus le métabarcoding peut s'appliquer sur les mêmes échantillons que les méthodes classiques (eg. surber de l'I2M2) permettant à la fois de maintenir une continuité dans les protocoles d'échantillonnage mais également de s'affranchir des problèmes liés à l'utilisation des ADN environnementaux et leur transfert dans les hydrosystèmes. Néanmoins, il n'existe pas aujourd'hui de protocole de métabarcoding en cours d'eau standardisé et opérationnel pour des échantillons de Surber. Dans ce projet nous proposons de tester sur le bassin de l'Albarine, et à destination d'une ORE sur l'Albarine, différents protocoles de métabarcoding et de les confronter aux approches morphologiques classiques.

- Livrables - Nous proposons 3 livrables dont le but est de faciliter le transfert opérationnel de ce projet :
  1. Rapport technique sur les protocoles détaillés de métabarcoding utilisés dans le projet MISTRAL (novembre 2020)
  2. Journée de formation à destination des gestionnaires (décembre 2020). Les objectifs de la formation seront d'initier les gestionnaires aux méthodes d'identification moléculaire et à leur application pour la gestion des ORE. Le rapport technique précédemment déposé servira de support technique.
  3. Rapport d'étude sur la comparaison des résultats des différents protocoles de métabarcoding sur échantillons de Surber pour suivre les communautés du zoobenthos de l'Albarine en vue d'un suivi à long-terme des opérations de restauration sur le site SARAM (juin 2021). En conclusion ce rapport donnera des recommandations quand à la faisabilité du suivie des ORE de l'Albarine par métabarcoding. En fonction des résultats, le rapport pourra recommander un protocole particulier et comment optimiser son transfert opérationel, ou bien, si aucun protocole n'est adapté, le rapport proposera des alternatives et les moyens de les tester.

- Pluridisciplinarité : Ce projet combine les compétences appartenant à des disciplines différentes à savoir la biologie moléculaire et la bioinformatique (partenaire LEHNA) avec celles en écologie des communautés aquatiques et restauration écologique (partenaire DYNAM).

ENCART 2020-71-MISTRAL-E3S (Responsable LEFEBURE Tristan) (10 lignes max)

- Tache de l'équipe dans le projet : L'équipe E3S supervisera les analyses de biologie moléculaire, le séquençage et les analyses bioinformatiques.

ENCART 2020-71-MISTRAL-DYNAM (Responsable DATRY Thilbault) (10 lignes max)

- Tache de l'équipe dans le projet : L'équipe DYNAM assurera la collecte des données et échantillons pré-existants, et supervisera le choix des sites et leur échantillonnage. DYNAM participera aussi à l'analyse des résultats de métabarcoding ainsi qu'à leur confrontation avec les données morphologiques dont c'est une des spécialités. Enfin elle assurera le transfert opérationnel vers les gestionnaires d'ORE.

FINALITES ET ATTENDUS OPERATIONNELS (1 p. maxi) :

A court terme (1 an et 2 mois), ce projet fournira un premier bilan sur la confrontation des approches morphologique et moléculaires et sur l'apport des différents protocoles moléculaires pour le suivi des communautés de macrozoobenthos dans un contexte d'ORE. Le projet s'appuiera tout d'abords sur des actions de formation à destination des gestionnaires (délivrables 1 et 2) sur les techniques de métabarcoding et leur application au suivi des ORE. Dans un second temps, le projet aura pour but de fournir des recommandations pour assurer le transfert opérationnel des résultats de cette étude.

A moyen terme (3-5 ans) ce projet permettra l'émergence d'un outil puissant et opérationnel pour améliorer les estimations de biodiversité et permettre des suivis temporels à long terme des opérations de restauration. Enfin, fort de nombreuses données antérieures hydrologiques et biologiques collectées depuis 2007 sur l'Albarine (notamment soutenu par l'Agence RM&C), incluant des données standardisées (IBGN, I2M2), ce projet devrait ensuite permettre d'évaluer l'efficacité des ORE passées et en cours sur l'Albarine (que ce soit en amont ou aval de Charabotte) avec un grain beaucoup plus fin qu'avec les données I2M2 actuellement disponibles et qui sont malheureusement peu informatives dans certains contextes comme celui des intermittences d'écoulement.

