

Titre : FlorADNe : développement d'Indices de suivis environnementaux basés sur l'ADN environnemental de la flore des milieux aquatiques et humides

Encadrement : Laurent Hardion & Jean-Nicolas Beisel, Laboratoire Image Ville Environnement, UMR 7362 Université de Strasbourg, CNRS, ENGEES. **Contact :** hardion@unistra.fr ; beisel@live-cnrs.unistra.fr

Les milieux aquatiques et les zones humides représentent des écosystèmes prioritaires en termes de conservation, et donc de connaissance et de suivi. Sous l'impulsion de la Directive européenne Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE), la France déploie périodiquement un programme de surveillance de l'état écologique des masses d'eau. Cet état écologique est estimé à travers des descripteurs standardisés de communautés végétales ou animales considérées comme bio-indicatrices. Or, l'identification de ces organismes aquatiques requière souvent un haut niveau d'expertise naturaliste et sont assez couteuses en temps. Parallèlement, ces milieux sont les plus menacés par des impacts anthropiques, mais aussi par des invasions biologiques, dont la détection doit être la plus précoce possible et la gestion soumise au contexte réglementaire européen de 2014.

Pour optimiser le suivi régulier de l'état écologique des milieux, les méthodes basées sur l'ADN environnemental (ADNe) semblent très prometteuses. Leur principe consiste à détecter la présence des espèces sur la base de fragments d'ADN qu'elles libèrent dans l'eau, en confrontant les séquences de ces fragments à des bases de données de référence contenant un barcode ADN pour chaque espèce. Ces nouveaux outils dépassent certains biais et contraintes de méthodes classiques : elles sont non destructives pour les espèces et l'échantillonnage perturbe moins le milieu, elles couvrent potentiellement tous les taxons (algues, plantes, invertébrés, poissons, amphibiens), avec une sensibilité de détection assez fine tout en résolvant de nombreux problèmes d'identification morphologique. Un développement de méthodes ADNe complémentaires aux relevés classiques a donc débuté pour les algues, les macro-invertébrés, les oligochètes et les poissons (Valentini et al. 2016 ; Pawloski et al. 2019 ; Meyer et al. 2021). Par exemple, les diatomées, algues brunes unicellulaires et microscopiques, ont déjà fait l'objet d'un développement suffisamment important pour une adaptation à l'ADNe de l'Indice Biologique Diatomées (NF T90-354, AFNOR ; Vasselon et al. 2019 ; Bailet et al. 2020).

A travers les indices biologiques macrophytiques en rivière (IBMR, NF T90-395) ou dans les lacs (IBML, NF EN 15460), les plantes aquatiques et de milieux humides ont été reconnues comme des taxons bio-indicateurs DCE de l'état écologique des masses d'eau. Or, aucune recherche scientifique n'a pour l'instant mêlé ADNe et bio-indication pour ces organismes. Les rares travaux à l'échelle internationale ciblant les plantes aquatiques en ADNe mettent plutôt l'accent sur la détection des espèces invasives (Cf. synthèse d'Espinosa Prieto et al., en révision). Face à ce retard méthodologique, il est urgent de développer et proposer aux gestionnaires une alternative DCE ADNe aux indices classiques basés sur les macrophytes (plantes aquatiques visible à l'œil nu) et de tester sa fiabilité sur le terrain.

Les objectifs du présent projet de thèse sont donc le développement et le transfert vers les acteurs de la gestion des milieux de plusieurs indicateurs environnementaux basés sur l'ADNe : (1) un indice de bio-indication ADNe basés sur les plantes aquatiques, comme alternative aux indices 'morphologiques' classiques (IBMR, IBML), et suivant le cadrage réglementaire européen de la DCE, (2) un indice de l'état de conservation des milieux aquatiques basés sur un ratio entre la présence d'espèces patrimoniales (indicatrices de la préservation du milieu) et d'espèces invasives (indicatrices de la perturbation du milieu).

Ce projet de thèse se décomposera en quatre tâches principales :

(i) **Etat de l'art & proposition de protocoles** : Travail bibliographique sur les indices environnementaux de leur développement à leur normalisation, puis plus spécifiquement sur les rares indices basés sur l'ADNe, en s'attachant aux principaux points d'achoppement avec les méthodes anciennes. Ce travail devra déboucher sur une proposition de protocole méthodologique précisant les étapes pratiques : stratégie d'échantillonnage, analyses moléculaires, traitement bioinformatique, format des résultats et de l'évaluation en sortie. Comme classiquement en Recherche & Développement, une évaluation de la fiabilité de la méthodologie devra être pensée à chaque étape en proposant des indicateurs intermédiaires et des tests en laboratoire.

