

Utilisations de l'ADN environnemental pour la surveillance et l'évaluation biologiques des écosystèmes aquatiques

Directives



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Office fédéral de l'environnement OFEV

Utilisations de l'ADN environnemental pour la surveillance et l'évaluation biologiques des écosystèmes aquatiques

Directives

Impressum

Éditeur

Office fédéral de l'environnement (OFEV)

L'OFEV est un office du Département fédéral de l'environnement, des transports, de l'énergie et de la communication (DETEC).

Auteurs

Jan Pawlowski^{1,2}, Laure Apothéloz-Perret-Gentil^{1,2}, Elvira Mächler^{3,4}, Florian Altermatt^{3,4}

¹ Université de Genève, Département de Génétique et Evolution, 1211 Genève

² ID-Gene Ecodiagnosics, 1202 Genève

³ Institut fédéral suisse des sciences et technologies de l'eau (Eawag), Département Écologie aquatique, 8600 Dübendorf

⁴ Université de Zurich, Département de biologie évolutive et d'études environnementales, 8057 Zurich

Contact

Jan.Pawlowski@unige.ch et Florian.Altermatt@eawag.ch

Groupe d'accompagnement

Marie-Sophie Renevier, Yael Schindler Wildhaber, Arielle Cordonier, Lukas De Ventura, Daniel Hefti, Christiane Illg, Glenn Litsios, Philip Staufer, Patrick Steinmann

Experts externes

Rosetta C. Blackman, Kristy L. Deiner, Florian Leese, Kristian Meissner

Référence bibliographique

Pawlowski J., Apothéloz-Perret-Gentil L., Mächler E. & Altermatt F. 2020: Utilisations de l'ADN environnemental pour la surveillance et l'évaluation biologiques des écosystèmes aquatiques. Directives. Office fédéral de l'environnement, Berne. Connaissance de l'environnement n° 2010: 80 p.

Traduction

Service linguistique de l'OFEV

Graphisme, mise en page

Cavelti AG, Marken. Digital und gedruckt, Gossau
Figures: Apothéloz-Perret-Gentil L.

Photo de couverture

Prélèvement d'un échantillon d'eau en vue de l'analyse de l'ADNe
(Photo: Eawag, Elvira Mächler)

DOI

<https://doi.org/10.5167/uzh-187800>

Téléchargement au format PDF

www.bafu.admin.ch/uw-2010-f

(il n'est pas possible de commander une version imprimée)

Cette publication est également disponible en anglais et en allemand. La langue originale est l'anglais.

© OFEV 2020

Table des matières

Abstracts	5	5	Laboratoire moléculaire	34
Avant-propos	6	5.1	Flux général des travaux	36
1 Introduction	7	5.2	Extraction d'ADN	37
2 ADN environnemental : définitions, utilisations et perspectives	10	5.3	Amplification PCR	37
2.1 Définitions	10	5.4	Détection d'espèces cibles	39
2.2 Applications potentielles	12	5.4.1	PCR conventionnelle	40
2.3 Avantages et inconvénients	14	5.4.2	PCR quantitative (qPCR)	40
3 ADNe dans les écosystèmes d'eau douce	15	5.4.3	PCR numérique (dPCR)	41
3.1 Étude de l'ADNe pour différentes étendues d'eau	16	5.5	Métabarcoding	41
3.1.1 Plans d'eau (écosystèmes lenticques)	16	5.5.1	PCR pour le métabarcoding	41
3.1.2 Eaux courantes (écosystèmes lotiques)	17	5.5.2	Séquençage à haut débit (HTS)	42
3.1.3 Eaux souterraines et sources	19	5.5.3	Analyse des données	42
3.2 Étude de l'ADNe pour des taxons particuliers	19	6 Base de référence pour l'attribution taxonomique	44	
3.2.1 Batraciens	19	7 Gestion des données	46	
3.2.2 Poissons	20	8 Exemples d'applications (études de cas)	47	
3.2.3 Mammifères	20	8.1	Détection d'espèces cibles	47
3.2.4 Insectes	21	8.1.1	Moule quagga	47
3.2.5 Crustacés	22	8.1.2	Gobie à taches noires	47
3.2.6 Mollusques	22	8.2	Diversité des vertébrés : exemple des tritons	48
3.2.7 Oligochètes	23	8.3	Macro-invertébrés	48
3.2.8 Diatomées	23	8.3.1	ADNe issu d'échantillons d'eau (approche globale)	48
3.2.9 Pathogènes et parasites	23	8.3.2	ADN d'échantillons mixtes (par filet troubleau)	49
3.2.10 Plantes aquatiques (macrophytes et phytoplancton)	23	8.4	Indices biotiques	49
4 Échantillonnage pour les analyses ADNe	26	8.4.1	Indice moléculaire suisse des diatomées (MDI-CH)	49
4.1 Types d'ADN environnemental utilisés comme sources d'analyse	26	8.4.2	Indice oligochètes génétique de bio-indication des sédiments	50
4.1.1 ADNe dans l'eau	26	9 Conclusions et perspectives	52	
4.1.2 ADNe dans les sédiments	29	10 Protocoles d'échantillonnage	54	
4.1.3 ADNe présent dans le biofilm	29	10.1	ADNe issu d'échantillons d'eau	54
4.1.4 ADN de macro-invertébrés dans les échantillons mixtes	30	10.2	Sédiments	59
4.2 Précautions pour la manipulation d'échantillons d'ADNe	30	10.3	Biofilm	61
4.3 Autres problèmes techniques liés à l'échantillonnage ADNe	32	11 Bonnes pratiques et documentation des procédures pour les approches ADNe	62	
		Glossaire	64	
		Bibliographie	67	

Abstracts

Aquatic biomonitoring is currently transformed by environmental DNA (eDNA) based approaches. These new tools overcome some limitations of traditional biomonitoring and allow non-invasive sampling, broad taxonomic coverage, high sensitivity, and the possibility to automation. However, the disruptive character and rapid developments of the new technology challenge its implementation. This publication explains the principles of the eDNA technology and presents its advantages and limitations. It shows possible applications of eDNA tools in monitoring and assessment of aquatic ecosystems, and provides detailed protocols and best practices for processing eDNA samples.

Les approches fondées sur l'ADN environnemental (ADNe) sont en passe de transformer la biosurveillance aquatique. Ces nouveaux outils permettent d'outrepasser les limites de la surveillance biologique traditionnelle : ils permettent d'effectuer un échantillonnage non invasif, de couvrir un large éventail taxonomique et offrent une sensibilité élevée ainsi que des possibilités d'automatisation. Cependant, le caractère révolutionnaire et les développements rapides de cette nouvelle technologie entravent sa mise en œuvre. La présente publication explique les principes des méthodes ADNe, en présente les avantages et les limites et formule des suggestions concernant les standards et les pratiques de routine. En outre, elle montre les utilisations possibles des outils fondés sur l'ADNe dans la surveillance et l'évaluation des écosystèmes aquatiques, expose des études de cas spécifiques et propose des protocoles détaillés ainsi que des exemples de bonnes pratiques pour le traitement des échantillons d'ADNe.

Das Biomonitoring aquatischer Lebensräume wird derzeit durch Verfahren, die auf Umwelt-DNA (eDNA) basieren, verändert. Diese neuen Instrumente überwinden gewisse Beschränkungen herkömmlicher Biomonitoringmethoden und erlauben eine nichtinvasive Probenahme, eine breite taxonomische Auflösung, eine hohe Sensitivität und die Möglichkeit, Prozesse zu automatisieren. Allerdings stellen die komplett neue Herangehensweise und die rasche Entwicklung der neuen Technologie Herausforderungen für ihre Einführung in die Praxis dar. In dieser Publikation werden die Grundsätze der eDNA-Technologie erläutert und die Vorteile und Beschränkungen vorgestellt. Es werden mögliche Anwendungen von eDNA-Tools für das Monitoring und die Bewertung aquatischer Ökosysteme aufgezeigt und detaillierte Protokolle und bewährte Praktiken für die Verarbeitung von eDNA-Proben vorgestellt.

Il biomonitoraggio acquatico sta passando ad approcci basati sul DNA ambientale (eDNA). Questi nuovi strumenti superano determinati limiti del biomonitoraggio tradizionale e consentono un campionamento non invasivo, un'ampia copertura tassonomica, sensibilità elevate e la possibilità di automazione. Tuttavia, il carattere dirompente e il rapido sviluppo delle nuove tecnologie mette a dura prova la sua attuazione. La presente pubblicazione spiega i principi della tecnica eDNA e ne presenta vantaggi e limiti. Inoltre, illustra possibili applicazioni degli strumenti eDNA nel monitoraggio e nella valutazione di ecosistemi acquatici, fornisce protocolli dettagliati e buone pratiche per il trattamento di campioni di eDNA.

Keywords:

Biodiversity, environmental indicators, monitoring, method guidelines, eDNA, method standardization.

Mots-clés :

biodiversité, indicateurs environnementaux, surveillance, directives méthodologiques, ADNe, standardisation des méthodes

Stichwörter:

Biodiversität, Umwelt-indikatoren, Monitoring, Methodenrichtlinien, eDNA, Methodenstandardisierung

Parole chiave:

Parole chiave: biodiversità, indicatori ambientali, monitoraggio, linee guida metodologiche, eDNA, standardizzazione dei metodi.

Avant-propos

À l'heure actuelle en Suisse, l'environnement aquatique et les espèces qui y vivent sont fortement mis sous pression par les activités humaines. Les organismes aquatiques sont ceux qui présentent les plus importantes proportions d'espèces éteintes ou menacées. La loi fédérale du 24 janvier 1991 sur la protection des eaux (RS 814.20) et l'ordonnance du 28 octobre 1998 sur la protection des eaux (RS 814.201), qui vient d'être révisée, visent la protection étendue des eaux et de leurs nombreuses fonctions ainsi que leur utilisation durable. L'évaluation de la qualité biologique des cours d'eau revêt une importance capitale pour atteindre les objectifs écologiques.

L'analyse et l'évaluation de la biocénose aquatique impliquent la création d'un jeu de données suffisamment complet et de qualité satisfaisante, un prérequis auquel les méthodes actuellement disponibles ne permettent pas toujours de répondre. Les techniques d'ADN environnemental (ADNe) peuvent contribuer à résoudre ce problème. Elles permettent d'acquérir de multiples informations importantes sur l'état biologique des écosystèmes aquatiques au moyen de simples échantillons d'eau ou de sédiments et présentent de nombreux avantages. L'ADNe suscite un intérêt croissant et une multitude de méthodes sont en cours de développement dans le monde entier. Comme ce domaine évolue rapidement, il est à l'heure actuelle encore difficile, pour les praticiens comme pour les décideurs, de savoir quelles méthodes sont disponibles, lesquelles sont applicables aux études biologiques des eaux et où trouver des informations sur les procédures systématiques à suivre.

Les présentes directives relatives aux utilisations de l'ADNe pour la surveillance et l'évaluation biologiques des écosystèmes aquatiques sont conçues dans la perspective de promouvoir et de soutenir la standardisation et la mise en œuvre des méthodes ADNe dans les études sur les eaux et dans l'évaluation de l'état des écosystèmes aquatiques. Elles s'adressent aux praticiens et aux décideurs (gouvernement, cantons et bureaux d'ingénieurs). Dans ce contexte, elles proposent une vue d'ensemble des différentes méthodes disponibles, présentent les avantages et les inconvénients des méthodes ADNe et formulent des suggestions concernant les bonnes pratiques et les standards de routine.

L'Office fédéral de l'environnement remercie toutes les personnes ayant participé à l'élaboration de ces directives, en particulier les auteurs, le groupe d'experts et les représentants des cantons, dont les contributions sont de très grande valeur.

Stephan Müller
Division Eaux
Office fédéral de l'environnement (OFEV)

1 Introduction

Des écosystèmes sains et intacts sont essentiels au bien-être de l'homme, fournissent un large éventail de services écosystémiques et abritent des organismes vivants d'une diversité exceptionnelle. Cependant, les activités humaines et leurs effets, comme la pollution, l'intensification de l'utilisation des terres, les espèces envahissantes ou encore l'exploitation de l'eau pour la force hydraulique constituent une menace pour l'état des écosystèmes d'eau douce et leur fonctionnement aux niveaux tant local que mondial (Benateau et al., 2019 ; Reid et al., 2019). Il est donc primordial de comprendre, de gérer et de protéger les écosystèmes aquatiques. En Suisse, la loi fédérale du 24 janvier 1991 sur la protection des eaux (RS 814.20) dispose, à ses art. 57 et 58, que la Confédération et les cantons relèvent l'état des eaux. Cette disposition légale englobe expressément des évaluations servant à déterminer si les états écologiques ainsi que les objectifs des écosystèmes aquatiques sont atteints conformément aux exigences de l'ordonnance du 28 octobre 1998 sur la protection des eaux (OEaux ; RS 814.201). L'annexe 1, ch. 1, al. 1, OEaux prévoit que les communautés végétales, animales et de micro-organismes des eaux superficielles doivent être d'aspect naturel et pouvoir se réguler d'elles-mêmes, et présenter une composition et une diversité d'espèces spécifiques à chaque type d'eau peu ou non polluée. Ces exigences permettent de protéger les eaux d'éventuels effets néfastes et ainsi de garantir leur utilisation durable et leur bon état écologique. La Confédération et les cantons surveillent les eaux en s'assurant que les exigences relatives à la qualité des eaux superficielles arrêtées à l'annexe 2, ch. 2, OEaux soient respectées. Il est à ce titre essentiel de disposer de données de qualité sur l'état, mais aussi sur l'évolution des écosystèmes aquatiques ainsi que sur les différentes variables décrivant les composantes individuelles de ces systèmes.

Par conséquent, il est primordial d'effectuer une surveillance adéquate des écosystèmes aquatiques. Des variables et des méthodes existent de longue date à cet effet. Les écosystèmes aquatiques, qui comprennent les plans d'eau comme les étangs et les lacs ainsi que les eaux courantes comme les ruisseaux et les rivières, peuvent être évalués sur la base d'aspects abiotiques,

notamment par la chimie de l'eau et sa structure physique, ou biotiques, par exemple à travers la diversité et la composition des communautés biologiques, qui sont représentatives des valeurs cibles. Il est important de relever que toutes les approches de surveillance des eaux partent du principe que mesurer quelques variables clés permet de décrire l'état actuel et l'évolution potentielle de l'ensemble de l'écosystème. Les valeurs cibles sont donc utilisées comme intermédiaires et comme descripteurs simplifiés d'un système d'une plus grande complexité.

Si elles sont développées et utilisées depuis longtemps, les approches de surveillance pour les valeurs cibles ont évolué progressivement au cours des dernières décennies. Les évaluations chimiques de macronutriments ont d'abord prédominé, avant d'être complétées par des valeurs cibles biologiques caractérisant l'abondance des nutriments dans les systèmes d'eau douce (degrés saprobie notamment), puis par des paramètres décrivant des modifications structurelles ainsi que la pollution due à divers produits chimiques et par une série de groupes taxonomiques reflétant ces effets (poissons, macro-invertébrés ou diatomées). Il est essentiel de noter que l'utilisation des approches de surveillance ainsi que des outils spécifiques requis à cet égard a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, une évolution qui s'explique à la fois par les besoins spécifiques de nouvelles valeurs cibles (p. ex. de nouveaux facteurs tels les micropolluants) et par les techniques disponibles. En Suisse comme ailleurs, un ensemble de standards largement répandus a ainsi vu le jour (voir p. ex. OFEV 2019a). On les retrouve dans des programmes de surveillance à large échelle comme l'Observation nationale de la qualité des eaux de surface (NAWA ; OFEV, 2013 ; Kunz et al., 2016) ou le Monitoring de la biodiversité en Suisse (MBD ; Bureau de coordination du MDB, 2014). Nombre de ces programmes sont opérationnels et efficaces (Wüthrich & Altermatt, 2019). Cependant, ils comportent également des limites intrinsèques et posent des défis, en particulier du fait des méthodes utilisées. Par exemple, la plupart d'entre eux procèdent par échantillonnage, tri puis identification morphologique des organismes, une approche chronophage et viable uniquement pour un ensemble restreint de groupes d'organismes. De plus,

nombre de ces techniques ne peuvent s'appliquer qu'à des cours d'eau accessibles à gué et non à des étendues d'eau de plus grande taille comme les rivières et les lacs. Elles seraient par ailleurs difficilement applicables aux ruisseaux de très petite taille, aux eaux souterraines et aux sources. Aucune des techniques employées actuellement ne saurait être automatisée (ni en matière d'échantillonnage ni en matière de traitement), ce qui limite dès le départ les possibilités d'analyse à des échelles spatiales ou temporelles à haute résolution. Pourtant, la chimie des milieux aquatiques a montré qu'il est nécessaire de travailler avec des échantillons à haute résolution temporelle pour décrire correctement et comprendre les écosystèmes fluviaux.

Au cours des quatre à huit dernières années, une nouvelle méthode ayant le potentiel d'outrepasser ces limites et de révolutionner la surveillance et l'évaluation biologiques des écosystèmes aquatiques a émergé : l'ADN environnemental (ADNe). Il a été démontré que l'ADN non seulement des microbes mais aussi de tout autre organisme peut être échantillonné et extrait à partir d'échantillons environnementaux. L'ADN présent dans les échantillons environnementaux (sol, eau, sédiment ou air) est appelé ADNe. Étant donné les utilisations qu'on peut en faire et le potentiel qu'il présente, l'approche ADNe est un domaine qui évolue rapidement et dont les technologies progressent à un rythme soutenu. Les nouvelles technologies de séquençage à haut débit permettent ainsi aujourd'hui de séquencer de l'ADN à une résolution et à un coût qu'il aurait été impossible d'imaginer il y a tout juste dix ans. La surveillance environnementale fondée sur l'ADN présente plusieurs avantages. Cette méthode n'est pas invasive pour les macro-organismes (il n'est pas nécessaire d'échantillonner les individus), ne dépend pas des taxons (possibilité d'échantillonner tous les organismes, de la bactérie aux plantes et aux animaux) et pourrait être automatisée (à la fois pour l'échantillonnage et le traitement, ce qui permet de hautes résolutions spatiale et temporelle).

Le développement et l'utilisation de l'ADNe suscitent un vif intérêt. Les applications concernent en particulier les écosystèmes aquatiques. À l'heure actuelle, certaines des approches existantes sont déjà bien établies et intégrées à des modèles de surveillance biologique légalement

contraignants (p. ex. pour les espèces envahissantes de carpes aux États-Unis [US Fish and Wildlife Service, 2019] ou les tritons menacés au Royaume-Uni [<https://www.gov.uk/guidance/great-crested-newts-surveys-and-mitigation-for-development-projects>]). Par ailleurs, les progrès réalisés par les biotechnologies défient les frontières de ce qui est techniquement possible à une cadence telle qu'une technologie vieille d'un an devient obsolète. En parallèle, l'implémentation légale et pratique de cette méthode fait l'objet de discussions, de tests et de procédures de standardisation, aux niveaux à la fois régional (p. ex. plusieurs projets pilotes sur l'utilisation de l'ADNe en Suisse aux échelons cantonal et fédéral) et international (p. ex. les discussions sur les normes dans le cadre de l'action COST paneuropéenne *DNAqua Net* et le groupe de travail actif sur ce sujet au sein du comité européen de normalisation CEN [Leese et al., 2018]). Ce développement rapide se traduit par une double conséquence : d'une part, l'exploitation du potentiel de cette méthode et la planification de celle-ci s'effectuent au fur et à mesure et, d'autre part, les espoirs, les attentes et les promesses concernant sa capacité varient considérablement. D'aucuns considèrent ainsi que les approches ADNe sont une solution à l'ensemble des problèmes de surveillance biologique, alors que d'autres se concentrent plutôt sur les limites potentielles et le développement continu de la méthode. Par conséquent, le domaine connaît une évolution rapide, certains aspects et certaines approches étant déjà partiellement implémentés tandis que d'autres ne sont encore qu'idées et visions, mais présentent un fort potentiel d'application à l'avenir.

Pour les parties prenantes et les praticiens, cette situation constitue un défi, car il y a lieu de décider aujourd'hui quelles techniques employer, dans quelles techniques investir, comment (ré)orienter les modèles de surveillance et à quelles promesses se fier. Il est par ailleurs important d'arrêter des normes communes afin de garantir la reproductibilité et la fiabilité de l'implémentation. Pour prendre les bonnes décisions en toute connaissance de cause, il est nécessaire de disposer d'une vue d'ensemble des différentes opportunités techniques, à la fois sous la forme d'un état de l'art, mais aussi d'un aperçu des applications pratiques. Bien que les publications spécialisées sur l'ADNe se multiplient (p. ex. Rees et al., 2014a; Thomsen & Willerslev, 2015; Deiner et al., 2017), de nom-

breuses études ne sont pas directement applicables ou pas accessibles pour les parties prenantes et les praticiens. Outre les publications purement scientifiques, une série de rapports et de directives nationaux qui traitent des nouvelles pratiques moléculaires pour la surveillance biologique ont paru. Cependant, ces publications concernent des taxons ou des habitats spécifiques (p. ex. Laramie et al., 2015; Carim et al., 2016; Holderegger et al., 2019) ou proposent un aperçu de l'implémentation en question et des aspects techniques et non pas un texte détaillé à ce sujet (Herder et al., 2014; Winding et al., 2019). Une synthèse et des directives plus approfondies destinées aux praticiens pourraient contribuer à établir des standards dans le domaine et ainsi favoriser la cohérence des différentes études et la définition de niveaux de qualité minimaux. Enfin, il pourrait être utile de formuler des suggestions pratiques pour faire progresser la prise de décisions et l'implémentation de la surveillance biologique des écosystèmes aquatiques.