OBJECTIFS ET METHODOLOGIE (2 p. maxi) :

Objectifs :

1. Quelles méthodes moléculaires permettent de décrire le plus efficacement les communautés d'invertébrés aquatiques de l'Albarine ?
2. Peut-on définir un protocole de métabarcoding efficace et opérationnel de suivi des ORE de l'Albarine ?

Méthodologie : quel protocole de métabarcoding pour les échantillons de Surber ?

Ce projet se focalise sur un type d'échantillon normalisé : les Surber tels qu'ils sont utilisés dans la norme I2M2. Ces échantillons sont fixés à l'alcool et contiennent une part minérale (sable, gravier) et une part organique elle-même composée d'organismes et de matière organique particulaire (fragments de feuilles…). A partir de ces échantillons, le protocole de métabarcoding comporte deux étapes clés : l'extration d'ADN puis l'enrichissement en marqueur d'identification moléculaire. Plusieurs méthodes alternatives peuvent être choisies pour chacune de ces étapes.

1. Quelle matrice ADN pour l'extraction d'ADN ?

Il existe aujourd'hui trois alternatives qui sont plus ou moins coûteuses en terme de temps de manipulation :

- **Le « tri-pool-broyage »** du Surber**.** L'approche la plus répandue consiste à sortir les organismes de l'échantillon puis à les pooler, les broyer et extraire les ADN de ce broyat (eg. Elbrecht & Steinke 2019).

Cette méthode a l'avantage d'être robuste car elle élimine les potentiels inhibiteurs, mais elle nécessite un important travail de tri qui augmente fortement les coûts. De plus, elle implique la destruction des organismes échantillonnés.

- **L'extraction in toto** du Surber. Ce protocole consiste à broyer l'intégralité de l'échantillon (organismes, débris végétaux, sable etc) avant d'en extraire l'ADN. Il peut être difficile à mettre en œuvre quand la part non-organique de l'échantillon est importante ou quand des inhibiteurs sont fréquents (eg. débris végétaux). Bien que plus rapide, ce protocole implique également la destruction des organismes.
- **L'éthanol de conservation** du Surber**.** Ce protocole consiste à extraire l'ADN en solution dans l'éthanol de conservation des échantillons. Cette méthode a l'avantage d'être rapide, économe, et permet de conserver tous les organismes d'un échantillon pour d'éventuelles futures analyses. Néanmoins, les ADN de l'éthanol sont généralement de moins bonne qualité et en faible concentration. Ce protocole a déjà été testé par le LEHNA et le DYNAM sur des échantillons de communautés artificielles avec succès (Gauthier et al 2019), mais nécessite d'être testé sur des échantillons de Surber en conditions réelles.

2. Quelle méthode d'enrichissement ?

Les extractions d'ADN (obtenues à partir de l'une des trois matrices précédentes) doivent ensuite être enrichies en marqueurs d'identification moléculaire (ici le gène de la COI pour les animaux). Il existe à ce jour deux méthodes d'enrichissement :

- **La PCR (Polymerase Chain Reaction)**. C'est la méthode classique d'enrichissement en métabarcoding. Elle a l'avantage d'être simple et rapide, mais présente le gros défaut de montrer des biais d'amplification en faveur de certains taxons (Elbrecht & Leese 2015). Ainsi certaines espèces seront moins bien amplifiées voire disparaîtront du jeu de données. Par conséquent, il n'est pas possible d'estimer fiablement les abondances relatives des taxons avec cette méthode.
- **La capture de gène**. La capture de gène utilise des sondes ARN qui vont s'hybrider sur les fragments d'intérêt. Il est possible de synthétiser un grand nombre de sondes différentes et de grande taille (120 bases) permettant de capturer une grande diversité de fragments et avec des biais de capture faibles. Ce protocole a déjà été testé avec succès par le LEHNA et le DYNAM sur des échantillons de communautés artificielles (Gauthier et al 2019), mais nécessite encore d'être testé sur des échantillons plus riches et issus de communautés naturelles.

3. Un bassin test : le bassin de l'Albarine

Les connaissances préalables du DYNAM sur les communautés de zoobenthos de l'Albarine sont importantes :

- suivi DYNAM depuis 2007
- campagne I2M2 (2017-2018)
- projet AFB sur l'intermittence (en cours)

De plus, nous disposons de modélisations hydrologiques du bassin, et enfin il existe **trois ORE en cours sur le bassin.** Le bassin de l'Albarine est donc idéal pour tester différents protocoles de métabarcoding sur Surber et évaluer leur applicabilité pour le suivi d'ORE.