(ii) **Barcodes de référence** : Ce projet enrichira notre base de données régionales de barcodes ADN pour la Flore du Grand Est, pour les espèces concernées par ces indices : 200 espèces végétales inscrites au protocole de l'IBMR (Haury et al. 2006), 100 espèces de plantes invasives en Grand-Est (Duval et al. 2020), et ~200 espèces de la flore patrimoniale du Grand-Est et présentes en milieux humides ou aquatiques (e.g. listes rouges régionales). Pour ces ~ 500 taxons, le choix des marqueurs génétiques utilisés comme barcodes s'appuiera sur nos premiers travaux de Recherche sur cette question (Espinosa Prieto et al. en préparation), ciblant les espaceurs d'ADN nucléaires ribosomiaux ITS1 et ITS2, ainsi que les introns d'ADN chloroplastique *rbcl* et *trnL*.

(iii) **Test en laboratoire et évaluation sur le terrain** : Les deux indices développés seront testés en laboratoire par la création de mésocosmes de différentes communautés végétales aquatiques composées artificiellement et cultivées dans différentes conditions environnementales (courant, pH, taux de biomasse). Ils seront ensuite déployés sur le terrain dans différents hydrosystèmes pour lesquels les états de conservation (relevés floristiques) et la qualité chimique et écologique de l'eau (analyses chimiques et bio-indication classique) seront connus (ou évalués en parallèle). Le choix de ces sites se fera selon leur variabilité environnementale, mais aussi en concertation avec nos partenaires actuels (Agence de l'Eau Rhin-Meuse) ou futurs (Région Grand-Est, ONEMA, CENS), ainsi qu'avec nos projets de Recherche à venir et compatibles en Conservation de la Biodiversité et en Ecologie de la Restauration.

(iv) **Enquête de transférabilité auprès des acteurs et utilisateurs** : Nous souhaitons que nos développements méthodologiques servent la gestion des milieux naturels et que les acteurs (gestionnaires et utilisateurs potentiels) s'en emparent. Pour cela, nous réaliserons en collaboration avec des collègues sociologues une enquête sur l'acceptabilité de la méthode, les attendus vis-à-vis de ces techniques et leurs impacts potentiels, notamment vis-à-vis des citoyens impliqués dans la collecte de données naturalistes par observation directe mais également au regard des chaînes d'interventions rapides lors de la détection d'espèces exotiques.

Les principaux résultats attendus sont la production de deux indices environnementaux sur d'une part la qualité et d'autre part l'état de conservation des milieux aquatiques. Le travail est imaginé pour évaluer et valider leur fiabilité en conditions contrôlées (expérimentations en laboratoire) et sur le terrain en comparaison avec des méthodes classiques. Des indices de bioindication basés sur l'ADNe existent déjà pour les poissons ou les diatomées, mais nos travaux seront précurseurs pour les plantes aquatiques, pourtant très utilisées en bioindication classique. Ces travaux devraient permettre une visibilité internationale de nos activités de Recherche et donc des retombées intéressantes en termes de partenariat scientifique et d'amélioration méthodologique de ces indices par la suite.

REFERENCES

- Baillet, B., Bouchez, A., Franc, A., Frigerio, J. M., Keck, F., Karjalainen, S. M., et al. 2019. Molecular versus morphological data for benthic diatoms biomonitoring in Northern Europe freshwater and consequences for ecological status. *Metabarcoding and Metagenomics*, 3, 21-35.
- Espinosa Prieto A, Hardion L, Beisel JN, 2021. Designing robust DNA barcode libraries for metabarcoding of freshwater plants by integrating herbarium collections and contemporary floristic inventories. *ARPHA Conference Abstracts 4*, e64713.
- Espinosa Prieto A, **Beisel JN**, Verschuren P, **Hardion L**, 2023. Towards freshwater plant diversity surveys with eDNA barcoding and metabarcoding. *Environmental DNA*, in press.
- Espinosa Prieto A, **Beisel JN**, Verschuren P, **Hardion L**, in prep. Multi-locus metabarcoding of freshwater plants: evaluation of primers and barcodes.
- Meyer A, Boyer F, Valentini A, Bonin A, Ficetola GF, **Beisel JN**, Bouquerel J et al., 2021. Morphological vs. DNA metabarcoding approaches for the evaluation of stream ecological status with benthic invertebrates: Testing different combinations of markers and strategies of data filtering. *Molecular Ecology* 30(13), 3203-3220.
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., et al. 2018. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 637, 1295-1310.
- Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, Bellemain E, Besnard A, Coissac E et al. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25, 929-942.
- Vasselon, V., Rimet, F., Domaizon, I., Monnier, O., Reyjol, Y., Bouchez, A. 2019. Évaluer la pollution des milieux aquatiques avec l'ADN des diatomées: où en sommes-nous? *Techniques Sciences Méthodes*, 5, 53-70.