Les présentes directives visent à fournir une vue d'ensemble des techniques ADNe disponibles pour réaliser la surveillance (biologique) des organismes vivants dans des écosystèmes d'eau douce. Elles ont en particulier pour objectif de présenter les avantages et les inconvénients des différentes techniques. Elles formulent en outre des suggestions normatives concernant les bonnes pratiques et les standards de routine recommandés. Les recommandations reflètent l'état actuel des connaissances, mais devraient connaître des améliorations et des modifications ultérieures. Ce document met l'accent sur les eucaryotes tels que les poissons, les batraciens, les macro-invertébrés et les diatomées, mais dans de nombreux cas les contenus s'appliquent également aux bactéries. Les recommandations de bonnes pratiques sont généralisables et fournies à un niveau relativement élevé d'abstraction. Ces recommandations de haut niveau sont complétées par des protocoles plus spécifiques qui reflètent des pratiques généralement acceptées et appliquées à ce jour et qui peuvent être considérées comme normatives dans ce domaine qui évolue rapidement. L'objectif du présent document est de contribuer à standardiser et à mettre en œuvre les applications ADNe dans la surveillance et l'évaluation biologiques des écosystèmes aquatiques et, partant, de favoriser l'utilisation durable, la gestion et la protection de ces écosystèmes.

2 ADN environnemental : définitions, utilisations et perspectives

2.1 Définitions

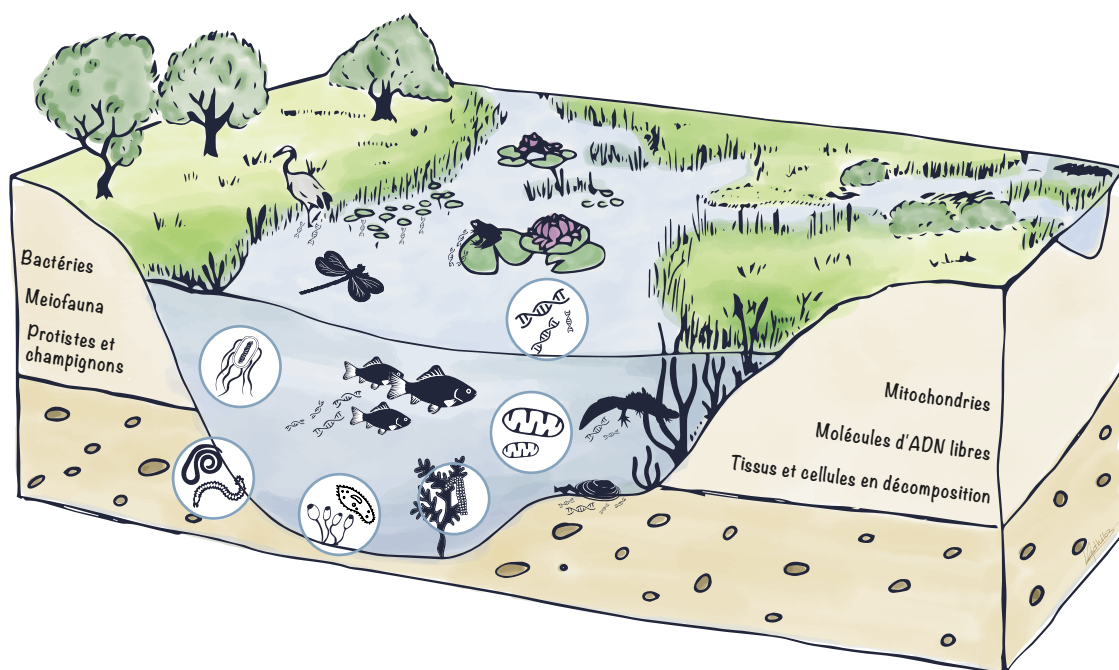
Qu'est-ce que l'ADN environnemental ?

L'ADN environnemental (ADNe) est un ensemble de matériel génomique issu d'organismes vivants et de leurs résidus présents dans différents types d'échantillons environnementaux (eau, sédiments, sol, air, cf. fig. 1). La majeure partie de l'ADN identifié dans les échantillons environnementaux provient de micro-organismes unicellulaires (virus, bactérie ou protiste), dont l'abondance est généralement très élevée. Cependant, les échantillons d'ADNe comprennent également du matériel génomique issu d'organismes pluricellulaires : soit des organismes entiers de petite taille (zooplancton ou méiofaune), soit des traces et des résidus d'organismes de plus grande taille (vertébrés, invertébrés ou plantes). Ces traces génétiques animales et végétales, parfois appelées «extra-organismal DNA» (ADN hors de l'organisme) ou

«macrobial DNA» (ADN macrobien) (Barnes & Turner, 2016), incluent les étapes de reproduction comme les gamètes, mais aussi les fragments de tissus, les cellules épithéliales et les sécrétions produits ou rejetés par les organismes au cours de leur cycle de vie. Elles sont conservées dans l'environnement pendant un certain temps : de plusieurs heures à plusieurs jours dans la colonne d'eau (Sansom & Sassoubre, 2017), plusieurs décennies, voire siècles dans les sédiments (Monchamp et al., 2018) et jusqu'à des millénaires dans la glace (Pedersen et al., 2015) et dans les fonds marins (Lejzerowicz et al., 2015). Récolter et analyser cet ADNe permet de détecter et de surveiller les espèces macrobiennes même si les organismes concernés ne sont pas directement présents dans les échantillons environnementaux.

Figure 1

Tous les organismes contribuent potentiellement à l'ADNe, qui peut provenir d'origines diverses, notamment des cellules entières ou des fragments de tissus, des organelles ou encore de l'ADN libre. L'ADNe peut être échantillonné dans l'eau, le sol, l'air ou les sédiments.



Le présent document adopte une définition *sensu lato* de l'ADNe, qui comprend de l'ADN d'origines différentes, espèces microbiennes et macrobiennes comprises. Ce choix est volontaire et s'explique par le fait que certains programmes de surveillance biologique de routine utilisent également des indicateurs biologiques unicellulaires comme les diatomées. Le document prend également en compte l'ADN extrait d'échantillons mixtes de macro-invertébrés obtenus par filet troubleau ou tamisage. Par souci de clarté, l'origine spécifique de l'ADN est chaque fois précisée dans l'ensemble du document.

Qu'est-ce que le barcoding et le metabarcoding de l'ADN ?

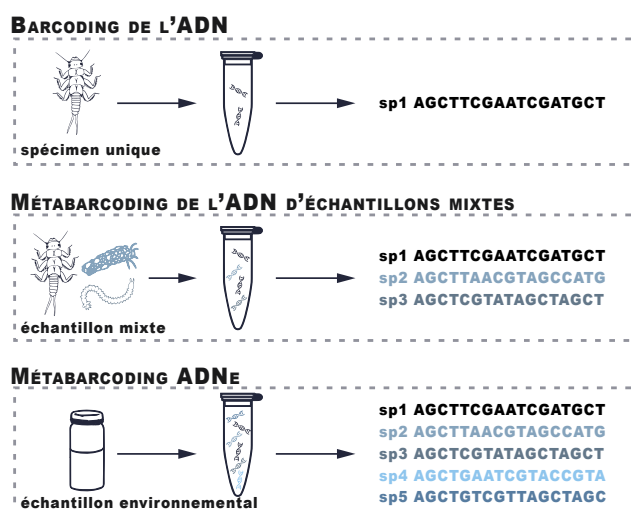
Les molécules d'ADN contiennent des informations génétiques spécifiques à chaque espèce. Une sélection de courts fragments d'ADN, appelée **code-barres ADN**, peut être utilisée pour identifier une espèce ou un taxon de rang supérieur. Ces fragments sont généralement composés d'une région hypervariable et permettent d'utiliser la même région de code-barres pour diverses espèces appartenant à un même groupe taxonomique. Dans l'idéal, le code-barres ADN doit varier suffisamment pour que des espèces proches puissent être différenciées (variabilité interspécifique), mais être relativement bien conservé au sein d'une espèce (conservation intraspécifique). Il existe des gènes standards largement reconnus qui sont couramment utilisés pour identifier des animaux (Hebert et al., 2003), des plantes (Hollingsworth, 2011), des champignons (Schoch et al., 2012) ou encore des protistes (Pawlowski et al., 2012).

En général, chaque code-barres est associé à un spécimen de référence à partir duquel il a été obtenu. Le consortium IBOL (*International Barcode of Life*, <https://ibol.org>) gère une base de données mondiale des codes-barres ADN (www.boldsystems.org). En Suisse, SwissBOL (www.swissbol.ch) se charge de la gestion des codes-barres de la faune et la flore helvétiques (cf. chap. 6).

Figure 2

Explication schématique du barcoding, du metabarcoding de l'ADN issu d'échantillons mixtes et du metabarcoding environnemental (ADNe)

Dans le cas du barcoding, l'ADN est extrait d'un spécimen unique : l'ADN de ce spécimen est séquencé pour une région spécifique du code-barres. Pour le metabarcoding de l'ADN issu d'échantillons mixtes, l'ADN est extrait des tissus d'un grand nombre de spécimens appartenant potentiellement à de nombreuses espèces. S'agissant du metabarcoding ADNe, l'ADN est extrait directement de l'échantillon environnemental (eau, sol, sédiment, air). Les deux dernières approches génèrent des séquences pour de nombreux taxons différents, qui doivent ensuite être différenciées par un traitement bio-informatique.



Le *metabarcoding* est différent du barcoding de l'ADN en ce sens qu'il analyse une communauté d'espèces plutôt qu'une espèce unique (voir fig. 2). L'échantillon de la communauté peut être soit environnemental soit mixte. Un échantillon mixte est un mélange d'organismes entiers issus de l'environnement. Le nombre de métacodes-barres trouvés dans un échantillon peut être très élevé et dépend de la spécificité du gène de barcoding et de la diversité des espèces présentes dans l'environnement. Le plus grand défi d'une étude classique de metabarcoding est d'assigner des métacodes-barres aux espèces ou aux catégories taxonomiques supérieures. L'efficacité de l'attribution taxonomique dépend du degré de complétude de la base de référence contenant les codes-barres. Les lacunes des bases de référence des codes-barres représentent la plus grande entrave à l'interprétation écologique des données de metabarcoding (Weigand et al., 2019).

2.2 Applications potentielles

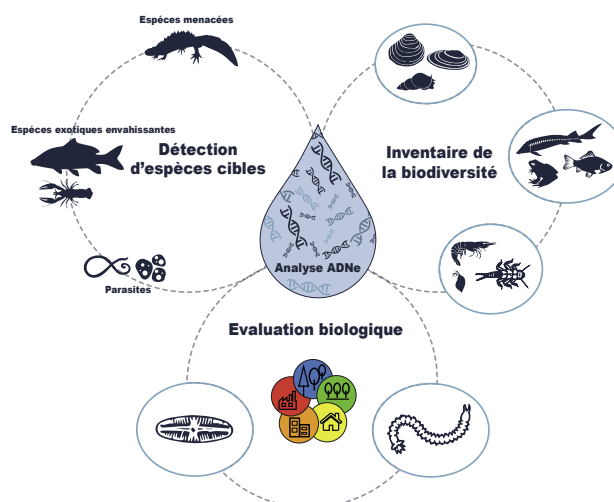
L'ADNe peut être utilisé de trois manières principales pour la surveillance biologique des écosystèmes aquatiques (cf. fig. 3) :

- la détection d'espèces cibles ;
- l'inventaire de la biodiversité (composition de la communauté) ;
- l'évaluation biologique (indices biotiques).

La **détection d'espèces cibles** est couramment utilisée en biologie de la conservation (surveillance d'espèces rares ou menacées), pour la gestion et le suivi des invasions biologiques (Harper et al., 2017 ; Holderegger et al., 2019) et pour la détection de parasites et de pathogènes (Krieg et al., 2019b). Il pourrait être nécessaire de développer des sondes spécifiques pour pouvoir détecter certaines espèces cibles avec cette technique. Un des avantages propres à la méthode de détection d'espèces cibles est la possibilité de quantifier l'ADN de manière relativement exacte par des procédés d'amplification en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*, PCR) : PCR quantitative (ou PCR en temps réel, qPCR) et PCR numérique, aussi appelée PCR digitale, (dPCR). Cette approche s'est révélée très efficace dans de nombreuses études relatives à des espèces envahissantes ou menacées de poissons, de batraciens, de mollusques ainsi que dans des études sur les pathogènes et les parasites, dans le cadre desquelles des traces d'ADN ont été détectées dans l'eau et dans les sédiments (Jerde et al., 2011 ; Mächler et al., 2014 ; Bass et al., 2015). Son application aux crustacés (en particulier les écrevisses, cf. Krieg et al., 2019a) et aux taxons à squelette externe comme les coléoptères pose toutefois des difficultés, probablement du fait de la diffusion réduite de leurs traces dans l'environnement, qui résulte en une quantité d'ADNe en deçà des limites de détection de ces méthodes. Goldberg et al. (2016), et bien d'autres chercheurs, ont fait état des particularités de l'utilisation de l'ADNe pour la détection ciblée d'espèces aquatiques.

Figure 3

Les applications potentielles de l'ADNe comprennent la détection d'espèces cibles, l'inventaire de la biodiversité et l'évaluation biologique à enlever sur la base de l'ADN extrait d'échantillons environnementaux.



Une autre application courante de l'ADNe est l'**inventaire de la biodiversité**. Dans ce cas, la méthode de métabarcoding environnemental est utilisée pour générer des informations sur la composition, la structure et la diversité d'une communauté d'organismes. Cette méthode repose sur des technologies de séquençage à haut débit (*high-throughput sequencing*, HTS) qui génèrent des millions de séquences d'ADN et permettent potentiellement d'identifier toutes les espèces présentes dans un échantillon, y compris des espèces rares et peu visibles. Il a été démontré que le métabarcoding peut fournir des listes d'espèces aussi complètes que les méthodes traditionnelles fondées sur la pêche électrique (Hänfling et al., 2016) ou l'échantillonnage par filet troubleau (Fernández et al., 2018 ; Mächler et al., 2019). La plupart des inventaires de la biodiversité des écosystèmes aquatiques fondés sur l'ADNe utilisent des échantillons d'eau ou de sédiments. Cependant, pour les insectes aquatiques et le macrozoobenthos, des chercheurs ont proposé d'analyser de l'ADN issu d'échantillons mixtes comme solution plus directe pour une implémentation à court terme (Blackman et al., 2019). Si cette solution résulte en des estimations plus comparables à celles des techniques existantes que les approches fondées sur l'ADNe, elle se heurte toutefois aux mêmes limites que les méthodes déjà

disponibles (p.ex. échantillonnage coûteux en temps ou biaisé par la taille).

Les données de métabarcoding peuvent également être utilisées pour calculer des **indices biotiques** servant à éva-

luer l'impact environnemental (Pawlowski et al., 2018). Il existe environ 300 méthodes d'évaluation reconnues en Europe (Birk et al., 2012), dont quatre sont utilisées actuellement en Suisse (cf. pour les poissons : Schager & Peter, 2004 ; pour les invertébrés aquatiques : Stucki, 2010 ; pour

Tableau 1

Avantages et inconvénients de l'analyse ADNe par comparaison avec des approches traditionnelles

Nombre de ces éléments sont pertinents en particulier pour les organismes concernés par la législation relative à la protection des animaux (p.ex. des poissons, des décapodes et des batraciens).

	ADNe	Échantillonnage traditionnel / Identification morphologique
Temps par échantillon	Plus rapide si grand nombre d'échantillons	Fixe (donc peu de marge d'optimisation temporelle)
Coûts par échantillon	Dégressifs plus le nombre d'échantillons augmente (seulement métabarcoding)	Fixes
Sensibilité	Souvent très élevée, avec détection de traces d'espèces, formes juvéniles et stades de reproduction compris	Généralement faible, de nombreux efforts d'échantillonnage nécessaires pour acquérir une liste d'espèces complète
Éventail taxonomique	Généralement large ; pouvant s'appliquer à de nombreux groupes taxonomiques	Limité aux taxons pouvant être distingués morphologiquement
Déteçtabilité	Très élevée, utile pour détecter des espèces rares, envahissantes et pathogènes	Échantillonnage intensif requis
Échantillonnage	Non invasif, sauf pour les échantillons mixtes	En général invasif (pêche électrique ou filet troubleau)
Observations sur le terrain	Utilisation nécessaire de matériel spécifique sur le terrain (p.ex. PCR portable)	Possibles dans le cas des animaux de grande taille et des plantes
Traitement des échantillons	Complexe, possibilité d'automatisation	En général par des manipulations simples, mais traitement manuel (pas d'automatisation possible)
Contamination	Méthode très sensible, donc risque potentiel de contamination	Faible risque de contamination
Infrastructure	Laboratoire moléculaire spécialisé nécessaire	Équipement simple suffisant
Identification d'espèces	Fondée sur une base de référence, généralement publique Possibilité de détecter les espèces cryptiques et les variétés génétiques	Fondée sur la propre expertise taxonomique et la littérature disponible
Données qualitatives	Liste d'espèces et séquences clusterisées (OTU) provenant des organismes vivants et leurs résidus	Liste d'espèces vivantes, structure des populations et état de santé
Données quantitatives	Abondance relative des séquences (métabarcoding) ou quantification de l'ADN (qPCR)	Abondance absolue des spécimens dans l'échantillon
Analyse des données	Traitement bio-informatique nécessaire pour l'analyse des séquences	Outils statistiques relativement simples
Interprétation des données	Prise en compte nécessaire de différents biais techniques et des caractéristiques spécifiques de l'ADNe (rémanence et transport)	En fonction de la propre expertise et des connaissances écologiques établies
Normalisation	Élaboration nécessaire de normes	Normes déjà disponibles

les plantes : Känel et al., 2017 ; et pour les diatomées : Hürlimann & Niederhauser, 2007). Des efforts considérables ont été accomplis pour calculer ces indices sur la base de données ADNe, en particulier dans le cas des diatomées (cf. 8.4.1). Les défis principaux sont les lacunes dans les bases de référence des codes-barres ADN (Weigand et al., 2019) et les difficultés liées à l'interprétation des données ADNe quantitatives. Les solutions proposées pour dépasser ces limites sont prometteuses et les nouveaux indices moléculaires sont en cours de développement (Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2017).

2.3 Avantages et inconvénients

L'utilisation d'approches ADNe présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes traditionnelles fondées sur un échantillonnage direct des organismes suivi d'une identification morphologique (tab. 1). Par exemple, l'ADNe permet d'effectuer un échantillonnage non invasif, d'identifier des spécimens peu visibles et fragmentés ou encore d'élargir l'éventail de taxons indicateurs. Cependant, la méthode de l'ADNe s'accompagne également d'inconvénients majeurs qu'il convient de prendre en compte. Comme il s'agit d'une méthode qui évolue rapidement, certains de ces inconvénients disparaîtront, mais d'autres pourraient demeurer, car inhérents à la méthode. Ainsi, les approches ADNe pourraient être moins appropriées pour évaluer l'abondance et ne peuvent pas fournir d'informations sur la structure des âges ou des tailles d'une population. De plus, ces approches ne permettent pas d'identifier les hybrides ni les espèces récemment différenciées (p. ex. des espèces de poissons à chair blanche du genre *Coregonus*) pouvant être identifiées uniquement par des génotypes multiloci ou par un fort déséquilibre de liaison. Dans ces derniers cas, les informations concernant l'identité de l'espèce sont localisées sur plusieurs chromosomes et seuls des échantillons de tissus prélevés sur des individus uniques permettent un diagnostic. Le présent document offre un tour d'horizon et une description des avantages et des meilleures applications technologiques à l'heure actuelle, tout en soulignant et en expliquant les cas où il convient de faire preuve de prudence dans l'interprétation et dans la comparaison des résultats par rapport aux méthodes d'évaluation traditionnelles.

3 ADNe dans les écosystèmes d'eau douce

Le pool d'ADNe présent dans les écosystèmes aquatiques provient d'organismes microbiens et macrobiens et comprend également des animaux de petite taille (zooplankton et méiofaune benthique). L'interprétation de l'ADNe dépend du type et de l'origine de ce dernier. S'il s'agit de composants microbiens et de méiofaune, l'ADN dérivé de ces organismes dans les échantillons environnementaux peut être plus directement lié à la biologie et à l'écologie des organismes vivants, car les individus peuvent être présents en entier dans les échantillons d'ADNe. L'ADN des organismes macrobiens est quant à lui issu de résidus cellulaires en suspension dans l'eau ou liés à des particules des sédiments. Dans ce cas, la détectabilité de l'ADNe dépend de facteurs environnementaux et biologiques sans rapport avec les organismes. Ces facteurs peuvent être classés en trois catégories principales : la production, la décomposition et le transport de l'ADN

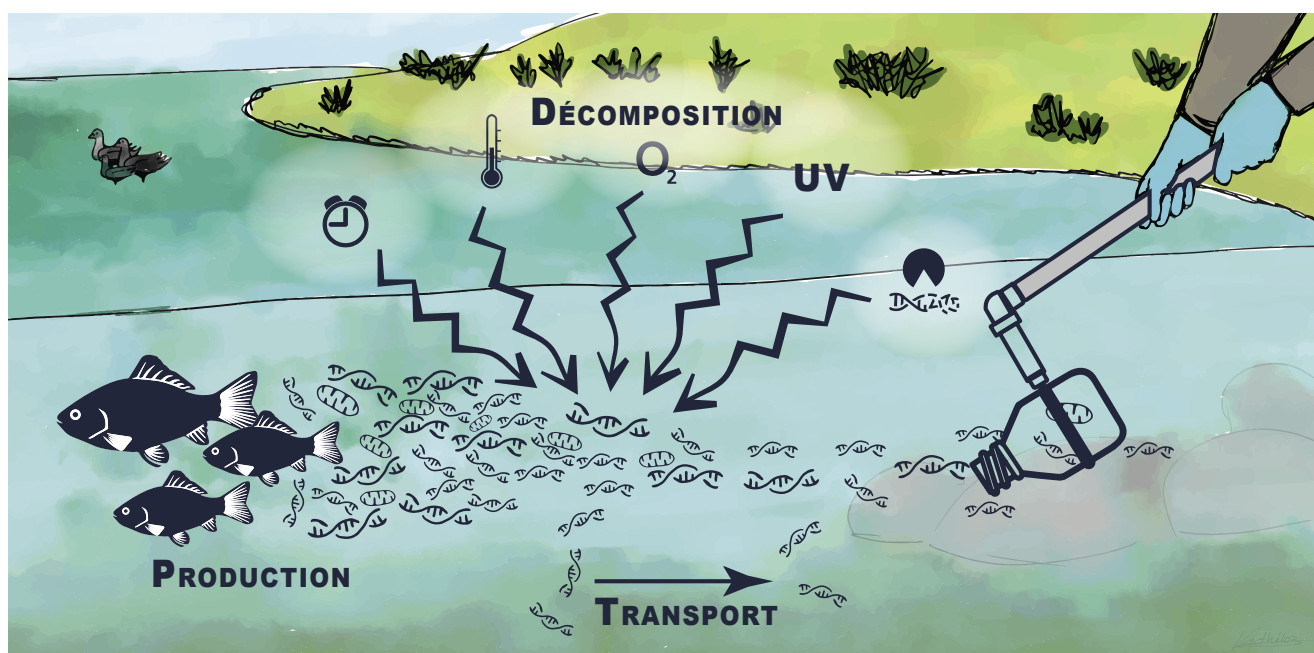
(cf. fig. 4). Ils ont un impact direct sur la détectabilité de l'ADNe macrobien et, dans une moindre mesure, sur la détectabilité de l'ADN microbien et de la méiofaune.