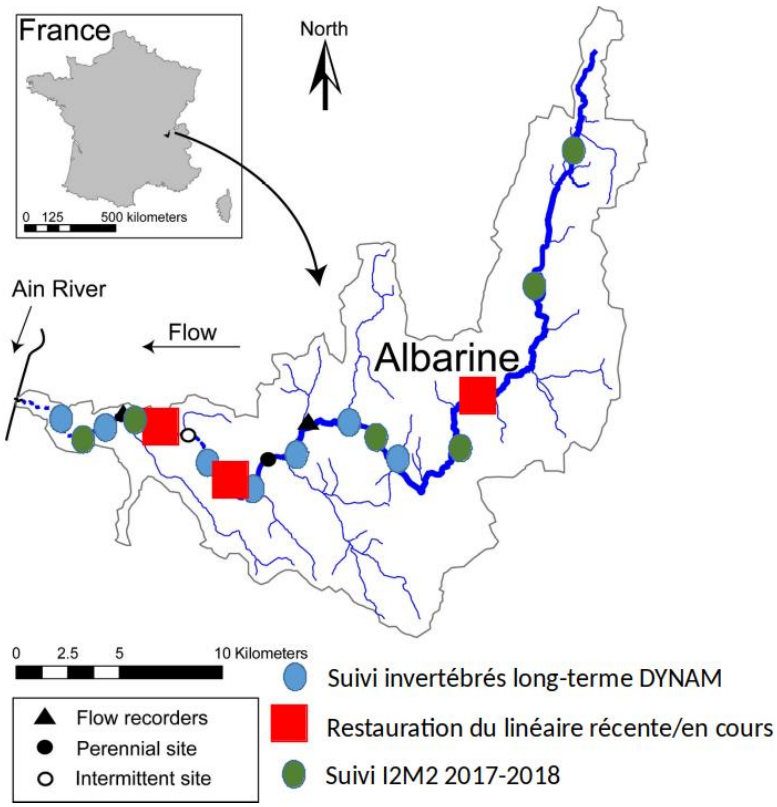

Figure : Bassin de l'Albarine, données préalables et opérations de restauration en cours

Nous proposons pour le projet MISTRAL le design expérimental suivant :

21 sites x 3 matrices ADN x 2 méthodes d'enrichissement = 126 échantillons

Faisabilité :

La plupart des échantillons de Surber sont déjà disponibles (projet AFB). Les méthodes d'extraction d'ADN « tri-pool-broyage » et sur éthanol de conservation et les deux méthodes d'enrichissement ont déjà été déployées par les porteurs du projet. L'extraction d'ADN de Surber in toto est le protocole pour lequel nous n'avons pas encore de routine. Notre partenaire du LECA (Arnaud Foulquier) apportera une expertise précieuse sur cet aspect.

DUREE DU PROJET: 14 mois

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dolédec, S., Forcellini, M., Olivier, J. M., & Roset, N. (2015). Effects of large river restoration on currently used bioindicators and alternative metrics. *Freshwater Biology*, *60*(6), 1221-1236.

Elbrecht, V., & Leese, F. (2015). Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass—sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. *PloS one*, *10*(7), e0130324.

Elbrecht, V., & Steinke, D. (2019). Scaling up DNA metabarcoding for freshwater macrozoobenthos monitoring. *Freshwater Biology*, *64*(2), 380-387.

Gauthier, M., Konecny-Dupré, L., Nguyen, A., Elbrecht, V., Datry, T., Douady, C. J., & Lefébure, T. (2019). Enhancing DNA metabarcoding performance and applicability with bait capture enrichment and DNA from conservative ethanol. *Molecular Ecology Resources*, https://doi.org/10.1111/1755-0998.13088.

Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S. M., Edwards, D. P., Tang, Y., Nakamura, A., ... & Larsen, T. H. (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology letters*, *16*(10), 1245-1257.

Vaudor, L., Lamouroux, N., Olivier, J. M., & Forcellini, M. (2015). How sampling influences the statistical power to detect changes in abundance: an application to river restoration. *Freshwater Biology*, *60*(6), 1192-1207.