La **production**, en d'autres termes la propagation d'ADN dans l'environnement, dépend largement de l'abondance et de la densité d'un taxon ainsi que de ses caractéristiques biologiques et physiologiques. Les poissons et les batraciens libèrent d'importantes quantités d'ADN dans leur environnement, alors que les arthropodes le font beaucoup moins, probablement en raison de leur exosquelette. En principe, la quantité d'ADN libéré dépend également de l'activité métabolique propre à chaque espèce et peut évoluer durant un cycle de vie, par exemple augmenter durant la saison de reproduction (Maruyama et al., 2014 ; Bylemans et al., 2016). La production d'ADNe peut varier sensiblement dans le temps et l'espace selon les

Figure 4

La production et le sort de l'ADNe macrobien dans les habitats aquatiques

Il y a production d'ADNe lorsque des organismes libèrent de l'ADN dans leur environnement (p. ex. mucus des poissons). Cet ADNe subit ensuite différents processus de décomposition (température et décomposition microbienne notamment) et peut être transporté par des flux d'eau passifs. Les trois étapes que sont la production, la décomposition et le transport peuvent influencer l'interprétation des données ADNe.



espèces, ce qui rend l'interprétation quantitative des données ADNe difficile.

La **décomposition** de l'ADN dépend de divers facteurs physicochimiques et biologiques, notamment la température, les UV, le pH, les ions et l'activité microbienne (Strickler et al., 2015; Barnes & Turner, 2016). Plusieurs études montrent que l'ADNe macrobien survit plus longtemps dans des conditions plus froides, plus sombres et plus alcalines (Goldberg et al., 2015). On suppose également que l'activité bactérienne a un fort impact sur la décomposition de l'ADNe, souvent en rapport avec les paramètres physicochimiques tels que la température ou les demandes en phosphore. La conséquence évidente de la décomposition de l'ADNe est la diminution du nombre de molécules qui peuvent être détectées. Des recherches ont montré que l'ADN libre ne survit en général pas plus de 14 à 60 jours dans la colonne d'eau (Goldberg et al., 2015). Cependant, la décomposition peut aussi engendrer certaines modifications chimiques des molécules d'ADN et entraver le processus d'identification des espèces dans les données ADNe. Par ailleurs, la décomposition de l'ADNe doit être prise en compte également après l'échantillonnage et pendant le traitement des échantillons. Par exemple, les échantillons doivent être stockés et manipulés de manière à garantir la conservation de l'ADNe, ce qui implique en général un stockage à -20°C ou dans des solutions tampons adéquates.

Le **transport** de l'ADNe macrobien se rapporte aux mouvements passifs dans l'environnement de l'ADN intracellulaire, extracellulaire ou fixé sur des particules (p. ex. via des flux d'eau ou le vent). L'ADNe macrobien peut donc être échantillonné à un endroit différent que celui où il a été produit. Le transport a été étudié avant tout pour les écosystèmes lotiques. Par exemple, des chercheurs ont estimé que l'ADNe peut être transporté sur au moins 10 km dans les ruisseaux (Deiner & Altermatt, 2014; Civade et al., 2016) et sur une distance pouvant atteindre les 100 km dans les grandes rivières, à un rythme estimé à 41,7 heures pour 100 km (Pont et al., 2018). Pont et al. (2018) ont suggéré que l'ADNe macrobien se comporte comme de la matière organique à particules fines et que la distance de transport dépend des propriétés hydrauliques du cours d'eau. Comme l'ADNe peut potentiellement être transporté sur de longues distances, son

analyse fait ressortir des informations sur la biodiversité à de vastes échelles spatiales et intègre des informations au niveau des bassins versants (partiels) (Deiner et al., 2016). À l'inverse, ce transport peut entraver l'interprétation à l'échelle restreinte des sites où une espèce est effectivement présente. Pour les espèces très mobiles (c'est le cas de nombreux poissons), le transport est moins problématique, mais les spécialistes des habitats pourraient rencontrer certains problèmes dans l'interprétation des résultats ADNe. Le transport d'ADNe macrobien est par ailleurs entraîné par le mouvement d'autres espèces, par l'intermédiaire de leur nourriture et de leurs excréments.

La **détectabilité** dépend à la fois de la production, de la décomposition et du transport, mais aussi de la stratégie d'échantillonnage. Les facteurs d'influence sont notamment la proximité du site d'échantillonnage avec l'habitat de l'espèce considérée et la quantité de matériel échantillonné. L'efficacité de la détection dépend par ailleurs des procédés moléculaires employés, et en particulier de l'efficacité des méthodes d'extraction d'ADN et de la spécificité des amorces PCR.

3.1 Étude de l'ADNe pour différentes étendues d'eau

L'étude de l'ADNe dépend du type d'écosystème aquatique concerné. Bien que les méthodes d'échantillonnage présentent des similitudes générales, il n'existe pas de technique d'échantillonnage ADNe standard s'appliquant à tous les types d'eaux, car la méthode d'échantillonnage dépend des différentes propriétés chimiques et physiques des eaux et doit être adaptée au type d'eau analysé. Cette section présente certaines caractéristiques de l'ADNe spécifiques aux écosystèmes lentiques, d'une part, et lotiques, d'autre part (cf. résumé dans le tab. 2).

3.1.1 Plans d'eau (écosystèmes lentiques)

Les plans d'eau, en particulier les étangs, ont fait partie des premiers types d'eaux échantillonnées en vue d'y détecter des espèces par ADNe (Ficetola et al., 2008), probablement du fait de leur taille restreinte et bien délimitée. Avec plus de 1500 lacs dépassant 0,5 ha de surface et encore davantage d'étangs, la Suisse compte de

nombreux plans d'eau. Cependant, il n'existe aucune méthode officielle standardisée pour effectuer la surveillance biologique des lacs ou des étangs. La taille de ces eaux est variable, ce qui pourrait influencer sur l'ADNe macrobien et la façon dont celui-ci peut être échantillonné. Tout en sachant qu'il existe de nombreuses situations intermédiaires dans la nature, le présent document se concentre sur deux cas extrêmes : les étangs de petite taille et les grands lacs.

Étangs

Il existe peu de documentation sur les étangs de petite taille, qui se voient actuellement négligés par le cadre légal helvétique. La directive-cadre sur l'eau de l'Union européenne n'en tient pas compte non plus, probablement car les méthodes d'échantillonnage actuelles utilisées pour d'autres habitats aquatiques ne sont pas adéquates dans leur cas. La surveillance fondée sur l'ADNe pour ces systèmes pourrait ainsi marquer un tournant.

S'agissant du volume qu'ils contiennent, les étangs présentent une grande variabilité et peuvent même, dans certains cas, s'assécher périodiquement. De plus, ils sont souvent stratifiés et leurs eaux ne sont que peu transportées verticalement ou horizontalement. Il en découle trois problèmes importants qui doivent être pris en compte lors d'un échantillonnage dans un étang (Harper et al., 2019a). Premièrement, pour les eaux stagnantes, l'ADNe macrobien est réparti de manière inégale ; un échantillon représentatif doit donc comprendre plusieurs sous-échantillons prélevés sur différents points de l'étang. Deuxièmement, comme les flux sont réduits, l'ADN s'accumule dans le temps, mais les températures des eaux de petite taille sont très variables et particulièrement élevées en été, ce qui accélère la décomposition de l'ADNe. Troisièmement, les étangs sont souvent caractérisés par une haute turbidité, souvent due à des matières organiques dissoutes et des eaux de ruissellement. Cette turbidité élevée peut rendre difficile la filtration de l'eau. L'utilisation du procédé de précipitation, des pores de filtre de plus grande taille ou une étape de pré-filtration peuvent aider à limiter cet inconvénient. Les matières organiques dissoutes peuvent par ailleurs considérablement inhiber la réaction de PCR et entraver l'amplification de l'ADN des espèces cibles. Dans le cas des étangs, il est donc fortement conseillé d'utiliser un

contrôle positif interne pour quantifier l'ampleur de l'inhibition de la PCR.

Lacs

La Suisse compte de nombreux lacs, dont certains font partie des plus grands et des plus profonds d'Europe. L'étude de leur diversité est considérablement restreinte pour des raisons d'accessibilité (profondeurs de 200 m, voire plus) et de leurs tailles respectives. Il n'en reste que la taille et la profondeur des lacs helvétiques varient fortement et influencent la distribution de l'ADNe dans leurs eaux. Les lacs profonds se stratifient en été et en hiver, puis connaissent des phases de brassage au printemps et en automne. La variabilité saisonnière des mouvements des eaux a donc un impact sur la distribution de l'ADNe macrobien présent dans la colonne d'eau. Il est important de prélever des échantillons à différentes profondeurs, car certaines espèces (en particulier les poissons benthiques) ne peuvent être trouvées que si des échantillons sont prélevés à proximité de leurs habitats (Hänfling et al., 2016).

3.1.2 Eaux courantes (écosystèmes lotiques)

Comme le flux des eaux courantes tels les rivières et les ruisseaux est unidirectionnel, l'ADNe macrobien prélevé dans ces systèmes présente une inférence spatiale différente de celle des écosystèmes aquatiques stagnants (Deiner & Altermatt, 2014 ; Deiner et al., 2015). Les mouvements des eaux transportent l'ADNe à travers le système et sont affectés par le débit (Carraro et al., 2018). Bien que ces processus de transport (et la décomposition étroitement liée dans le temps) diminuent l'utilité des approches ADNe dans les eaux courantes pour des évaluations très localisées (pour des sites spécifiques), ils recèlent un certain potentiel pour déduire des caractéristiques au niveau du bassin versant, à une échelle pouvant atteindre plusieurs kilomètres carrés (Deiner et al., 2016 ; Altermatt et al., 2020 ; Carraro et al., 2020).

Contrairement aux plans d'eau, qui possèdent une couche de sédiments continue stratifiée sur le plan chronologique permettant d'utiliser l'ADNe pour la reconstruction des changements environnementaux survenus dans les décennies voire les siècles passés, les écosystèmes lotiques ont des sédiments dynamiques régulièrement

mélangés, ce qui explique qu'ils aient été bien moins utilisés pour des études ADNe.

Ruisseaux

L'ADNe présent dans l'eau des ruisseaux peut être influencé par les affectations des terres alentour (Mansfeldt et al., 2020). Les intrants des sols et des feuilles tombant dans les cours d'eau créent un signal terrestre, mais pas seulement : ils entraînent une inhibition en raison des acides humiques, ce qui complique l'utilisation de la PCR et implique que l'ADN soit purifié en laboratoire. Les ruisseaux alpins alimentés par des glaciers accueillent de nombreuses matières solides en suspension. Leurs

régimes saisonniers peuvent considérablement varier entre la période hivernale et celle de fonte des neiges, une variation qui peut être ignorée dans le cas des cours d'eau de basse altitude. Cependant, la densité des stations d'épuration des eaux usées est plus importante dans les régions de basse altitude et parfois les effluents déversent de grandes quantités d'eau dans les cours d'eau, laissant derrière eux une trace des eaux usées des collectivités (Mansfeldt et al., 2020).

Rivières

Détecter l'ADNe dans les rivières pose d'autant plus de défis spécifiques que leur taille et leur débit sont grands.

Tableau 2

Sélection d'aspects spécifiques liés à l'étude de l'ADNe pour différents écosystèmes aquatiques

Écosystème	Aspect spécifique	Caractéristique ADNe et solution d'atténuation possible
Étangs	Stratification	Distribution inégale, sites multiples
	Débit réduit	Accumulation au cours du temps
	Turbidité élevée	Filtration, inhibition de la PCR
	Températures élevées	Décomposition accélérée
	Assèchement	Non-disponibilité de l'ADNe dans l'eau
	Surface de petite taille	Concentration élevée d'ADNe
Lacs	Taille et stratification saisonnière	Distribution irrégulière au cours du temps
	Habitats dépendant de la profondeur	Échantillons à différentes profondeurs
	Prolifération des algues	Filtration, inhibition de la PCR
	Stratification des sédiments	Conservation de l'ADNe dans le temps
Ruisseaux	Transport	Inférence spatiale dépendant des mouvements locaux des eaux
	Intrants de matières organiques provenant des sols et feuilles	Inhibition de la PCR du fait des acides humiques
	Transport en aval	Intégration des bassins versants
Rivières	Surface de grande taille	Augmentation des volumes d'échantillonnage, stratégies d'échantillonnage spécifiques
	Transport sur de longues distances	Dissémination et distribution spatiale
	Habitats dépendant de la profondeur	Échantillonnage à la surface et au fond des rivières
	Transport en aval	Intégration des bassins versants
Eaux souterraines	Accès potentiellement difficile	Échantillonnage possible uniquement aux sources ou captages
	Environnement froid et sombre	Bonne conservation
	Temps et distance de transport inconnus	Origines et dynamiques non définies
	Peu d'informations sur la biodiversité	Lacunes importantes dans la base de référence ADN
Sources	Températures basses	Conservation de l'ADN
	Peu d'informations sur la biodiversité	Lacunes dans la base de référence ADN

Un échantillon prélevé depuis une rive pourrait ne pas être représentatif et la stratégie d'échantillonnage doit dans certains cas être adaptée à l'habitat des organismes et comprendre des échantillons réalisés au milieu ou au fond de la rivière. Par exemple, les poissons benthiques sont plus susceptibles d'être détectés lorsque l'échantillon d'eau est prélevé à proximité du fond de la rivière (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm, 2016). Il a été proposé de récolter puis filtrer de plus grands volumes d'eau pour les rivières que pour les ruisseaux ou les étangs (de 10 à 100 l, voire plus), mais procéder de la sorte peut poser certaines difficultés étant donné que les sédiments peuvent encrasser les filtres. La distance de transport et la vitesse de dépôt des particules contenant de l'ADN doivent être prises en compte dans l'interprétation des données, car ces paramètres peuvent contribuer à la dissémination de l'ADNe sur de longues distances (Deiner & Altermatt, 2014).

3.1.3 Eaux souterraines et sources

Les eaux souterraines représentent la principale source d'eau potable en Suisse. Si elles font aujourd'hui l'objet d'un suivi dans le cadre du programme Observation nationale des eaux souterraines (NAQUA ; OFEV, 2019b), aucun indicateur biologique n'est relevé. Quelques rares études se concentrant sur la détection d'espèces spécifiques dans des échantillons d'ADNe issu des eaux souterraines existent, mais le nombre de publications caractérisant la communauté microbienne de ce type d'habitat est faible (Danielopol et al., 2000 ; Sohlberg et al., 2015), et ce bien que la méthode puisse être plus appropriée pour la caractérisation biologique des habitats en eaux souterraines. Il n'est pas toujours aisé d'obtenir un échantillon représentatif, car certains types d'eaux souterraines sont difficiles d'accès. Les captages d'eau potable peuvent néanmoins représenter un point d'accès pratique. Bien qu'on ne dispose souvent d'aucune information sur les dimensions temporelle et spatiales du transport des eaux souterraines, on peut supposer que les environnements froids et sombres sont potentiellement idéaux pour conserver l'ADNe.

Même si elles sont visibles en surface, les sources ont été jusqu'ici largement ignorées par les programmes d'observation nationaux. Elles représentent des habitats hautement spécialisés pour la flore et la faune. Des méthodes

standardisées de classification des sources au niveau national ont été implémentées récemment (Küry et al., 2019). En couvrant un large éventail d'organismes caractéristiques des sources (batraciens, turbellariés, mollusques, crustacés, éphéméroptères, plécoptères, odonates et trichoptères, cf. Lubini et al., 2016), le métabarcoding environnemental pourrait se révéler particulièrement utile pour ces classifications. Des intrants provenant d'habitats terrestres pourraient également finir dans les sources et les eaux d'amont, ce qui est susceptible d'accroître la survenance d'ADNe d'organismes d'origine terrestre.

3.2 Étude de l'ADNe pour des taxons particuliers

Les approches ADNe ont été utilisées pour une large variété de groupes taxonomiques, que ce soit pour la détection d'espèces ou pour dresser des inventaires de communautés entières. Comme le montre la liste ci-après, il convient de se poser plusieurs questions essentielles lors de la préparation d'une étude ADNe pour des taxons spécifiques.

- Les taxons considérés sont-ils bien représentés dans l'échantillon environnemental ?
- Quels types de matériaux convient-il d'échantillonner ?
- Existe-t-il des protocoles d'échantillonnage ?
- Quels marqueurs génétiques et quelles amorces utiliser ?
- Quel est le degré de complétude de la base de référence pour les codes-barres ADN concernés ?

Dans les sections qui suivent, des aspects spécifiques relatifs à l'étude de l'ADNe de différents groupes taxonomiques sont présentés et analysés (tab. 3). L'annexe contient des protocoles détaillés et des exemples de bonnes pratiques pour certains taxons.

3.2.1 Batraciens

Les batraciens se prêtent particulièrement bien aux études ADNe, car on pense qu'ils diffusent de grandes quantités d'ADN dans l'environnement, ce qui rend leur détection relativement facile. De plus, toutes les espèces de Suisse sont représentées dans les bases de référence

ADN. Les batraciens ont compté parmi les premiers groupes d'espèces auxquels les approches d'ADNe macrobien ont été appliquées (Ficetola et al., 2008). L'utilisation de l'ADNe pour ce groupe suscite un vif intérêt, car il a été démontré que la détection par ADNe est plus sensible et présente des taux moins élevés de faux négatifs que les procédures d'échantillonnage classiques (Cruickshank et al., 2019).

L'ADNe est fréquemment utilisé pour détecter des espèces de batraciens spécifiques telles que le triton crêté, une espèce menacée au Royaume-Uni (Biggs et al., 2015 ; Harper et al., 2017 ; Rees et al., 2014b). La détection des batraciens par ADNe a été testée dans des ruisseaux et des étangs, en fonction de l'habitat préféré des espèces concernées. Si l'eau constitue la principale source d'ADNe pour les batraciens, les techniques d'échantillonnage varient selon les études. Lorsque les habitats sont des étangs, les études favorisent parfois la précipitation de l'ADNe, car des particules en suspension sont présentes dans la colonne d'eau, mais il est également possible de procéder par filtration (cf. 4.1.1). Cette approche connaît des limites dans le cas des complexes d'espèces, comme les grenouilles aquatiques du genre *Pelophylax* ou les hybrides (en Suisse, p. ex. *Triturus cristatus* et *carnifex*), qui ne peuvent pas être différenciés à partir de l'ADNe. De plus, des espèces au mode de vie semi-aquatique (*Salamandra salamandra*) ou terrestre (*Salamandra atra* ou *Hyla arborea*) pourraient être moins souvent détectées dans les échantillons prélevés dans l'eau (Holderegger et al., 2019).

Les marqueurs génétiques mitochondriaux 12S et 16S sont fréquemment utilisés pour détecter l'ADNe des batraciens. Il existe des amorces 12S spécifiques pour les grenouilles et les salamandres (Valentini et al., 2016) et des amorces 12S pour les tritons (Harper et al., 2018). La base de codes-barres est relativement exhaustive pour toutes les espèces européennes.

3.2.2 Poissons

Comme les batraciens, les poissons se prêtent bien à la détection par l'ADNe, car ils libèrent de grandes quantités d'ADN dans l'eau et sont particulièrement bien représentés dans les bases de référence, mais aussi parce que les méthodes de surveillance traditionnelles (la pêche

électrique en particulier) sont très gourmandes en ressources et invasives, et ne peuvent pas être utilisées pour de grandes étendues d'eau. Par conséquent, l'ADNe est de plus en plus utilisé dans la surveillance biologique pour la détection et l'inventaire d'espèces, en tant qu'alternative à la pêche électrique et à d'autres méthodes traditionnelles invasives comme la pêche au filet maillant. L'ADNe des poissons est présent non seulement dans la colonne d'eau, mais aussi dans les sédiments, où il peut être conservé pendant de longues périodes (Turner et al., 2014). Plusieurs études relèvent que les espèces benthiques peuvent être détectées uniquement dans des échantillons prélevés à proximité de l'habitat concerné, tant pour les lacs que pour les rivières (Adrian-Kalchauer & Burkhardt-Holm, 2016 ; Hänfling et al., 2016). Dans les grandes rivières, l'ADNe des poissons peut être transporté en aval sur des centaines de kilomètres (Pont et al., 2018).

Les marqueurs génétiques 12S et 16S sont fréquemment utilisés pour le metabarcoding de l'ADNe des poissons, car des amorces spécifiques aux poissons sont disponibles (p. ex. les amorces 12S MiFish, cf. Miya et al., 2015), ce qui permet d'effectuer une amplification et un séquençage de l'ADN en limitant la proportion des séquences non ciblées. Malheureusement cependant, les régions des marqueurs 12S et 16S ne résolvent pas les événements de spéciation récents et ne peuvent donc pas être utilisées pour différencier des espèces dans certains groupes (p. ex. *Coregonus* sp.). Utilisée pour le barcoding ADN classique (sur la base d'échantillons de tissus), la région de code-barres COI aurait une meilleure résolution taxonomique (mais toujours incomplète), mais a été largement laissée de côté, car il n'existe pas d'ensemble d'amorces spécifique aux poissons. Si la base de référence des poissons européens (et suisses) est presque achevée pour le code-barres COI classique (Geiger et al., 2014 ; Knebelsberger et al., 2015), des lacunes persistent pour les bases de référence 12S et 16S pour les poissons, gènes utilisés pour le metabarcoding.

3.2.3 Mammifères

Bien que la surveillance des écosystèmes aquatiques ne fasse en principe pas des mammifères une priorité, on retrouve dans l'eau des traces des mammifères au style de vie semi-aquatique et de ceux vivant dans l'eau. L'ADN

des mammifères peut se retrouver dans les écosystèmes aquatiques en particulier par l'intermédiaire des excréments, mais aussi par contact direct (lorsque les mammifères traversent des écosystèmes aquatiques ou y boivent). Si des études ont montré qu'il est possible de détecter les mammifères de manière fiable via l'ADNe de l'eau des étangs dans les parcs naturels dans lesquels des mammifères de grande taille s'abreuvent, il est moins aisé de réussir une détection correcte et fiable dans les écosystèmes naturels (Harper et al., 2019b; Thomsen et al., 2012). L'ADNe peut être utile en particulier pour détecter de petits mammifères tel le campagnol terrestre (*Arvicola terrestris*), qui peut échapper aux pièges photographiques (Harper et al., 2019b; Sales et al., 2019). Ushio et ses collègues (2017) sont parvenus à détecter un large éventail d'espèces (p. ex. le cerf [*Cervus nippon*], la souris [*Mus musculus*], le campagnol [*Myodes rufocanus*], le raton laveur [*Procyon lotor*], le rat [*Rattus norvegicus*] et la musaraigne [*Sorex unguiculatus*]) dans l'ADNe issu d'échantillons d'eau prélevés dans une forêt japonaise.

Un test de détection d'ADNe spécifique existe pour la loutre européenne (*Lutra lutra*, Thomsen et al., 2012). Des amorces PCR sont disponibles pour le métabarcoding des espèces de mammifères via les marqueurs 12S et 16S (MiMammal, Ushio et al., 2017; 12S-V5, Kitano et al., 2007; Riaz et al., 2011). Elles ont été utilisées avec succès pour détecter de l'ADN de mammifère à partir d'échantillons d'eau (e.g., Ushio et al., 2017; Harper et al., 2019b) et de sédiments (Sales et al., 2019).

3.2.4 Insectes

Les insectes aquatiques sont régulièrement utilisés pour évaluer la qualité de l'eau dans les systèmes fluviaux. Il est donc intéressant de se servir de l'ADNe pour surveiller ces organismes. Les insectes aquatiques, et les arthropodes en général, couvrent un large spectre de cycles de vie et sont donc très diversifiés du point de vue taxonomique. Par conséquent, seule une sélection de groupes a été employée par le passé pour le suivi de la biodiversité (p. ex. des ordres spécifiques d'insectes). Pour les insectes aquatiques (comme pour d'autres organismes aquatiques), la source d'ADNe peut être très variée, ce dernier pouvant notamment venir des excréments, du mucus ou des gamètes. Des chercheurs ont montré, en particulier pour les systèmes lotiques, que cet ADNe peut être trans-

porté sur de longues distances (cf. notamment Deiner & Altermatt, 2014), ce qui peut compliquer les comparaisons avec des échantillons classiques souvent très localisés (obtenus par filets troubleaux). Les comparaisons avec des échantillons d'ADNe sont difficiles également du fait que les méthodes d'échantillonnage classiques présentent un degré relativement élevé d'incertitude. De nombreuses études ont employé de l'ADNe issu d'échantillons d'eau pour dresser des inventaires de communautés d'insectes aquatiques, mais les approches classiques et leurs équivalents moléculaires ne donnent pas toujours des résultats similaires (Fernández et al., 2018; Mächler et al., 2019). L'étude de l'ADNe semble être une méthode appropriée pour couvrir la diversité d'insectes présents dans des bassins versants de grande taille (p. ex. pour des estimations de la diversité gamma), mais se prête moins aux analyses très localisées (Deiner et al., 2016). Ainsi, les informations obtenues par les méthodes ADNe, d'une part, et classiques, d'autre part, peuvent se rapporter à des inférences spatiales différentes, qui ne sont pas directement comparables, mais plutôt complémentaires. Le principal avantage des études ADNe portant sur les insectes est de pouvoir échantillonner un éventail taxonomique bien plus large et d'inclure notamment des groupes tels que les diptères, qui sont difficiles à identifier sur le plan morphologique.

L'ADNe issu d'un échantillon d'eau n'est pas l'unique solution pour étudier les insectes : on peut également extraire de l'ADN à partir de spécimens récoltés dans un échantillon par filet troubleau et conservés sous forme d'échantillon mixte d'ADN de tissus. L'ADN issu d'un échantillon mixte produit des résultats plus cohérents par comparaison avec les méthodes traditionnelles d'évaluation de la qualité de l'eau (Elbrecht et al., 2017). Pour cette technique, on procède à un échantillonnage par filet troubleau conformément à la description du module pour les macro-invertébrés (OFEV, 2019a). Les échantillons sont préservés directement sur le site de prélèvement dans une solution d'éthanol de qualité pour la biologie moléculaire. Le traitement ultérieur des échantillons s'effectue soit en broyant les tissus, soit en extrayant l'ADN à partir de la solution d'éthanol (Martins et al., 2019; Zizka et al., 2019). Dans les deux cas, il est difficile de déduire l'abondance des espèces d'insectes à partir des données de métabarcoding ; la richesse des espèces a été proposée comme

solution de remplacement (Beentjes et al., 2018; Buchner et al. 2019). Bien que le prélèvement d'échantillons mixtes suivi d'une extraction d'ADN puisse produire des jeux de données plus facilement comparables à ceux obtenus par un échantillonnage classique, cette approche ne réduit pas la quantité de travail sur le terrain, ne supprime pas le caractère invasif de la méthode d'échantillonnage et peut reproduire certaines des limites qui grèvent les approches traditionnelles (Blackman et al., 2019).

La région de code-barres à recommander pour les insectes fait l'objet de vifs débats. Les amorces généralement utilisées sont basées sur les régions de code-barres 16S (Taberlet et al., 2018), 18S (Fernández et al., 2018) ou COI (p. ex. Leray et al., 2013; Geller et al., 2013; Elbrecht & Leese, 2017; Wangensteen et al., 2018). Il n'y a pour l'instant aucun consensus sur la région de code-barres spécifique à utiliser ni sur les amorces correspondantes. En principe, la région COI est favorisée, car elle est mieux représentée dans les bases de référence ADN, en particulier pour les échantillons mixtes. De nouvelles amorces spécifiques aux insectes sont en cours de développement.

3.2.5 Crustacés

La détection des décapodes (des écrevisses, Krieg et al. 2019a) suscite un intérêt particulier, car toutes les espèces indigènes sont menacées par diverses espèces envahissantes et par les pathogènes dont elles sont porteuses. Plusieurs études ADNe se servent du procédé qPCR pour détecter des espèces cibles d'écrevisses, mais les résultats sont controversés. Dans les lacs des États-Unis, la détection de l'ADNe d'*Orconectes rusticus* a montré des résultats congruents avec la méthode d'échantillonnage classique, mais il n'a pas été possible d'observer une corrélation satisfaisante avec l'abondance relative de l'espèce en question (Dougherty et al., 2016). D'autres études (p. ex. sur *Procambarus clarkia*, Tréguier et al., 2014) ont montré une faible concordance avec les approches établies, en particulier dans les cas où l'abondance des espèces était faible. Des tests existent pour l'écrevisse à pattes rouges (*Astacus astacus*, Agersnap et al., 2017; Krieg et al., 2019a) ainsi que deux espèces envahissantes, l'écrevisse signal (*Pacifastacus leniusculus*, Dunn et al., 2017; Mauvisseau et al., 2018; Krieg et al., 2019a) et l'écrevisse de Louisiane (*Procambarus clar-*

kii, Tréguier et al., 2014; Geerts et al., 2018; Mauvisseau et al., 2018; Riascos et al., 2018). Les variations saisonnières de l'activité des organismes semblent jouer un rôle important dans la détection de l'ADNe des écrevisses (Krieg et al., 2019a). Des tests spécifiques sont également disponibles pour d'autres espèces de crustacés, notamment des amphipodes et les *Daphnia* (Egan et al., 2013; Deiner & Altermatt, 2014; Mächler et al., 2014).

Les marqueurs spécifiques à certaines espèces sont développés majoritairement pour la région de code-barres COI. Les amorces de métabarcoding conçues et testées spécifiquement pour les crustacés ne sont pas publiées, mais l'ADNe des crustacés peut être détecté avec des amorces COI plus universelles (cf. p. ex. Deiner et al., 2016; Blackman et al., 2017; Fernández et al., 2019). Cependant, les résultats des quelques études réalisées avec de l'ADNe issu d'échantillons d'eau ciblant des crustacés ne sont pas concluants, ce qui pourrait signifier que les crustacés libèrent relativement peu d'ADN dans l'eau.

3.2.6 Mollusques

Contrairement aux crustacés, les mollusques sont plus souvent facilement détectables dans les échantillons d'ADNe prélevés dans l'eau et dans les sédiments. Il est probable qu'ils libèrent de grandes quantités d'ADN dans l'eau (p. ex. via leur mucus et par la filtration chez les moules). De nombreuses études ont montré la pertinence de l'ADNe pour détecter des espèces ciblées de mollusques, et cette approche est largement employée pour détecter les espèces envahissantes que sont la moule zébrée et la moule quagga (*Dreissena polymorpha* et *Dreissena bugensis*) aux États-Unis et en Europe (Mahon et al., 2011; De Ventura et al., 2017; Gingera et al., 2017; Williams et al., 2017). Des tests ADNe sont aussi disponibles pour des espèces envahissantes, par exemple *Potamopyrgus antipodarum* (Goldberg et al., 2013) et *Corbicula sp.* (Clusa et al., 2017; Cowart et al., 2018). Il en existe également pour d'autres espèces de mollusques menacées comme la moule renflée (*Unio tumidus*, Deiner & Altermatt, 2014) et la moule perlière d'eau douce (*Margaritifera margaritifera*, Stoeckle et al., 2016).

En principe, les amorces de métabarcoding spécifiques aux mollusques se basent sur le 16S (Klymus et al., 2017), mais des espèces de mollusques peuvent également être

détectées avec la région COI (Deiner et al., 2016 ; Fernández et al., 2018, 2019).

3.2.7 Oligochètes

On sait que les oligochètes aquatiques sont sensibles aux changements environnementaux. Ils constituent d'excellents indicateurs biologiques de la qualité écologique des sédiments et sont recommandés à ce titre. Cependant, les difficultés d'identification taxonomique de ces organismes sur la base de caractéristiques morphologiques entravent leur utilisation pour la surveillance biologique de routine. Des études récentes se sont intéressées à la possibilité d'analyser leur composition taxonomique en utilisant le métabarcoding d'échantillons mixtes ou de l'ADNe issu de sédiments. Les résultats montrent que l'indice de qualité des sédiments basé sur les oligochètes est comparable à celui fondé sur l'étude morphologique (cf. 8.4.2).

3.2.8 Diatomées

L'étude de communautés de diatomées benthiques via l'ADNe se trouve à un stade relativement avancé en Europe, son principal objectif étant d'évaluer la qualité des rivières et des ruisseaux (Kermarrec et al., 2014 ; Visco et al., 2015 ; Zimmerman et al., 2015 ; Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2017 ; Vasselon et al., 2017a ; Keck et al., 2018). La collecte d'échantillons s'effectue selon la procédure d'échantillonnage classique pour la surveillance des diatomées. Un sous-ensemble représentatif de galets suffisamment immergés sont récoltés. Le biofilm est ensuite retiré à l'aide d'une brosse à dents à usage unique, puis stocké dans une solution tampon. L'ADN des diatomées est ainsi échantillonné non pas à partir de l'eau (comme dans la plupart des exemples ci-avant), mais du biofilm recouvrant les galets, qui contient des diatomées vivantes. En Suisse, un indice national des diatomées est en cours de développement avec le soutien des campagnes NAWA (OFEV, 2013) et d'un projet européen (SYNAQUA ; cf. 8.4.1 ; Lefrançois et al., 2017).

Deux marqueurs différents sont utilisés pour évaluer les communautés de diatomées : la région V4 du gène nucléaire 18S et le gène chloroplastique *rbcL* (Visco et al., 2015 ; Vasselon et al., 2017a). La plupart des espèces européennes communes de diatomées sont référencées dans la base *rbcL* (Rimet et al., 2019).

3.2.9 Pathogènes et parasites

Un travail considérable a été consacré à la détection de parasites et de pathogènes des organismes aquatiques (des poissons, des batraciens et des écrevisses pour la plupart ; Krieg et al., 2019b). Toutefois, la détection de ces parasites et pathogènes avec les approches traditionnelles prend un temps considérable. Les approches ADNe sont perçues comme une précieuse alternative, d'autant plus que la majorité des parasites ont des propagules comme des spores pouvant être échantillonnées directement dans l'eau (Bass et al., 2015). Par exemple, la détection de l'hépatonéphrite parasitaire (PKD) s'effectuait jusqu'à présent en collectant et en disséquant des poissons pour suivre le parasite. L'ADNe pourrait permettre de localiser le pathogène de façon non invasive, sans récolter son hôte. De plus, cette méthode fournit des estimations quantitatives de l'occurrence des spores. Des tests spécifiques uniques ont été développés pour suivre des agents de la PKD (Carraro et al., 2018 ; Hutchins et al., 2018), de la saprolégniose d'eau douce (Rocchi et al., 2016), de la peste de l'écrevisse (Strand et al., 2014 ; Robinson et al., 2018) et de la chytridiomycose (Kirshtein et al., 2007 ; Hyman & Collins, 2012). En Suisse, ces quatre maladies ont un impact environnemental majeur et des tests spécifiques sont en cours d'examen (Krieg et al., 2019b). Pour les espèces de champignons et d'oomycètes, les marqueurs utilisés sont l'ITS et le 18S, tandis que le COI est utilisé pour le parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* (un agent de la PKD), qui est un cnidaire.

3.2.10 Plantes aquatiques (macrophytes et phytoplancton)

Les plantes sont également surveillées dans les écosystèmes aquatiques, les macrophytes étant suivis dans les systèmes lenti-ques et lotiques, et le phytoplancton dans les systèmes lenti-ques uniquement. Bien qu'il existe un intérêt général pour les deux groupes, relativement peu d'outils de surveillance standardisés sont disponibles, même pour les approches classiques (Känel et al., 2017). Certaines études ont conçu des amorces spécifiques pour des espèces envahissantes telles que *Myriophyllum aquaticum* (Scriven et al., 2015), *Elodea densa* (Fujiwara et al., 2016), *Elodea canadensis* et *Elodea nuttallii* (Gantz et al., 2018) ou encore *Hydrilla verticillata* (Matsushashi et al., 2016 ; Gantz et al., 2018).

Les macrophytes, et les plantes en général, ont besoin de plusieurs loci pour atteindre une résolution suffisante, à des niveaux taxonomiques tant élevés que faibles (Hollingsworth et al., 2011). Cependant, il est difficile, voire impossible d'utiliser plusieurs marqueurs dans un échantillon environnemental, car les différentes régions de marqueurs examinées ne peuvent plus être attribuées à des organismes uniques. Il existe toutefois des régions prometteuses en tant qu'amorces de métabarcoding pour les plantes comme *rbcL* et ITS2 (Fahner et al., 2016 ; Kuzmi-

na et al., 2018) ainsi que *trnL* (Taberlet et al., 2007), mais leur résolution au niveau de l'espèce pourrait être limitée. Par ailleurs, on peut raisonnablement envisager d'utiliser d'autres régions de code-barres telles que *matK* et *trnL* pour détecter des espèces spécifiques (cf. p.ex. Sriver et al., 2015 ; Matsushashi et al., 2016). Les analyses de communautés de phytoplancton employant l'ADNe sont très rares, mais le gène chloroplastique 23S semble approprié pour évaluer la diversité (Cannon et al., 2016 ; Craine et al., 2018).

Tableau 3
Exemples d'études ADNe publiées pour une sélection de groupes taxonomiques

Taxon	Espèce ou groupe cible	Application potentielle	Méthode	Références bibliographiques
Batraciens	Grenouille taureau (<i>Rana catesbeiana</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	PCR	Ficetola et al., 2008
	Triton crêté (<i>Triturus cristatus</i>)	Suivi d'espèces menacées	qPCR Métabarcoding	Rees et al., 2014b ; Biggs et al., 2015 ; Harper et al., 2017, 2018 ; Buxton et al., 2018
	Triton lobé (<i>Lissotriton vulgaris</i>)	Suivi d'espèces menacées	qPCR Métabarcoding	Smart et al., 2015 ; Charvoz, 2019
	Salamandre tachetée (<i>Salamandra salamandra</i>)	Suivi d'espèces menacées	qPCR	Preissler et al., 2018
		Recensement de la diversité globale	Métabarcoding	Valentini et al., 2016
Poissons	Gobie à taches noires (<i>Neogobius melanostomus</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	PCR qPCR	Adrian-Kalchauer & Burkhardt-Holm, 2016 ; Nevers et al., 2018
	Anguille d'Europe (<i>Anguilla anguilla</i>)	Suivi d'espèces menacées	qPCR	Seymour et al., 2018
	Carpe argentée (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	qPCR	Amberg et al., 2015 ; Erickson et al., 2017
	Loche d'étang (<i>Misgurnus fossilis</i>)	Suivi d'espèces menacées	qPCR	Sigsgaard et al., 2015
		Recensement de la diversité globale	Métabarcoding	Hänfling et al. 2016 ; Pont et al., 2018
Mammifères	Loutre européenne (<i>Lutra lutra</i>)	Suivi d'espèces menacées	qPCR	Thomsen et al., 2012
		Recensement de la diversité globale	Métabarcoding	Harper et al., 2019b ; Sales et al., 2019
Insectes aquatiques	Moustique-tigre et moustique japonais (<i>Aedes albopictus</i> , <i>Aedes japonicus japonicus</i>)	Détection de vecteurs de maladies	qPCR	Schneider et al., 2016
	Leucorrhine à gros thorax (<i>Leucorrhinia pectoralis</i>)	Suivi d'espèces menacées	qPCR	Thomsen et al., 2012

Taxon	Espèce ou groupe cible	Application potentielle	Méthode	Références bibliographiques
Insectes aquatiques	Ephémoptères, plécoptères et trichoptères	Recensement de la diversité globale	Métabarcoding	Hajibabaei et al., 2011 ; Mächler et al., 2019
	Chironomidés	Recensement de la diversité globale	Métabarcoding	Carew et al., 2013 ; Bista et al., 2017
		Recensement de la diversité globale	Métabarcoding	Deiner et al., 2016 ; Fernández et al., 2018 ; Macher et al., 2018
		Indice biotique	Métabarcoding	Elbrecht et al., 2017
Crustacés	Écrevisse à taches rouges (<i>Orconectes rusticus</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	qPCR	Dougherty et al., 2016
	Écrevisse signal (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	qPCR	Dunn et al., 2017 ; Mauvisseau et al., 2018
	Écrevisse de Louisiane (<i>Procambarus clarkii</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	qPCR	Tréguier et al., 2014 ; Riascos et al., 2018
	Écrevisse à pattes rouges (<i>Astacus astacus</i>)	Suivi d'espèces menacées	qPCR	Agersnap et al., 2017
Mollusques	Moule zébrée (<i>Dreissena polymorpha</i>) Moule quagga (<i>Dreissena bugensis</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	PCR qPCR	Egan et al., 2015 ; De Ventura et al., 2017
	Hydrobie des antipodes (<i>Potamopyrgus antipodarum</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	PCR qPCR	Clusa et al., 2016 ; Goldberg et al., 2013
	Corbicule asiatique (<i>Corbicula fluminea</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	PCR qPCR	Clusa et al., 2017 ; Cowart et al., 2018
	Anodonte chinois (<i>Sinanodonta woodiana</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	PCR	Clusa et al., 2017
		Recensement de la diversité globale	Métabarcoding	Klymus et al., 2017
Oligochètes		Recensement de la diversité globale	Métabarcoding	Weigand & Macher, 2018
	Espèces aquatiques	Indice biotique	Métabarcoding	Vivien et al., 2019
Diatomées	Espèces benthiques dans les rivières et les ruisseaux	Indice biotique	Métabarcoding	Visco et al., 2015 ; Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2017 ; Vasselon et al., 2017a
Pathogènes et parasites	<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>	Détection de l'agent de l'hépatonéphrite parasitaire	qPCR	Carraro et al., 2018 ; Hutchins et al., 2018
	<i>Saprolegnia parasitica</i>	Détection de l'agent de la saprolégniose d'eau douce	qPCR	Rocchi et al., 2016
	<i>Aphanomyces astaci</i>	Détection de l'agent de la peste de l'écrevisse	qPCR	Strand et al., 2014 ; Robinson et al., 2018
	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Détection de l'agent de la chytridiomycose	qPCR	Kirshtein et al., 2007 ; Hyman & Collins, 2012
Plantes aquatiques	Herbes aquatiques (<i>Elodea spp.</i>)	Détection d'espèces exotiques envahissantes	qPCR	Gantz et al., 2018
	Phytoplancton	Recensement de la diversité globale	Métabarcoding	Cannon et al., 2016 ; Craine et al., 2018

4 Échantillonnage pour les analyses ADNe

4.1 Types d'ADN environnemental utilisés comme sources d'analyse

Le choix de la méthode ADNe dépend du type d'écosystème et du groupe taxonomique analysé. Les échantillonnages et les protocoles sont différents selon les habitats et les taxons concernés (cf. tab. 4). De manière générale, il existe quatre types d'échantillons environnementaux desquels il est possible d'isoler de l'ADN pour la surveillance biologique aquatique :

- l'eau (cf. 4.1.1);
- les sédiments (cf. 4.1.2);
- le biofilm (cf. 4.1.3);
- les échantillons mixtes (cf. 4.1.4).

Tableau 4

Évaluation des sources d'ADN(e) en fonction du groupe taxonomique

Le degré de préférence associé à chacune des sources de détection est indiqué par le système de signes suivant : +++ source préférée, ++ bonne source, + source moyenne, et – source pas idéale. Il faut noter ici que les progrès à venir des méthodes pourraient modifier cette interprétation. Il convient donc de suivre les nouvelles publications sur le sujet.

Taxon	Eau	Sédiments	Biofilm	Global
Batraciens	+++	+	-	-
Poissons	+++	+	-	-
Mammifères	+++	+	-	-
Insectes aquatiques	++	++	-	+++
Crustacés	+	+	-	+++
Mollusques	+++	+++	-	++
Oligochètes	+	++	-	+++
Diatomées	+	+	+++	-
Pathogènes et parasites	+++	+	-	-
Macrophytes et phytoplancton	+++	+	-	-

Seuls les meilleurs taxons servant d'indicateurs biologiques sont présentés ici. L'annexe contient des protocoles détaillés et des exemples de bonnes pratiques pour certains taxons. Il convient cependant de mentionner que l'ADNe peut également être utilisé pour analyser un plus large éventail de méiofaune, de zooplancton, de champignons et de divers micro-organismes. Par exemple, l'ADNe pourrait être utilisé pour évaluer la diversité et la composition de protistes, comme les ciliés, ou les rotifères, qui pourraient représenter de très bons indicateurs de l'état environnemental d'un système et qui n'ont pas ou peu été employés pour la surveillance biologique traditionnelle en raison du manque d'expertise et de méthodes. Certains de ces groupes ou de ces organismes pourraient nécessiter des protocoles spécifiques qui ne sont pas présentés ici, mais les principes généraux devraient rester largement inchangés.

4.1.1 ADNe dans l'eau

Il existe deux techniques courantes pour récolter de l'ADNe à partir d'échantillons d'eau :

- la filtration ;
- la précipitation.

La filtration est souvent préférée à la précipitation, car elle permet d'utiliser de plus grandes quantités d'eau. Cependant, dans certaines situations, la précipitation est la technique la plus appropriée.

Filtration

La filtration collecte l'ADN sur la matrice de filtrage, principalement de l'ADN encore contenu par des cellules ou des organelles, ou lié à des particules. Plusieurs méthodes de filtration ont été proposées à ce jour, mais aucune n'a été élevée au rang de solution unique optimale. La différence entre ces méthodes repose sur le matériel et la technique utilisés. Les questions principales à se poser pour préparer une filtration sont présentées dans les paragraphes qui suivent.

Figure 5**Trois types de filtration pour récolter de l'ADN dans l'eau**

Une capsule filtrante fixée directement sur la seringue (à gauche), une pompe péristaltique (au centre) et une pompe à vide manuelle (à droite).



Photo au milieu : Eawag, Peter Penicka

- Quel équipement de filtration utiliser ?

Il existe plusieurs techniques de filtration, notamment la filtration manuelle, la filtration par pompe péristaltique et la filtration par pompe à vide (fig. 5). La filtration manuelle nécessite très peu de matériel (une seringue et un filtre) et peut donc être réalisée facilement sur des sites d'échantillonnage éloignés également. La procédure de filtration la plus simple consiste à utiliser des seringues jetables (en général de 50 ou 100 ml) et des filtres correspondants. Cependant, selon la taille des pores et des particules en suspension dans l'eau prélevée, cela nécessite une certaine force physique. Il est possible d'employer des pistolets à silicone. Par ailleurs, une pompe péristaltique est souvent utilisée comme alternative lorsque de grands volumes d'eau sont filtrés (plusieurs litres). Cette approche requiert certes moins de force physique, mais la pompe est en principe alimentée par une batterie de voiture, difficile à transporter sur les sites éloignés. Tous les tubes de la pompe péristaltique doivent être remplacés à chaque nouveau site de prélèvement afin de réduire les contaminations croisées. Enfin, des pompes à vide peuvent servir à filtrer des volumes faibles à élevés. Bien qu'efficaces, elles nécessitent un équipement plus complexe, et les tubes et les cartouches filtrantes doivent être

remplacés entre chaque site d'échantillonnage. Les pompes à vide peuvent fonctionner tant en laboratoire que sur le terrain.

- Quelle est la taille de pores de filtre la plus appropriée ?
- Est-il recommandé d'utiliser des filtres encapsulés ou plutôt des filtres ouverts ?

Les filtres les plus utilisés sont les filtres à membrane, et les produits spécifiques utilisés reflètent les types disponibles dans le commerce. Des filtres spécifiques pour l'ADNe sont en cours de développement. La taille de pores d'un filtre peut déterminer quel type d'ADNe il est possible de récolter. Les études ADNe emploient le plus souvent des tailles de pores entre 0,22 et 0,7 μm . Des pores de petite taille (p. ex. 0,22 μm) permettent de capturer la plupart des cellules et des organelles. Cette approche est celle généralement privilégiée pour la détection de l'ADN de micro-organismes. Il s'agit là cependant d'un compromis, car utiliser des pores de petite taille signifie que le volume d'eau qu'on pourra filtrer avant que le filtre ne s'encrasse sera moindre. Cet inconvénient se résout en partie en utilisant des filtres de plus grand diamètre. Des problèmes de contamination se produisent lorsque des filtres arrivent ouverts et doivent être placés dans un boî-

tier ou dans une installation spécifique d'un système de filtration. Actuellement, on préfère utiliser des filtres encapsulés comme les Sterivex® ou des produits similaires, car ils sont faciles à manipuler et limitent le risque de contamination.

- La filtration doit-elle s'effectuer sur le terrain ou en laboratoire ?

En général, la filtration peut être réalisée soit sur le terrain, soit en laboratoire. Il est préférable de procéder à la filtration directement sur le terrain, car le risque de contamination est moindre et le transport des échantillons s'en voit facilité (refroidissement en dessous de 5°C pendant quelques heures ou stockage dans un tampon de lyse Longmire). La filtration en laboratoire permet de filtrer de grandes quantités (en particulier dans le cas des techniques de filtration nécessitant des pompes électriques), mais peut s'effectuer uniquement si les échantillons rejoignent le laboratoire en peu de temps (quelques heures au plus) pour prévenir toute décomposition de l'ADNe macrobien et tout changement dans les communautés microbiennes. La filtration en laboratoire suppose par ailleurs un degré accru de précaution, car les échantillons sont manipulés à un seul endroit, ce qui nécessite des actions supplémentaires pour limiter le plus possible la contamination croisée.

- Quelle quantité d'eau échantillonner pour la filtration ?

En principe, plus la quantité d'eau échantillonnée est élevée, plus les chances de détecter une espèce sont grandes. Il faut tenir compte de deux remarques cependant : d'une part, la quantité d'inhibiteurs de PCR potentiels augmente proportionnellement à la quantité d'eau filtrée et, d'autre part, la filtration d'importantes quantités d'eau représente un défi logistique. C'est pourquoi il convient de faire preuve de pragmatisme en décidant du volume à filtrer et considérer pour ce faire le type d'environnement concerné.

Dans le cas des ruisseaux, la meilleure solution est de prélever l'eau sur plusieurs sites depuis la rive. Jusqu'à présent, la plupart des études ayant filtré de l'ADNe provenant de ruisseaux ont récolté entre 0,5 et 2 l d'eau, ce qui est souvent suffisant pour retrouver une bonne partie

de la diversité. Pour les rivières et les lacs, en particulier lorsqu'il s'agissait de détecter des espèces rares, la majorité des études ont filtré entre 1 et 100 l par site. Cependant, les seringues ne suffisent pas pour prélever une quantité si importante, si bien que l'opération nécessite des pompes péristaltiques. Comme la diversité des habitats tempérés est moindre, la pratique actuelle consistant à filtrer environ 2 l provenant de divers sous-échantillons sur un site spécifique paraît réaliste.

Précipitation

Si la filtration est généralement préférée à la précipitation, car elle permet de traiter des volumes plus importants et ne nécessite pas de manipuler des produits chimiques sur le terrain, la précipitation est parfois privilégiée. En effet, toutes les techniques de filtration sont influencées par les particules en suspension, tandis que la précipitation se voit moins touchée, ce qui fait d'elle une technique plus avantageuse dans certains cas. Les particules en suspension n'interfèrent pas avec l'extraction. Pour la précipitation, le principe consiste à utiliser un mélange de sels et d'éthanol pour précipiter l'ADN/l'ARN présent dans l'eau. Ce mélange est ensuite centrifugé pour récolter un culot d'ADN. Comme la plupart des centrifugeuses sont conçues pour de petits tubes, la précipitation est souvent limitée à un volume total de 50 ml. Il est possible de contourner cette limite en récoltant plusieurs échantillons, ce qui ne garantit toutefois pas de pouvoir collecter des quantités plus importantes et, à l'exception du cas des étangs, cette méthode n'est pas celle retenue actuellement.

La précipitation est couramment utilisée pour détecter des batraciens dans les étangs. Biggs et al. (2015) ont montré qu'il faut prélever 20 sous-échantillons de 30 ml pour s'approcher d'un taux de détection avoisinant les 100 % pour le triton crêté dans les étangs. L'organisme de réglementation *Natural England* recommande aux personnes récoltant de l'ADNe pour le triton crêté de prélever 20 sous-échantillons de 30 ml et de les mélanger, puis de prélever à partir de ce mélange 6 sous-échantillons de 15 ml. Cette recommandation s'applique aux étangs d'une surface de 1 ha environ. En Suisse, le métabarcoding environnemental de batraciens utilisant de l'ADNe précipité est proposé comme service (cf. Holderegger et al., 2019). Le nombre d'échantillons

recommandé augmente proportionnellement à la taille de l'étang : 3 à 5 échantillons de 50 ml pour les étangs d'une surface inférieure à 50 m², de 6 à 10 pour ceux d'une surface de 50 à 500 m² et de 10 à 20 lorsque la surface dépasse les 500 m². Tous les échantillons sont mélangés entre eux, puis trois nouveaux sous-échantillons de 15 ml sont prélevés de ce mélange pour l'étape de précipitation. Cependant, d'autres auteurs proposent de prélever moins d'échantillons tout en augmentant le volume de ceux-ci (cf. Hänfling et al. 2016).

4.1.2 ADNe dans les sédiments

Des particules organiques et inorganiques complexes présentes dans les sédiments peuvent se lier à l'ADN et le stabiliser. Il s'ensuit que la durée de conservation de l'ADN est plus longue pour les sédiments que pour l'eau. Ainsi, il est possible de remonter le temps en échantillonnant une carotte de sédiments, qui a archivé de l'ADN pendant des siècles, voire des millénaires (Monchamp et al., 2018).

L'échantillonnage de sédiments est effectué de préférence dans des lacs profonds, où les sédiments peuvent se déposer et ne sont pas constamment brassés. Cependant, l'ADNe issu de sédiments peut aussi représenter une source importante d'informations concernant la composition taxonomique de la méiofaune (nématodes, oligochètes) et des protistes (p. ex. des ciliés) utilisés comme indicateurs biologiques de l'enrichissement organique et d'autres impacts environnementaux dans les grandes rivières et les lacs.

Le matériel d'échantillonnage utilisé pour récolter l'ADNe issu de sédiments dépend de la profondeur et de l'accessibilité des sites d'échantillonnage (fig. 6). L'échantillonnage de sédiments dans des lacs profonds est en principe réalisé à l'aide de matériel lourd comme des bennes à mâchoires et des carottiers. Les échantillons de sédiments côtiers peuvent être prélevés à l'aide de cuillères (à usage unique) ou par carottage à l'aide d'une seringue dont l'extrémité a été coupée au préalable. Cette dernière méthode permet de prélever des échantillons de couches de sédiments de tailles précises.

Figure 6

Une seringue à usage unique dont l'extrémité a été coupée au préalable peut être utilisée pour prélever des carottes sur les sites proches des rives.



La quantité de sédiments échantillonnée dépend de la méthode d'extraction. Les kits commerciaux conviennent pour 5 à 10 g de sédiments au maximum. La plupart des kits pour les sédiments/les sols sont conçus pour les micro-organismes et peuvent traiter des échantillons d'une taille maximale de 0,2 à 0,5 g. Le traitement d'échantillons de sédiments est par ailleurs restreint par la taille des tubes de centrifugation. Il est possible de conserver les échantillons de sédiments dans de l'éthanol avant de procéder à l'extraction d'ADN, une approche couramment employée dans les analyses microbiennes (Lanzén et al., 2017). Cependant, la méthode la plus simple consiste à stocker les échantillons de sédiments à - 20° C.

4.1.3 ADNe présent dans le biofilm

Le biofilm épilithique se forme à la surface des galets et comprend des bactéries et des algues unicellulaires. Ce type de biofilm est en contact direct avec l'eau. La communauté composant le biofilm réagit ainsi directement aux changements de qualité de l'eau. De plus, par com-

paraison avec les sédiments, seule une faible proportion des organismes morts restent en place et la plupart d'entre eux sont emportés par le courant de l'eau. Actuellement, les échantillons de biofilm sont utilisés uniquement pour cibler les diatomées vivantes dans les eaux courantes dans la perspective de déduire un indice de qualité biologique. La méthodologie d'échantillonnage de biofilm pour les diatomées est présentée en détail dans le module diatomées pour la bio-indication des cours d'eau (Hürlimann & Niederhauser, 2007) et résumée dans l'exemple de cas relatif aux diatomées du présent document (cf. 8.4.1). Utilisée et acceptée dans des pays européens également, cette méthode est bien standardisée.

4.1.4 ADN de macro-invertébrés dans les échantillons mixtes

Le prélèvement d'échantillons mixtes consiste à récolter des spécimens en utilisant une procédure d'échantillonnage classique (p. ex. par filet troubleau pour les macro-invertébrés selon le système modulaire gradué pertinent, cf. Stucki, 2010 ; OFEV, 2019a), puis en réalisant une extraction d'ADN sur les spécimens homogénéisés ou sur l'éthanol de qualité pour la biologie moléculaire utilisé pour conserver les échantillons. Cette approche a été utilisée surtout pour les macro-invertébrés, en particulier les insectes aquatiques. L'étude de l'ADN d'échantillons mixtes est avantageuse du fait de sa couverture spatiale relativement exacte et de sa faible interférence avec des propriétés chimiques ou physiques de l'environnement échantillonné. L'inconvénient est que la procédure d'échantillonnage (récolter et trier en amont les invertébrés) ne peut pas être automatisée, demande beaucoup de temps et présente les mêmes limites de spécificité et de reproductibilité que l'échantillonnage classique (Blackman et al., 2019).

Sur un échantillon mixte, l'ADN peut être obtenu soit par extraction directe à partir des tissus des spécimens, soit par extraction à partir de la solution de conservation (éthanol) contenant l'échantillon. L'extraction à partir des tissus implique de séparer les individus des débris, une tâche qui peut être chronophage et engendrer des erreurs si des spécimens de petite taille ou au stade larvaire sont laissés de côté. Les tissus des individus doivent ensuite être séchés, puis homogénéisés. L'extraction d'ADN peut ensuite être réalisée à partir du mélange de tissus.

Il est plus simple d'extraire l'ADN à partir de la solution de conservation. Les spécimens conservés dans l'éthanol libèrent leur ADN dans cette solution alcoolique. Cet ADN peut être capturé par filtration ou par précipitation. Cette possibilité relativement nouvelle est très prometteuse, mais peu de résultats de recherche sont disponibles en la matière pour l'instant (Zizka et al., 2019). Jusqu'à présent, la plupart des études ont utilisé, pour conserver les échantillons pendant quelques semaines avant la filtration, de l'éthanol de qualité pour la biologie moléculaire avec une concentration finale de 80 % ou plus. Il faut éviter tout stockage dans le formaldéhyde ou dans des colorants tel que le rose Bengale, qui influencent et entravent l'emploi courant de cette méthode, bien qu'une fixation rapide dans le formol avant le tri des spécimens ait été possible dans le cas des oligochètes (Vivien et al., 2016). L'utilisation de solutions de conservation comme sources d'ADN pour les analyses de métabarcoding présente les principaux avantages suivants : la conservation d'individus entiers pour des analyses morphologiques ultérieures, d'une part, et le fait que l'étape de tri préliminaire peut être omise, d'autre part.

4.2 Précautions pour la manipulation d'échantillons d'ADNe

Les méthodes de détection d'ADNe en laboratoire sont optimisées pour déceler de petites traces d'ADN et sont donc extrêmement sensibles à la contamination. Les praticiens doivent être conscients de ce risque et prendre plusieurs mesures de prévention sur les différents sites d'échantillonnage pour réduire autant que possible la probabilité de contamination des échantillons (fig. 7).

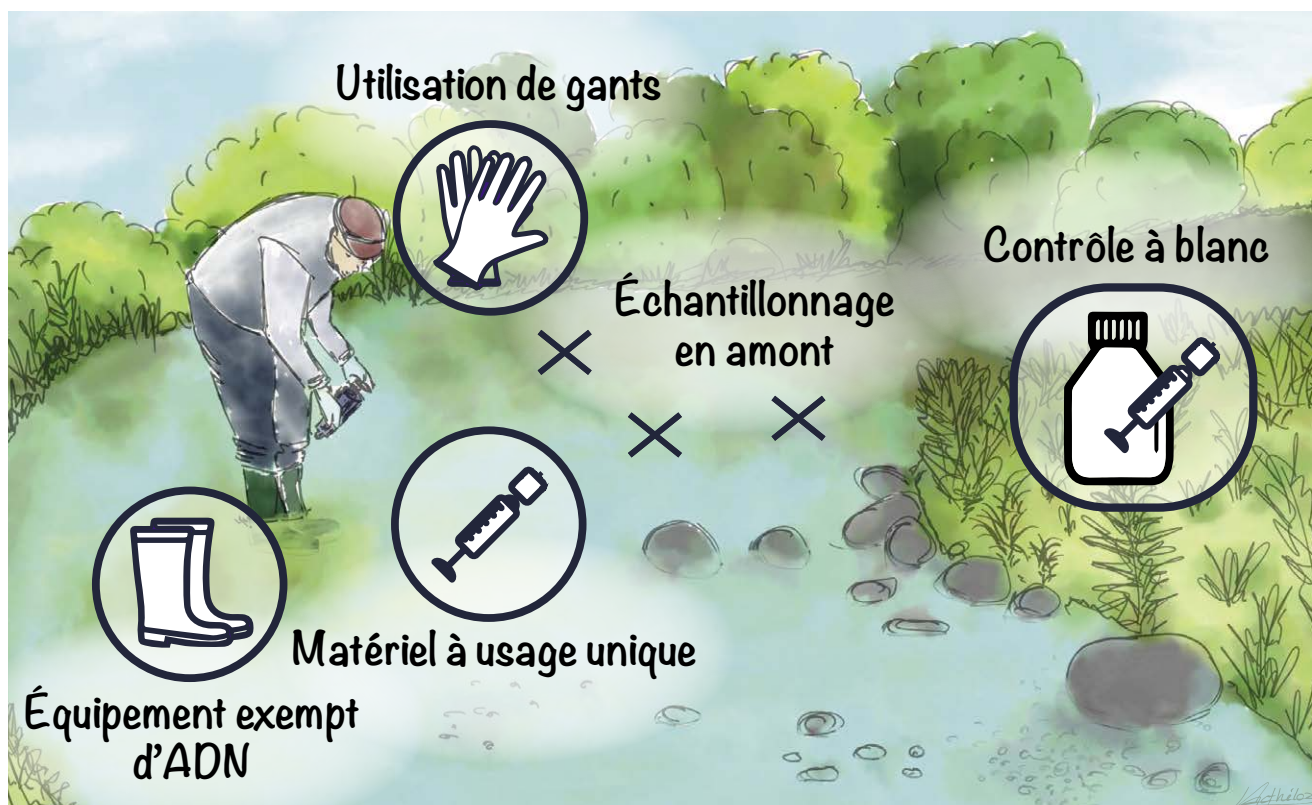
Matériel

De manière générale, tout l'équipement et tout le matériel qui entrent en contact avec l'échantillon d'ADNe doivent être à usage unique ou nettoyés de façon à être dépourvu d'ADN. Les bonnes pratiques préconisent de porter des gants à usage unique pendant l'échantillonnage, afin non seulement de prévenir toute contamination par de l'ADN humain (qui peut potentiellement influencer et dominer le résultat du séquençage), mais également de réduire la contamination croisée entre les sites de prélèvement.

Figure 7

Mesures permettant d'éviter la contamination durant l'échantillonnage

Tous les équipements doivent être exempts d'ADN, les gants et le matériel doivent être à usage unique et un contrôle à blanc doit être effectué pour détecter des contaminations potentielles.



Il est recommandé d'utiliser du matériel scellé à usage unique (comme des seringues ou des cuillères) et de l'ouvrir uniquement sur le site d'échantillonnage. Cependant, il peut être trop coûteux d'utiliser certains outils une seule fois. Ceux-ci sont le cas échéant réutilisés sur différents sites, mais doivent être nettoyés entre chaque site. La meilleure solution de nettoyage est l'hypochlorite de sodium (eau de Javel, solution de 5 à 10 %). Cependant, il faut éviter d'utiliser de grandes quantités d'hypochlorite de sodium sur le terrain. Les produits commerciaux (p. ex. « DNA away » ou « DNA-ExitusPlus ») représentent des solutions de décontamination sûres utilisables sur le terrain, mais leur prix est élevé. Rincer avec de l'éthanol ou de l'eau (même de l'eau déionisée) ne suffit pas à décontaminer : cette façon de procéder peut certes réduire les contaminations croisées par des effets de dilution, mais ne détruit en rien l'ADN. Il est toutefois recommandé de rincer l'équipement avec de l'eau bidistillée

après nettoyage et avant toute récolte d'échantillons d'ADNe afin d'éliminer d'éventuelles traces d'hypochlorite de sodium ou de détergent.

Contrôles

Les faux positifs et les faux négatifs constituent le souci principal des études ADNe. On entend par faux positif la détection d'un signal ADNe en l'absence de l'organisme concerné et/ou de son ADN dans l'environnement, et par faux négatif la non-détection d'un signal ADNe en présence de l'organisme et/ou de son ADN dans l'environnement. Des faux positifs peuvent être causés par des contaminations lors des étapes d'échantillonnage, d'extraction et de séquençage. De faux négatifs peuvent survenir en raison de problèmes aux étapes d'extraction, de PCR ou de séquençage ou d'effets de sous-échantillonnage. Afin d'exclure les faux positifs et les faux négatifs, ou du moins de connaître leur occurrence, il est essentiel

dans toutes les études ADNe d'effectuer des contrôles et des échantillonnages répétés.

Les contrôles permettent d'identifier les contaminations et devraient être intégrés à toutes les étapes d'échantillonnage et d'analyse. Ils sont nécessaires en particulier lorsque l'équipement qui entre en contact étroit avec l'échantillon (p. ex. les boîtiers des filtres ou les tubes en silicone) est réutilisé. Lors d'un échantillonnage d'ADNe issu de l'eau, une pratique bien établie consiste à utiliser un contrôle à blanc composé d'eau exempte d'ADN, par exemple de l'eau ultrapure traitée par rayons UV. Malheureusement, les équipements UV performants sont rarement disponibles hors des laboratoires de recherche. De l'eau minérale ou déionisée disponible dans le commerce pourra donc être utilisée comme contrôle négatif simplifié. Des contrôles doivent être réalisés au minimum au début et à la fin de chaque campagne d'échantillonnage d'ADNe, ce qui suppose donc par exemple de filtrer de l'eau exempte d'ADN (sur le site d'échantillonnage) au début et à la fin de chaque jour d'échantillonnage. Les contrôles négatifs seront au moins récoltés à la première étape et traités avec les échantillons de terrain durant l'ensemble du processus. Il est important que les contrôles soient prélevés selon le même protocole que celui s'appliquant aux véritables échantillons, à la différence près que, dans le cas d'un contrôle, l'eau filtrée (ou précipitée) est de l'eau exempte d'ADN plutôt qu'un échantillon d'eau issu de l'environnement. Le contrôle négatif doit ensuite être traité en suivant la même procédure que celle utilisée pour tous les autres échantillons. Aucun contrôle n'est en général utilisé pour les sédiments et le biofilm.

Plan d'échantillonnage

Le travail de terrain implique une planification préalable, en particulier si l'on visite plusieurs sites simultanément. Dans l'idéal, il ne faut pas aller dans l'eau au cours de l'échantillonnage. Dans les cas où cela est impossible cependant, il existe deux options : soit nettoyer tout le matériel (pantalons-bottes, etc.) qui entre en contact avec l'environnement échantillonné en suivant la démarche expliquée ci-avant, soit en réalisant l'échantillonnage en veillant à réduire le plus possible les contaminations. Dans les rivières par exemple, il faut récolter les échantillons en partant du point le plus en aval du bassin versant et en se déplaçant vers l'amont afin d'éviter de

collecter de l'ADN perturbé par les prélèvements. De même, les échantillons doivent être prélevés en amont de la personne se trouvant dans ou près de l'eau afin que l'eau échantillonnée n'ait pas été en contact avec la personne ni avec l'équipement.

4.3 Autres problèmes techniques liés à l'échantillonnage ADNe

- Combien d'échantillons répétitifs d'ADNe prélever ?

On utilise en général plusieurs échantillons répétitifs, aussi appelés répliqués, pour garantir la fiabilité des données ADNe. Par exemple, lorsqu'une espèce est détectée dans plusieurs répétitions, il est plus probable que celle-ci soit réellement présente dans l'environnement et ne constitue pas un faux positif. Pour être valable sur le plan statistique, une campagne d'échantillonnage doit donc inclure plusieurs répétitions par site d'échantillonnage. Les études ADNe ont montré qu'un certain niveau de répétition est nécessaire pour une interprétation adéquate (p. ex. Mächler et al., 2019). Effectuer des répétitions se traduit cependant par des coûts temporels et monétaires qui doivent être mis en balance avec les bénéfices. Les études utilisent souvent trois répétitions par site au minimum. Pour les sites où la distribution de l'ADNe est très irrégulière tels que les étangs ou les étendues d'eau de très grande taille (lacs notamment), il faut prévoir davantage de sous-échantillons et de répétitions. Le nombre de répétitions peut également dépendre de l'objectif de l'étude (inventaire d'une communauté versus détection d'espèces rares). La répétition au niveau de l'échantillon peut être réalisée de deux façons : les sous-échantillons sont soit regroupés avant l'extraction d'ADN (solution en général plus économique, mais moins recommandée), soit analysés de manière indépendante (dans un ordre aléatoire). Cette dernière solution est celle recommandée pour permettre une estimation des seuils de détection au niveau des échantillons.

- Quel est le meilleur moyen de transporter et de stocker des échantillons d'ADNe ?

S'il n'est pas stocké correctement, l'ADNe peut se décomposer relativement rapidement dans les échantillons

d'eau ou sur les filtres du fait de l'activité microbienne. Selon les bonnes pratiques, il convient donc de procéder à l'extraction directement après échantillonnage. Cette approche est parfois impossible à mettre en œuvre cependant, les échantillons devant être transportés et souvent stockés sur une longue durée. Il faut transporter les échantillons dans des glacières jusqu'au lieu de stockage. Par ailleurs, les échantillons d'ADNe ne doivent pas être exposés à des températures élevées (p. ex. aux températures régnant dans les voitures en été). La meilleure option pour les filtres, pour l'eau précipitée, pour les sédiments et même pour l'eau est la congélation à -20°C . Il est nécessaire de maintenir la température à un niveau constant et d'éviter impérativement les décongélations et recongélations. Si l'échantillon est transféré directement dans une solution de conservation ou un tampon (p. ex. dans le cas de biofilms ou d'échantillons mixtes), il peut être transporté et stocké à 5°C , voire (au maximum) à température ambiante sur une longue durée étant donné que le tampon/les conservateurs stabilisent l'ADN. Il est cependant toujours recommandé de stocker de tels échantillons au moins dans un réfrigérateur ou d'abaisser la température de la pièce dans laquelle ils se trouvent pour ralentir la décomposition de l'ADN. Les filtres peuvent également être séchés à l'aide de billes de silice et d'un dessiccateur, mais cette méthode n'a pas encore été testée comme il se doit.

- Quand et où prélever des échantillons ?

Les microhabitats échantillonnés devraient être choisis pour maximiser la probabilité d'occurrence des espèces. Par exemple, il y a lieu d'échantillonner l'ADNe au fond plutôt qu'à la surface pour augmenter la détectabilité des espèces benthiques (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm, 2016). Il faut éviter de procéder à un échantillonnage en période d'hibernation ou d'inactivité (pour l'hibernation, cf. De Souza et al., 2016).

5 Laboratoire moléculaire

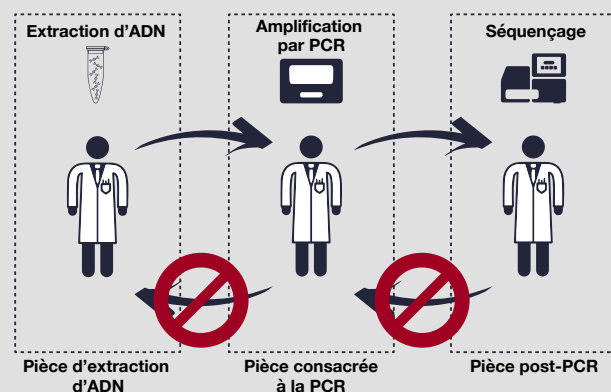
Les échantillons d'ADNe contiennent des quantités faibles, voire très faibles d'ADN. Pour éviter les erreurs de résultats dues aux contaminations, toutes les tâches effectuées en laboratoire doivent suivre des protocoles et des pratiques stricts. Le présent chapitre décrit le flux des travaux et les différentes étapes en laboratoire. Les tâches doivent être réalisées dans un laboratoire prévu spécifiquement pour traiter de l'ADNe (fig. 9). Des contrôles négatifs et positifs doivent par ailleurs être effectués. Les pratiques recommandées impliquent notamment de séparer les étapes en amont et en aval de la PCR (l'extraction d'ADNe et la PCR doivent être réalisées dans des pièces séparées et se fonder sur un flux des travaux unidirectionnel) ainsi que d'utiliser des vêtements de protection et des équipements adéquats (table de travail stérile). L'infrastructure et l'équipement de laboratoire doivent être exclusivement dédiés aux différentes étapes de travail et nécessitent une procédure de nettoyage prédéfinie. Dans l'idéal, la pression de l'air sera plus élevée dans le laboratoire propre dédié à l'extraction de l'ADNe afin de réduire les contaminations.

Précautions importantes à prendre pour le travail en laboratoire

Figure 8

Toutes les étapes en laboratoire doivent suivre un flux des travaux unidirectionnel

L'extraction d'ADN doit être effectuée dans un endroit séparé physiquement de ceux où se déroulent toutes les étapes en aval. Ni le matériel ni les personnes le manipulant ne peuvent évoluer dans la direction opposée



Pièce spécifique post-PCR

Comme la concentration d'ADN cible dans un échantillon peut être très faible (en particulier dans les échantillons d'eau), il est très important de faire preuve de vigilance pour éviter toute contamination. Pour travailler avec de l'ADNe, les professionnels doivent prendre des précautions particulières en plus de suivre les bonnes pratiques habituelles (comme travailler consciencieusement ou porter une blouse de laboratoire). Le plus important est de séparer physiquement toutes les tâches et tous les équipements en amont de la PCR de ceux en aval de celle-ci. L'extraction d'ADN et la préparation de la PCR doivent avoir lieu dans des pièces distinctes de celles utilisées pour le processus subséquent à la PCR. Les machines PCR doivent être placées soit dans la pièce en aval de la PCR soit dans une autre pièce spécifique.

Flux des travaux unidirectionnel

Il faut adopter un flux des travaux unidirectionnel, et partir des concentrations faibles pour terminer avec les concentrations élevées d'ADN afin de réduire les contaminations avec l'ADN amplifié issu des tests précédents (fig. 9). Cette règle s'applique tant aux personnes qu'au matériel. Par conséquent, les collaborateurs du laboratoire doivent impérativement éviter de se déplacer, au cours d'une journée de travail, d'une pièce à haute concentration d'ADN vers une pièce à faible concentration d'ADN. Ils ne doivent pas, au cours de la même journée, aller travailler dans la pièce d'extraction après avoir travaillé sur un processus en aval de la PCR ni amener des produits PCR aux laboratoires en amont de la PCR (même s'il s'agit de contrôles positifs PCR). Dans l'idéal, on utilisera deux pièces en amont de la PCR, la répartition se faisant selon la concentration d'ADN (élevée ou faible, p. ex. séparer les extractions sur des échantillons mixtes de celles réalisées à partir d'échantillons d'eau et de sédiments).

Matériel à usage unique

Tous les consommables utilisés au cours des différentes étapes doivent être réservés à une application particulière. Les micropipettes constituent l'une des plus importantes sources de contamination. Il est donc essentiel de disposer d'au moins un jeu de pipettes pour chaque pièce (extraction d'ADN «concentration faible», extraction d'ADN «concentration élevée», préparation PCR, pipette spécifique pour ajouter l'ADN aux réactions PCR) et d'utiliser des pointes à filtres à toutes les étapes du processus. La même règle s'applique à tout l'équipement, qui doit être spécifique à chaque application (p.ex. centrifugeuse, supports pour tubes et réfrigérateur). Il faut effectuer des contrôles négatifs en particulier en amont et au cours de l'étape PCR pour garantir l'adéquation du matériel et de la manipulation. Il est important que tout le matériel ainsi que tous les équipements et tous les postes de travail soient décontaminés après chaque session de travail au laboratoire à l'aide de lumière UV ou d'hypochlorite de sodium.

Figure 9

Laboratoire propre utilisé pour l'extraction d'ADNe

Le laboratoire propre (image de gauche) doit être séparé physiquement des pièces dans lesquelles les produits obtenus en aval de la PCR sont manipulés. Il doit présenter une pression de l'air positive, ses murs et ses meubles doivent être nettoyés régulièrement, et l'accès doit être restreint au personnel formé. Les professionnels effectuent le travail en laboratoire (image de droite) en portant des vêtements de protection et dans des conditions stériles afin de prévenir toute contamination des échantillons.



Photos: Eawag, Roman Altherr

5.1 Flux général des travaux

Une étude ADNe standard comprend plusieurs étapes au cours desquelles sont traités des échantillons environnementaux (eau, sédiments, biofilm) ou des échantillons mixtes pour acquérir des informations génétiques sur des organismes présents dans ces échantillons ou sur leurs traces d'ADN.

Le traitement des échantillons d'ADNe peut s'articuler en trois étapes, comme présenté ci-après.

1. **Extraction de l'ADN**: les molécules d'ADN (ADN extracellulaire et ADN d'organismes vivants, de leurs cellules et de leurs organelles) sont isolées des échantillons environnementaux.
2. **Amplification en chaîne par polymérase (PCR)**: plusieurs copies d'une région génomique cible sont produites au cours d'une série de réactions enzymatiques.
3. **Séquençage à haut débit (HTS)**: les produits amplifiés par PCR sont utilisés pour le séquençage multiparallélisé d'ADN, qui produit des millions de séquences (cette étape concerne le métabarcoding uniquement).

Le choix des méthodes de traitement d'ADNe dépend du but de l'étude écologique ou de l'évaluation biologique (fig. 10).

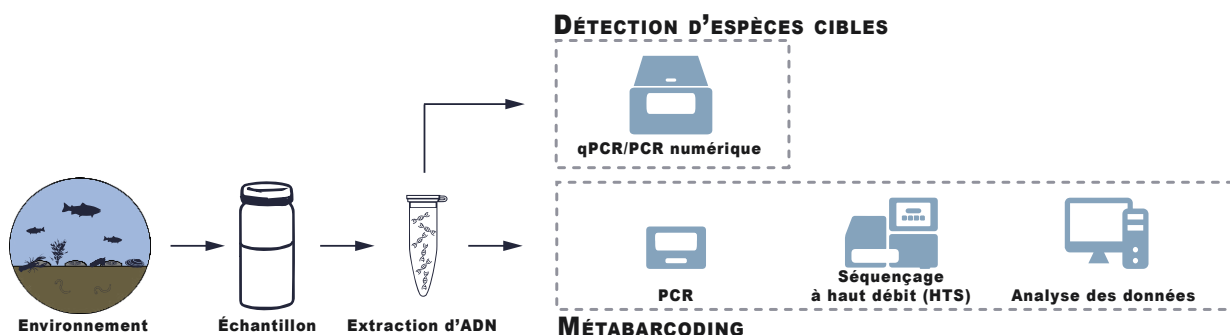
- Si l'objectif est de **détecter une espèce cible** de taxon menacé ou envahissant, un parasite ou un pathogène, l'approche qui convient le mieux est d'utiliser la PCR conventionnelle, la qPCR ou encore la dPCR (cf. 5.4).
- Si l'objectif est d'**analyser la composition d'une communauté** dans le cadre d'un inventaire de la biodiversité ou d'une évaluation de la qualité écologique, alors l'approche la plus efficace est d'utiliser le métabarcoding, c'est-à-dire un séquençage à haut débit sur les amplicons (cf. 5.5).

Dans les deux cas, l'échantillonnage d'ADNe et l'extraction d'ADN suivent les mêmes protocoles. Les mêmes échantillons d'ADNe peuvent être utilisés aussi bien pour la détection d'espèces que pour les inventaires de la biodiversité. Cependant, toutes les étapes en aval de l'extraction d'ADN sont différentes (laboratoire moléculaire et analyse des données compris).

Le choix d'une méthode dépend par ailleurs de l'accès aux équipements et de l'expertise des personnes concernées.

Figure 10

Flux des travaux d'une analyse ADNe pour la détection d'espèces cibles d'une part et le métabarcoding d'autre part



Les méthodes de détection d'espèces cibles par PCR sont plus rapides, plus faciles et moins onéreuses, alors que le métabarcoding requiert des équipements spécialisés et un niveau d'expertise accru pour générer et interpréter les données sur les séquences. Le fait que cette dernière méthode permet d'obtenir simultanément des informations sur de nombreuses espèces est un élément de poids à prendre en compte dans la planification d'une étude de surveillance biologique. La détection d'espèces cibles est recommandable uniquement pour quelques organismes particuliers (p. ex. des espèces rares ou envahissantes ou des pathogènes ciblés) pour lesquels des amorces spécifiques solidement validées existent.

5.2 Extraction d'ADN

Si la façon d'extraire l'ADN dépend très largement du type d'échantillon, le flux général des travaux reste toujours le même. La première étape est la lyse du matériel échantillonné pour isoler l'ADN présent dans les cellules ou les organelles (mitochondries ou chloroplastes). La lyse peut être effectuée avec des composants chimiques présents dans le tampon de lyse ou par rupture mécanique des parois et des membranes, en général en ajoutant des billes à l'échantillon et en le secouant à l'aide d'un vortex ou d'un homogénéiseur à billes. La deuxième étape consiste à retirer tous les composants organiques et inorganiques, à l'exception de l'ADN. Comme certains types d'échantillons environnementaux contiennent des inhibiteurs de PCR, cette étape comprend en général l'élimination de tous ces inhibiteurs pour assurer une bonne

amplification de l'ADN. Pour terminer, l'extrait d'ADN est purifié sur une membrane de silice, à l'aide de billes magnétiques ou par précipitation.

Sur le marché, plusieurs sociétés proposent des kits pour différents types d'extraction d'ADN. Ces kits peuvent être utilisés pour extraire de l'ADNe à partir d'échantillons d'eau (p. ex. Qiagen, Macherey-Nagel). Il existe en outre des protocoles maison, fondés principalement sur une extraction au phénol-chloroforme. Tsuji et al. (2019) ont recensé les méthodes courantes de récolte et d'extraction. Bien que, dans certains cas spécifiques, les méthodes d'extraction ne soient pas considérées comme un facteur limitant (Vasselon et al., 2017b), l'utilisation de différentes méthodes d'extraction peut résulter en des assemblages d'espèces sensiblement différents (Deiner et al., 2015, 2018). C'est pourquoi il faut employer systématiquement un seul et unique protocole au cours d'un projet, afin de garantir la reproductibilité et la comparabilité des résultats.

5.3 Amplification PCR

Principe

La quantité d'ADN cible présente dans les échantillons environnementaux peut être relativement faible. Il faut donc amplifier la région de code-barres ADN cible par amplification en chaîne par polymérase (PCR) avant le séquençage. Le principe de cette méthode consiste à générer plusieurs copies de la région de code-barres en utilisant deux oligonucléotides courts, appelés amorces,

à l'aide d'une enzyme polymérase. La PCR comprend trois étapes majeures qui sont répétées sur 25 à 50 cycles. La première étape de dénaturation sert à séparer les deux brins d'ADN. Elle est en général réalisée à haute température (de 94 à 98°C). Durant la deuxième étape, il y a hybridation des amorces avec la région d'ADN cible à une température qui dépend des séquences d'amorces et du degré de spécificité requis (en général entre 45 et 60°C). La troisième et dernière étape consiste en une élongation de la région de code-barres grâce à l'action d'une polymérase. Elle est en principe effectuée à 72°C, mais la température exacte dépend de l'enzyme. Chacune des trois étapes dure en général de 30 à 60 secondes en fonction des amorces et de la polymérase utilisées. Résultat de la réaction PCR, le nombre de fragments d'ADN amplifiés, également appelés amplicons, croît de manière exponentielle, ce qui génère suffisamment de matériel pour le séquençage.

Amorces PCR

Le choix des amorces PCR est une étape cruciale pour la détection des espèces dans les échantillons d'ADNe. Dans le cas de la détection d'espèces cibles, les amorces doivent être spécifiques afin d'éviter les faux positifs lors de la détection. Par ailleurs, l'application de ces amorces doit être correctement validée pour que l'utilisateur final puisse interpréter les résultats (tests comparatifs avec des espèces non cibles et sur un éventail d'échantillons environnementaux, et dans l'idéal dans des campagnes d'échantillonnage temporelles). Pour cette approche, on utilise pour amplifier l'ADN des techniques PCR conventionnelles, quantitatives ou numériques. Pour l'approche communautaire, les amorces doivent être suffisamment génériques pour amplifier toutes les espèces appartenant au groupe cible et, dans l'idéal, seulement celles-ci.

Les amorces doivent hybrider la région de code-barres ADN, qui dépend de l'espèce concernée. La construction des amorces et leur spécificité potentielle par rapport à un groupe taxonomique d'intérêt dépend du caractère du gène à amplifier (Taberlet et al, 2018, proposent une vue d'ensemble exhaustive). Il existe deux types de marqueurs pour le barcoding : des gènes codant des protéines (p. ex. COI ou rbcL) et des gènes ribosomiques (p. ex. 18S, 16S, 12S, ITS ou 23S). Ces deux types de gènes ne sont pas construits de la même manière. Les gènes codant des

protéines sont en principe uniformes pour tout le gène afin d'assurer une traduction adéquate des acides aminés. Cependant, comme le code génétique est redondant, la 1^{re} et la 3^e bases du codon peuvent varier selon les espèces, ce qui est particulièrement utile pour garantir une bonne identification au niveau des espèces. Il peut toutefois être difficile de trouver, dans les gènes codant des protéines, les signatures typiques des rangs taxonomiques supérieurs. C'est pourquoi les amorces COI, qui fonctionnent très bien pour le barcoding d'espèces cibles, sont bien moins efficaces pour le métabarcoding. Les gènes ribosomiques sont quant à eux composés d'une mosaïque de régions conservées et de régions variables. Il est donc plus aisé de trouver les signatures génétiques des groupes taxonomiques supérieurs dans la région conservée, qui permet la synthèse à la fois d'amorces très spécifiques et d'amorces plus universelles. En principe, une ou deux régions variables sont utilisées ensuite pour l'identification au niveau de l'espèce ou du genre. Certaines études utilisent un ensemble de plusieurs paires d'amorces ciblant différentes régions variables dans la même réaction PCR, une méthode appelée PCR multiplexe. Cependant, cette approche peut engendrer certains biais et diminuer l'efficacité de la réaction PCR si elle n'est pas réalisée correctement. Il est recommandé d'utiliser une paire d'amorces pour chaque réaction PCR, sauf si des essais approfondis ont été effectués pour l'approche multiplexe.

Répétitions PCR

En général, plusieurs répétitions de la même réaction PCR, souvent appelées répliquats PCR, sont réalisées pour chaque échantillon d'ADNe. Pour chaque réaction PCR, seul un sous-échantillon de l'ADNe total extrait est utilisé, en principe 1 à 10 % de l'échantillon. Il est possible de manquer par hasard une espèce dans une réaction PCR (ce qui engendre un faux négatif). Or les répliquats PCR augmentent la probabilité de trouver l'ADN des espèces cibles présentes dans les échantillons. Pour les études de métabarcoding, on considère qu'il faut au minimum deux répliquats PCR pour obtenir un bon aperçu de la biodiversité ciblée. Cependant, si l'objectif est de détecter une espèce spécifique (approche ciblée), il convient d'augmenter le nombre de répliquats. Pour la détection d'espèces cibles dans les analyses de communautés, les bonnes pratiques recommandent de réaliser entre 7 et

15 réplicats PCR pour chaque échantillon. On peut également envisager d'ajouter davantage d'ADN à chaque réaction et d'effectuer moins de réplicats.

5.4 Détection d'espèces cibles

Pour répondre à certaines questions écologiques, il est intéressant de détecter des espèces uniques plutôt que de dresser l'inventaire d'une communauté tout entière, en particulier s'il s'agit d'une espèce exotique, envahissante, illusoire ou encore protégée. La détection d'espèces cibles a été utilisée pour de nombreuses études et couvre tous les groupes d'organismes (cf. tab. 3). Dès lors qu'un test ADNe spécifique à une espèce est établi et testé rigoureusement en laboratoire, les résultats peuvent être fournis relativement rapidement après extraction.

Il existe en Europe à l'heure actuelle un seul test ADNe spécifique à une espèce (cf. p. ex. Thomsen et al., 2012 ; Rees et al., 2014b) régulièrement implémenté sur une base réglementaire (selon un mandat légal). L'organisme de réglementation *Natural England* au Royaume-Uni a reconnu formellement la détection de l'ADNe du triton crêté (*Triturus cristatus*) comme une preuve valable de la présence physique de l'espèce, ce qui permet de placer les habitats testés sous protection. La détection d'espèces cibles est privilégiée à l'analyse de la communauté tout entière, car le temps d'analyse et les coûts par échantillon sont moindres. Il est important de noter qu'un test spécifique à une espèce permet uniquement de détecter l'espèce cible et ne fournit aucune information sur l'occurrence d'autres espèces, même si celles-ci sont proches.

Pour parvenir aux meilleurs résultats, toutes les étapes, de l'échantillonnage d'ADNe jusqu'à la PCR en passant par l'extraction, doivent être optimisées en fonction de l'espèce considérée. Développer un test PCR spécifique à une espèce est chronophage et donc onéreux. De nombreux tests ont été publiés dans la littérature scientifique, mais l'ampleur des essais réalisés pour ces tests concernant la spécificité et la sensibilité (limite de détection, LoD) varie considérablement. De plus, il convient de considérer la zone géographique pour laquelle le test a été validé, car celui-ci pourrait ne pas convenir pour

Interprétation de résultats PCR pour des espèces cibles

Il est important de noter que les méthodes moléculaires ne fournissent pas des résultats équivalents à ceux obtenus par les méthodes traditionnelles. Alors que l'échantillonnage classique se traduit souvent par la récolte d'individus, fournissant donc des informations sur nombre d'individus, les résultats des études ADNe reflètent le nombre d'amplicons et ne peuvent pas être mis en lien direct avec le nombre d'individus. Il peut donc être utile d'avoir à disposition des indications générales sur l'interprétation des résultats. Il est essentiel de reconnaître que la PCR est un processus hautement stochastique et qu'une amplification positive n'est possible que si la molécule d'ADN cible est présente dans la réaction. En raison de cette stochasticité, plusieurs réplicats PCR sont réalisés pour chaque échantillon, mais le nombre dépend de la méthode. Si tous les réplicats ou une grande majorité d'entre eux sont positifs, la détection est robuste, ce qui indique une forte probabilité que l'espèce soit présente dans l'environnement échantillonné. Cependant, si seuls un ou quelques réplicats PCR sont positifs, la détection est alors incertaine et d'autres recherches sont nécessaires. On peut par exemple augmenter le nombre de réplicats PCR ou utiliser des méthodes traditionnelles. Pour terminer, même si tous les réplicats sont négatifs et qu'il est impossible de prouver la présence de l'espèce, cela ne signifie pas pour autant que l'espèce cible est absente (ce raisonnement s'applique à toute méthode résultant en des détections négatives).

d'autres régions que celle pour laquelle il a été développé. Il faut en effet s'attendre à une inadéquation du test lorsque l'espèce cible présente une variation locale dans la région de code-barres sélectionnée ou si le pool d'espèces local est différent et comprend des espèces pour lesquelles le test n'a pas fait l'objet d'essais. Goldberg et al. (2016) ont publié des considérations critiques dans la perspective d'aider les praticiens à comprendre l'étape de développement et les incertitudes en découlant pour un test en particulier. L'implémentation d'une échelle de vali-

dation des tests fait actuellement l'objet de discussions (des détails sont disponibles sur www.edna-validation.com/) et peut aider à comprendre les incertitudes encore non résolues et l'interprétation des différents tests développés.

Actuellement, trois approches PCR différentes sont utilisées pour amplifier de l'ADN spécifique à des espèces dans le but de détecter des espèces cibles : la PCR conventionnelle, la qPCR et la dPCR. Les résultats de la PCR conventionnelle renseignent sur la présence ou l'absence des espèces cibles, alors que la qPCR et la dPCR permettent d'estimer l'abondance des espèces sur la base des concentrations d'ADNe. Les sections qui suivent s'intéressent aux caractéristiques de chacune de ces approches, en les commentant et en présentant les opportunités.

5.4.1 PCR conventionnelle

Un test de PCR conventionnelle consiste en une amplification sur la base d'une amorce sens et/ou antisens spécifique à une espèce. La réaction s'effectue dans une machine PCR conventionnelle, un bloc chauffant capable de produire en très peu de temps les différentes températures utilisées pour la PCR. Le produit issu d'une PCR traditionnelle est validé à la fin de tous les cycles. Il est généralement visualisé à l'aide d'un gel d'agarose, d'une électrophorèse capillaire ou d'un séquenceur si des amorces marquées par fluorescence ont été utilisées (Goldberg et al., 2011). Ces trois options permettent toutes de vérifier le produit en fonction de la longueur de la séquence d'un amplicon ou de la lumière émise, mais ne prouvent pas que le produit créé correspond effectivement aux paires de base de la séquence attendue.

Plusieurs études ont été publiées sur la base d'une approche de PCR conventionnelle spécifique à une espèce (p.ex. Deagle et al., 2003 ; Jerde et al., 2011 ; Mahon et al., 2013 ; Keskin, 2014 ; Mächler et al., 2014 ; Piaggio et al., 2014). Cependant, la PCR conventionnelle renseigne uniquement sur la présence ou l'absence d'une espèce. Cette méthode a longtemps été populaire, car les coûts par échantillon sont faibles, mais comme les prix sont à la baisse, on peut s'attendre à ce qu'elle soit rapidement remplacée par d'autres approches PCR.

5.4.2 PCR quantitative (qPCR)

La qPCR propose de quantifier la concentration initiale d'ADN dans un échantillon, ce qui va au-delà des possibilités de la PCR conventionnelle. Cette quantification est particulièrement pertinente sachant qu'un bon nombre d'études ont démontré un lien positif entre la concentration d'ADNe détecté et l'abondance ou la biomasse des espèces cibles (p.ex. Takahara et al., 2012 ; Jane et al., 2015 ; Klymus et al., 2015). Il existe deux stratégies différentes pour réaliser une qPCR : utiliser un marqueur fluorescent ou utiliser une sonde marquée par fluorescence. Les deux stratégies se fondent sur une quantification fluorescente du produit PCR et nécessitent donc une machine de qPCR détectant la fluorescence.

Les marqueurs fluorescents utilisés en qPCR émettent de la lumière lorsque les produits PCR s'accumulent. Comme pour la PCR conventionnelle, un test consiste en une amorce sens et/ou antisens spécifique à une espèce, mais un marqueur fluorescent est ajouté au mélange PCR. Un test qPCR utilisant un marqueur fluorescent n'est pas plus spécifique qu'une réaction PCR conventionnelle étant donné qu'il cible l'ensemble de l'ADN double brin. La lumière serait émise de toute façon, que le produit généré contienne ou non la séquence spécifique à l'espèce, ce qui créerait des faux positifs ou une surestimation de la concentration d'ADN. Les bonnes pratiques voudraient ainsi que le produit soit séquençé, à titre de confirmation.

Une deuxième stratégie consiste à utiliser une sonde marquée par fluorescence. Il s'agit d'une sonde nucléotidique supplémentaire qui se lie à la séquence cible durant la PCR et qui libère de la fluorescence lors de l'amplification, générant ainsi un signal perceptible. Comme pour les amorces, la sonde envisagée doit correspondre à la séquence spécifique à l'espèce afin d'éviter toute amplification non ciblée. Il est plus difficile de concevoir un test de sonde étant donné que les trois éléments (la sonde ainsi que les amorces sens et antisens) sont tous présents dans le même test et ne doivent pas interférer les uns avec les autres ni se faire barrage. Comme la quantification implique de faire correspondre ces trois éléments, le test présente une spécificité et une sensibilité accrues. De plus, la stratégie par sonde permet un multiplexage si différents fluorophores sont utilisés pour divers tests (en

fonction de la machine qPCR, il est possible d'utiliser jusqu'à cinq combinaisons différentes).

Pour ces deux stratégies qPCR, la quantification d'ADN peut être relative ou absolue. La quantification relative permet la comparaison d'échantillons traités simultanément au cours d'une même analyse. La quantification absolue d'ADN, qui est en principe la solution préférée, est plus significative. Pour réaliser une quantification absolue, il faut effectuer une série de dilutions avec un échantillon standard à la concentration d'ADN cible connue. Réaliser des essais rigoureux sur le test et sur la série de dilutions de la cible permet de définir la plus petite quantité d'ADN cible qui peut être détectée (LoD) ainsi que la concentration la plus faible fournissant des niveaux acceptables de précision et d'exactitude pour la quantification (limite de quantification ou LoQ, cf. Klymus et al., 2019).

Actuellement, les approches qPCR utilisant une sonde constituent la référence absolue pour la détection d'espèces cibles (p. ex. Thomsen et al., 2012 ; Goldberg et al., 2013 ; Laramie et al., 2015 ; Mauvisseau et al., 2018). Des études indiquent que la qPCR pourrait être légèrement moins précise et plus onéreuse que la dPCR (p. ex. Hunter et al., 2017). On peut donc s'attendre à ce que les approches qPCR soient moins employées à l'avenir, une fois que la dPCR aura percé et sera plus largement disponible.

5.4.3 PCR numérique (dPCR)

La PCR numérique, aussi appelée PCR digitale, (dPCR) est la technique PCR la plus récente. Différentes technologies et de nombreuses nouvelles applications sont attendues. L'approche dPCR a déjà été employée dans des études ADNe (Nathan et al., 2014 ; Doi et al., 2015 ; Hunter et al., 2017 ; Baker et al., 2018). Elle est similaire à la qPCR en ceci qu'elle requiert un marqueur fluorescent ou une sonde marquée par fluorescence pour quantifier l'ADN dans un échantillon, mais la méthode de quantification se fonde sur une technique différente. La dPCR fractionne un échantillon individuel en des milliers de partitions, et chaque compartiment contient ou non un brin d'ADN matrice. Chacun des compartiments fonctionne comme un microréacteur PCR où l'amplification de la séquence cible se produit (le cas échéant). Les com-

partiments sont ensuite analysés grâce à une technologie microfluidique ou un module optique pour déterminer la proportion d'amplifications PCR positives. Cette approche permet de quantifier l'ADN sans établir de courbe standard avec les échantillons et de quantifier à faible concentration avec une plus grande exactitude par comparaison avec la qPCR. Dans une dPCR, il est possible de multiplexer quelques tests, de manière similaire à l'approche qPCR, en utilisant des sondes avec des fluorophores différents. Jusqu'ici, seule une étude ADNe s'est intéressée aux liens entre la concentration d'ADN mesurée par dPCR et la biomasse. Elle a identifié une relation positive entre ces deux éléments (Doi et al., 2015).

5.5 Métabarcoding

5.5.1 PCR pour le métabarcoding

La longueur du code-barres amplifié est un élément important à prendre en compte pour concevoir des amorces de métabarcoding. Il faut veiller à ce que le code-barres ne soit pas trop court et que sa taxonomie soit résolutive, c'est-à-dire qu'elle comprenne assez de variations pour distinguer les espèces proches. Cependant, le code-barres ne doit pas être trop long non plus, car il ne répondrait plus aux exigences techniques des technologies de séquençage. Actuellement, la plupart des codes-barres utilisés pour le métabarcoding comprennent entre 200 et 500 paires de base. Des codes-barres plus courts (moins de 120 paires de base) sont parfois utilisés, en particulier pour la détection d'espèces macrobiennes. Toutefois, des fragments de gènes d'une si petite taille sont plus susceptibles d'être conservés et transportés sur de longues distances et présentent une résolution taxonomique plus faible.

Biais de la PCR

Bien que l'amplification PCR constitue un excellent outil pour amplifier des métacodes-barres, elle représente aussi la principale source d'erreurs techniques durant le flux des travaux de métabarcoding (Berney et al., 2004 ; Aird et al., 2011). Ces erreurs techniques comprennent les substitutions et les insertions introduites par l'enzyme polymérase (Eckert & Kunkel, 1991 ; McInerney et al., 2014 ; Lee et al., 2016), les substitutions causées par les changements de température durant les cycles de la PCR

(Potapov & Ong, 2017) et la formation de chimères (Fonseca et al., 2012). Des produits PCR chimériques sont créés lorsque de petits fragments d'ADN n'ayant pas terminé l'élongation au cours d'une étape sont utilisés comme « amorces » à l'étape d'amplification suivante. L'amplicon final est alors une séquence chimérique n'existant dans aucun organisme vivant, composée de deux fragments d'ADN différents provenant de deux organismes distincts. Par ailleurs, il est important de savoir que les amorces de métabarcoding n'amplifient pas tout l'ADN de façon équivalente dans l'échantillon, ce qui conduit à un biais dans la proportion d'abondance de l'ADN des différentes espèces (Elbrecht & Leese, 2015 ; Piñol et al., 2015). Tous ces biais liés à la PCR doivent être pris en compte durant l'analyse des séquences.

5.5.2 Séquençage à haut débit (HTS)

Plusieurs étapes sont nécessaires pour préparer la réaction de séquençage. Premièrement, les réplicats PCR doivent être regroupés, purifiés et quantifiés pour préparer la librairie. Au cours de cette étape, des adaptateurs de séquençage sont ajoutés à chaque échantillon afin d'être démultiplexés (identifiés) pendant l'analyse subséquente au séquençage. Plusieurs stratégies ont été développées pour permettre le multiplexage de plusieurs échantillons au sein d'une même librairie, notamment des approches de marquage par ligation ou de marquage PCR en une ou deux étape(s). Cette dernière méthode consiste à utiliser des amorces marquées portant une brève série de nucléotides attachés au côté 5' de chaque amorce. Une combinaison unique de ces amorces est utilisée pour chaque échantillon afin de démultiplexer les échantillons après séquençage (Esling et al., 2015). Lorsque des stratégies de multiplexage sont employées, l'utilisation d'un protocole sans PCR est recommandée pour préparer la librairie afin d'éviter de créer des amplicons chimériques qui pourraient provenir de différents échantillons. Pour terminer, il convient de vérifier et quantifier chaque librairie par qPCR avant de procéder au séquençage.

Plusieurs auteurs ont rédigé des comparaisons des performances de différentes plates-formes HTS (Quail et al., 2012 ; Frey et al., 2014). La technologie de séquençage la plus utilisée actuellement pour le métabarcoding est l'Illumina MiSeq, qui constitue le meilleur compromis pour séquencer les amplicons, avec une longueur de séquence

pouvant atteindre les 600 nucléotides et une sortie maximale jusqu'à 24 millions de séquences. Cet instrument MiSeq propose plusieurs solutions à double sens de lecture (« *paired-end* ») pour traiter les échantillons. Quatre supports de séquençage (« *flow cells* ») différents sont disponibles pour générer 1, 4, 15 ou 24 millions de séquences avec une longueur de fragment de 2 × 150, 2 × 250, et jusqu'à 2 × 300 paires de base avec le support 24M. La profondeur de séquençage recommandée pour l'Illumina Miseq (nombre de séquences théoriques par échantillon) oscille en général entre 50 000 et 100 000 séquences par échantillon, mais la profondeur requise dépend de l'objectif de l'analyse. Son effet doit donc être examiné à l'aide de courbes de raréfaction.

5.5.3 Analyse des données

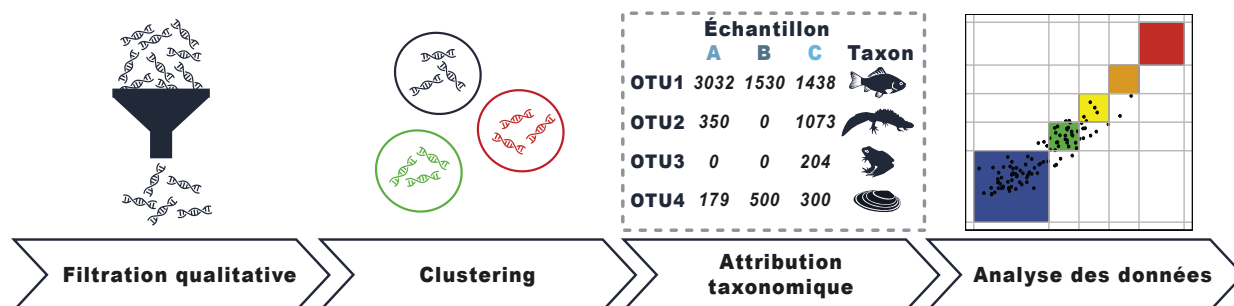
La partie bio-informatique du métabarcoding comprend les quatre étapes principales ci-dessous (cf. également la fig. 11).

1. **Sélection selon la qualité :** les séquences d'amplicons de faible qualité et/ou contenant des bases ambiguës sont retirées. Les séquences à double sens de lecture sont combinées en une séquence contiguë sur toute la longueur, et les chimères potentielles sont retirées.
2. **Clustering :** les séquences de haute qualité sont regroupées en clusters en fonction de leur similarité les unes avec les autres et groupées en des unités taxonomiques opérationnelles (*operational taxonomic units*, OTU).
3. **Attribution taxonomique :** les OTU sont comparées à la base de référence et assignées à un taxon en fonction de la similarité de leur séquence ou d'autres critères.
4. **Analyse des données :** la liste des OTU sert à analyser la composition taxonomique de chaque échantillon et leur lien avec les variables environnementales.

Les développements récents en matière de bio-informatique pour les analyses métabarcoding ont tendance à contourner l'étape de *clustering* en débruitant les données HTS et en combinant les séquences en des variants de séquences d'amplicon (ASV), qui pourraient remplacer les OTU à l'avenir (Callahan et al., 2017).

Figure 11

Flux des travaux pour une analyse de données HTS



Pour garantir la transparence et la reproductibilité des analyses, il est important de documenter (en créant des rapports) la chaîne de traitement bio-informatique et les données obtenues aux étapes intermédiaires du processus de nettoyage. Plusieurs algorithmes sont disponibles pour analyser les données de métabarcoding. La plupart sont proposés avec une interface de ligne de commande

uniquement (QIIME, MOTHUR, DADA2 et Obitools), mais certains disposent d'une interface graphique conviviale (SLIM, Dufresne et al., 2019). Comme la bio-informatique est une discipline évoluant très rapidement et que de nouveaux algorithmes apparaissent constamment, le consensus sur l'algorithme à privilégier est relativement faible dans la communauté scientifique.

Interprétation de résultats de métabarcoding

Il est important de toujours utiliser la même chaîne de traitement pour comparer des données de métabarcoding tout en gardant en mémoire qu'il est possible de revenir au fichier de la séquence originale et de faire passer celui-ci à travers une nouvelle chaîne de traitement si nécessaire. Le degré d'expertise de la personne interprétant les données de métabarcoding est un élément essentiel. Il est important d'être conscient de certaines difficultés de la méthode. Les données générées sont en principe présentées sous forme de matrice comprenant la liste des espèces (ou la liste des OTU) et le nombre de séquences trouvées dans chaque échantillon pour chaque espèce. Ce nombre peut considérablement varier, ce qui représente un défi majeur dans l'interprétation quantitative des données de métabarcoding. Pour les taxons abondants, plusieurs études ont montré une corrélation entre les quantités relatives de séquences et l'abondance relative de spécimens au sein d'un groupe taxonomique (Evans et al., 2016; Hänfling et al., 2016; Schenk et al., 2019). Bien que prometteuses, ces conclusions sont très spécifiques et ne peuvent pas être généralisées à toutes les études de

métabarcoding. L'interprétation peut être encore plus problématique avec des espèces rares. Comme il a été montré que le métabarcoding est très sensible, la présence de certaines espèces pourrait être facilement surestimée. Même en travaillant de manière méticuleuse et en utilisant le matériel et l'équipement appropriés pour l'échantillonnage et le travail en laboratoire, il est impossible d'éviter complètement les contaminations croisées, y compris les mauvaises combinaisons (« tag jumping ») qui se créent artificiellement durant le séquençage. La réponse courante à ce problème est l'utilisation d'un seuil pour le nombre de séquences afin d'éviter les faux positifs. Cependant, il n'existe aucun consensus quant au seuil à utiliser. En principe, les seuils sont spécifiques à une espèce en particulier et se fondent sur l'analyse d'une grande quantité d'échantillons contrôlés (Harper et al., 2018). L'utilisation de contrôles positifs et négatifs durant le séquençage pourrait aider à résoudre ce problème.

6 Base de référence pour l'attribution taxonomique

L'attribution taxonomique est une étape cruciale pour une étude de métabarcoding, car elle permet de faire le lien entre les séquences d'ADN et les morpho-espèces. Dans cette perspective, il faut disposer d'une base de référence de grande qualité. Les bases de référence incomplètes constituent le principal facteur limitatif pour l'attribution de séquences à des noms taxonomiques. Des lacunes importantes subsistent encore même pour des taxons qui sont des bio-indicateurs courants (Weigand et al., 2019). Cependant, plusieurs initiatives internationales et nationales cherchent à les combler. L'initiative GBIF.ch au niveau suisse centralise les séquences d'ADN liées à des observations d'espèces ou à des spécimens dans des collections de musées. Ces données sont traitées pour construire une base de référence suisse qui comprenne l'ensemble des données génétiques pour toutes les espèces présentes en Suisse. La base GBIF.ch sera accessible au public dès 2021 et mentionnera différents niveaux de qualité pour chaque séquence associée. Les variations des niveaux de qualité s'expliquent par la qualité des données ADN en tant que telles (fichier source issu du séquençage par la méthode Sanger), mais aussi par la traçabilité du matériel génétique à l'origine des

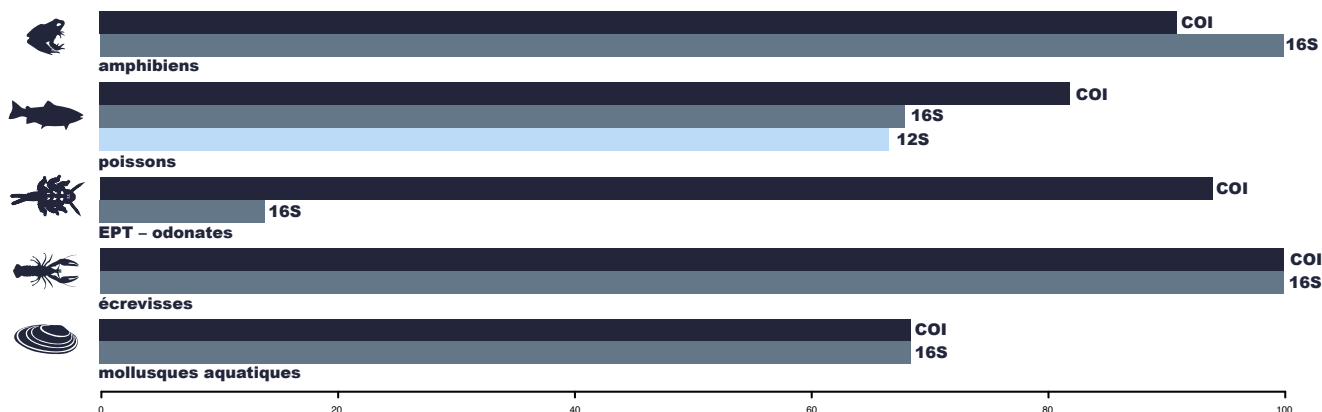
séquences d'ADN et par la fiabilité de la détermination des espèces. De la documentation relative aux échantillons d'ADN et/ou de tissus sera disponible ainsi qu'un classement des séquences génétiques en fonction du type de la référence (holotype, paratype, topotype, spécimen de référence ou photo du spécimen de référence). La majorité des données disponibles à l'heure actuelle concernent des espèces terrestres, mais le nombre d'entrées pour les espèces aquatiques croît rapidement (p. ex., toutes les espèces de plécoptères et de trichoptères vivant en Suisse viennent d'être séquencées, et la base de données pour les espèces d'oligochètes se trouve à un stade avancé). La figure 12 illustre le pourcentage de complétude des principaux taxons aquatiques en Suisse.

Il existe, outre cette base de données locale, plusieurs bases internationales en ligne qui peuvent être utilisées pour l'attribution taxonomique. Les plus courantes sont BOLD (v4.boldsystems.org/) et MIDORI (reference-midori.info/server.php) pour le marqueur COI, SILVA (<https://www.arb-silva.de/>) pour les marqueurs ribosomiques, Diat.barcode principalement pour le marqueur *rbcL* des

Figure 12

Pourcentage de complétude pour des espèces appartenant à une sélection de taxons aquatiques présents en Suisse

Sur le graphique, les régions de code-barres COI et 16S sont indiquées pour tous les groupes, et le groupe des poissons comprend en outre la région 12S. EPT signifie éphéméroptères, plécoptères et trichoptères.



diatomées (Rimet et al., 2019) et GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pour tous les marqueurs. Cependant, il est important de toujours se soucier de la qualité de la séquence et de l'attribution, en particulier avec les bases de données qui ne sont pas curées (Genbank et MIDORI). Il peut être utile de mettre en place une base de référence locale en reprenant les groupes taxonomiques d'intérêt et en gérant la base au niveau local.

7 Gestion des données

Comme toute étude génétique, une étude ADNe doit suivre un plan de gestion des données. En d'autres termes, il faut documenter et publier toutes les informations pertinentes concernant la création des données ADNe, leur analyse et leur stockage. Il est important de bien définir les exigences de gestion des données lors de la planification de l'étude ADNe. Il est recommandé de porter une attention particulière aux points ci-après.

- Clarifier comment seront traités les extraits d'ADNe.
- Planifier et documenter le stockage à long terme des extraits d'ADN, de préférence à l'aide de réseaux de biobanques.
- Rendre tous les protocoles de laboratoire disponibles (type d'extraction d'ADN, amorces utilisées, configuration PCR et séquençage).
- Mettre à disposition les paramètres de filtration des données de séquençage et des autres analyses bio-informatiques.
- Définir les modalités de la base de référence pour l'attribution taxonomique et y donner accès ; on optera dans l'idéal pour une base de référence publique.
- Définir où et comment les données de séquençage brutes et le jeu de données de séquençage final après traitement sont stockés et rendus disponibles.
- Définir les droits de propriété des données. Les bonnes pratiques consistent à verser toutes les séquences générées dans une base de données publique (p. ex. la *European Nucleotide Archive*).

Le plan de gestion des données garantit que l'étude ADNe sera menée conformément aux bonnes pratiques et aux standards généralement acceptés dans le domaine. Les techniques de laboratoire utilisées pour l'extraction d'ADNe et son traitement varient considérablement. Il est donc recommandé de décrire la méthodologie générale dans un rapport et de fournir des informations plus détaillées sur demande. Ce point est crucial pour que l'étude ADNe puisse être reproduite ou comparée à des études similaires.

En Suisse, des institutions nationales ont développé une matrice pour soumettre les observations des espèces issues de projets ADNe (GBIF.ch, www.gbif.ch ; InfoSpecies, www.infospecies.ch ; SwissBOL, www.swissbol.ch). Son utilisation est recommandée. Cette matrice respecte les exigences de base d'InfoSpecies et comprend des informations sur le flux des travaux moléculaires. InfoSpecies peut ainsi valider les observations d'espèces fondées sur l'ADNe. La matrice comprend par ailleurs des informations sur la nature de l'échantillon, sur les personnes impliquées dans le processus ainsi que sur la base de données de référence utilisée pour l'attribution taxonomique et sur la fiabilité des résultats (notamment nombre d'échantillons répétés ayant fourni des résultats qPCR positifs pour une espèce donnée). Il est vivement recommandé de joindre un rapport du projet au format PDF.

8 Exemples d'applications (études de cas)

8.1 Détection d'espèces cibles

Il est possible de générer des tests spécifiques pour n'importe quelle espèce, mais le développement d'un test est plus aisé si des codes-barres ADN sont déjà disponibles pour l'espèce considérée. De nombreux tests pour un large éventail d'espèces ont été établis dans la littérature scientifique. Le tableau 3 en présente une sélection. Les deux études de cas ci-après sont des exemples particulièrement pertinents pour la Suisse.

8.1.1 Moule quagga

La moule quagga (*Dreissena bugensis*) est une espèce envahissante qui s'est installée récemment dans les systèmes d'eau douce en Europe. Originaire de la région ponto-caspienne, elle a migré à travers le canal Main-Danube en direction du système du Rhin, comme l'a fait la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*). Cependant, contrairement à son espèce sœur, la moule quagga survit avec peu de nutriments et dans des habitats froids. Elle peut donc coloniser des zones plus profondes, un comportement qui peut engendrer des problèmes pour les fournisseurs d'eau potable (obstruction des canalisations en particulier). Les moules envahissantes peuvent être détectées via leurs larves véligères. Il faut pour ce faire examiner des échantillons d'eau au microscope.

En Suisse, De Ventura et al. (2017) ont utilisé l'ADNe pour étudier la répartition des deux espèces envahissantes *Dreissena* dans le bassin versant du Rhin. Au moment de l'étude, la moule zébrée était déjà présente dans tout le système fluvial, tandis que la moule quagga avait été identifiée jusqu'à Kehl (Allemagne), mais pas encore en Suisse. De Ventura et ses collègues ont trouvé pour la première fois de l'ADNe de moule quagga à Bâle (Suisse) et ont ainsi pu, grâce à l'ADNe, attester la présence de cette espèce envahissante, avant que toute autre méthode ne l'ait fait. Ce résultat a suscité un vif intérêt de la part du gouvernement fédéral et des services cantonaux et a permis de renforcer la sensibilisation ainsi que d'intensifier la surveillance de cette espèce envahissante. En

mai 2016, des plongeurs ont observé pour la première fois la moule quagga dans le lac de Constance, à une profondeur de 25 m. Actuellement, l'espèce est présente partout dans le lac de Constance et dans le lac Léman, et potentiellement dans d'autres lacs suisses de grande taille également.

8.1.2 Gobie à taches noires

Le gobie à taches noires (*Neogobius melanostomus*) est l'une des cinq espèces en train d'étendre son territoire au système fluvial du Rhin. Originaire de la région ponto-caspienne, ce poisson s'est probablement répandu dans le Rhin sous forme de larves dans les eaux de ballast des navires. Il constitue une menace pour les espèces indigènes, car il entre en compétition avec celles-ci pour la nourriture et les sites de nidification, fait preuve d'un comportement territorial agressif et mange les œufs des espèces de poissons indigènes. En 2012, le gobie à taches noires a été découvert pour la première fois dans le Haut-Rhin (Kalchhauser et al., 2013) et en 2017, l'Office fédéral de l'environnement (OFEV) l'a placé sur la liste des espèces envahissantes. Traditionnellement, les inventaires des poissons sont dressés par pêche électrique, mais les espèces comme le gobie à taches noires sont difficiles à détecter avec une telle méthode, parce qu'elles se cachent entre les pierres dans les eaux interstitielles des grandes rivières.

En 2016, l'ADNe a été testé dans le Rhin comme méthode de détection du gobie à taches noires (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm, 2016). Une étude approfondie a développé des bonnes pratiques pour la détection de l'ADNe de ce poisson envahissant et un nouveau front d'invasion a été détecté. L'échantillonnage au fond de la rivière, proche de l'habitat du gobie, a donné de meilleurs résultats de détection que les échantillons prélevés à la surface de l'eau. Les tests de différents protocoles de laboratoire ont montré que certaines méthodes d'extraction ou l'inhibition pourraient entraver la détection du gobie. Pour établir un test sensible, il est nécessaire

d'adapter les méthodes d'échantillonnage et de laboratoire selon les spécificités des espèces concernées.

8.2 Diversité des vertébrés : exemple des tritons

Cinq espèces et une sous-espèce de tritons sont présentes en Suisse : *Lissotriton helveticus*, *Lissotriton vulgaris*, *Lissotriton vulgaris meridionalis*, *Ichthyosaura alpestris*, *Triturus cristatus* et *Triturus carnifex*. Leur répartition naturelle varie selon l'espèce considérée. Certains tritons (p. ex. *Lissotriton vulgaris meridionalis*) sont considérés comme indigènes dans certains cantons (TI), mais comme non indigènes dans d'autres (GE). C'est pourquoi il est important de développer des outils génétiques permettant d'inventorier la diversité des tritons dans son intégralité plutôt que de se concentrer sur la détection d'une espèce particulière (Harper et al., 2018).

En 2018 et 2019, une étude menée par l'Université de Genève (Charvoz et al., 2019) a développé un test de métabarcoding ADNe utilisé pour surveiller la diversité des tritons en région genevoise. Ce test se fonde sur un code-barres mitochondrial 16S permettant de distinguer toutes les espèces et sous-espèces de tritons présentes en Suisse, à l'exception des hybrides entre *Triturus cristatus* et *Triturus carnifex*. La spécificité du code-barres retenu avoisine les 65 % des séquences qui ont pu être attribuées aux tritons. Les autres séquences ont été assignées à des poissons et à des oiseaux. L'étude a cherché à détecter la présence de tritons dans 30 étangs par observation visuelle et analyse d'ADNe aquatique. L'ADN des tritons a été détecté sur tous les sites où des individus ont été observés, résultant en une correspondance parfaite entre les espèces séquencées et celles observées. De plus, l'ADN des tritons a été trouvé dans plusieurs étangs où les espèces n'ont pas été observées. Les résultats étaient particulièrement marquants dans le cas de *Lissotriton vulgaris meridionalis*, une espèce envahissante dont l'ADN a été trouvé dans 7 des 19 étangs où aucun individu n'avait été observé. D'autres études existent sur la détection des tritons par ADNe en Suisse (voir Dubey et al., 2019 et Cruickshank et al., 2019).

8.3 Macro-invertébrés

Les macro-invertébrés présentent une grande diversité et font partie (en plus des diatomées et des poissons) des principaux groupes servant d'indicateurs biologiques qui sont régulièrement examinés dans le cadre des évaluations de la qualité de l'eau. Il existe donc toujours un vif intérêt pour utiliser des outils moléculaires dans l'identification de communautés de macro-invertébrés. L'une des difficultés majeures réside dans le fait que les macro-invertébrés sont un groupe polyphylétique dont les membres sont très divers du point de vue phylogénétique. De nombreux taxons non ciblés qui ne sont pas considérés comme des macro-invertébrés, tels que les rotifères, sont aussi amplifiés et séquencés (Deiner et al., 2016). Il est important de noter que ces derniers taxons n'ont pas été inclus dans les évaluations classiques (p. ex. Stucki 2010), car ils ne sont pas accessibles par les méthodes classiques et les connaissances permettant de les identifier morphologiquement font défaut. Les approches de métabarcoding fondées sur l'ADN extrait des tissus (échantillons mixtes) pourraient être plus comparables aux méthodes d'échantillonnage courantes classiques, et l'implémentation pourrait être directe à court terme (Blackman et al., 2019). Les approches globales basées sur le métabarcoding d'ADN issu d'échantillons d'eau pourraient être plutôt utiles pour augmenter le nombre de taxons inclus (p. ex. pour inclure les invertébrés de petite taille).

8.3.1 ADNe issu d'échantillons d'eau (approche globale)

Mächler et al. (2019) ont réalisé une comparaison de grande envergure des évaluations des macro-invertébrés (échantillonnage par filet troubleau) et du métabarcoding de l'ADNe. Ils ont récolté de l'ADNe issu d'échantillons d'eau et des échantillons par filet troubleau sur 61 sites répartis sur un vaste réseau fluvial (bassin versant de la Thur, 700 km²), en se concentrant sur le niveau du genre pour les EPT (éphéméroptères, plécoptères et trichoptères) et en utilisant la région de code-barres COI. À l'échelle du bassin versant (diversité gamma), les approches ADNe et les échantillons par filet troubleau ont tous deux détecté des proportions similaires tant pour la richesse générale que cumulative au niveau du genre, soit respectivement 42 % et 46 %. Par ailleurs, le chevauchement entre

les genres trouvés dans l'ADNe et dans les échantillons par filet troubleau à l'échelle régionale (62 %) était globalement bon. De plus, à l'échelle de site également, la richesse des taxons locaux observés (diversité alpha) s'est aussi révélée très cohérente entre l'ADNe et les échantillons par filet troubleau. La richesse locale des macro-invertébrés identifiés dans les échantillons d'ADNe a montré un lien positif par rapport au débit (cf. également Deiner et al., 2016). Le chevauchement d'identité (c.-à-d. identité de genre) obtenu par les deux méthodes à l'échelle locale était moins bon. Ces résultats indiquent que les processus de transport d'ADNe influencent effectivement l'échantillon local, de sorte que les taxons trouvés sont un mélange de taxons locaux et de signaux provenant de l'amont.

De manière similaire, Fernández et al. (2018) ont réalisé une étude sur les macro-invertébrés en comparant la surveillance traditionnelle avec l'échantillonnage d'ADNe sur six sites de la rivière Nalón en Espagne. Ils ont testé trois codes-barres différents : deux basés sur la région 18S et un sur le COI. La concordance avec les méthodes traditionnelles était plus élevée avec le code-barres COI qu'avec le 18S (56,3 % contre 20,6 %). Cependant, certaines familles (chloroperlidés, elmids, lombricidés, phylopotamides et sphéridés) n'ont été détectées par aucun des trois codes-barres. Les résultats ont montré que les différents codes-barres ciblent différents groupes taxonomiques. Les détections les plus pertinentes avec le COI ont été obtenues pour les embranchements suivants, dans l'ordre décroissant des détections : arthropodes > cnidaires > annélides > mollusques. À noter que les embranchements et leur ordre étaient différents pour le 18S (nématodes > spongiaires > arthropodes > cnidaires). De manière générale, l'amorce COI a permis de détecter davantage de familles que l'échantillonnage traditionnel et les amorces 18S sont celles qui ont détecté le nombre le plus faible de familles.

8.3.2 ADN d'échantillons mixtes (par filet troubleau)

Elbrecht et al. (2017) ont réalisé une étude pour comparer les ratios de qualité écologique (EQR) de 18 sites fluviaux finlandais sur la base d'une identification morphologique et moléculaire. Pour ce faire, les chercheurs ont récolté des macro-invertébrés benthiques en suivant les directives nationales de surveillance, à l'aide

d'un filet troubleau et en mettant les spécimens en conservation sur le terrain. Des experts ont procédé à des analyses morphologiques dans le cadre du programme de surveillance de routine national et les spécimens ont été identifiés au niveau des espèces ou des genres, à l'exception des oligochètes, des turbellariés, des nématodes, des hydrozoaires et des deux familles de diptères que sont les chironomidés et les simuliés. Après identification morphologique, les spécimens ont été séchés, homogénéisés, puis utilisés pour l'extraction d'ADN. Le métabarcoding de l'ADN dérivé des tissus a été réalisé avec des amorces COI universelles ajustées pour les macro-invertébrés (Elbrecht & Leese, 2017). Les résultats des évaluations morphologiques, d'une part, et fondées sur l'ADN, d'autre part, ont montré une corrélation importante, mais la catégorie finale dérivée par les deux évaluations présentait parfois un écart d'un échelon (p.ex. « *Good* » au lieu de « *Moderate* »). L'approche de métabarcoding a détecté plus du double de taxons et a amélioré la résolution taxonomique quand l'identification morphologique était limitée au niveau de la famille (limnephilidés) ou du genre (*Eloeophila*, hydroptiles et complexe *Baetis*). Cependant, environ 32,5 % ($\pm 9,7$ %) des taxons par échantillon n'ont pas été identifiés par le métabarcoding, pour plusieurs raisons : biais dans les amorces, base de référence incomplète ou mauvaise conservation de l'ADN. Les auteurs de l'étude suggèrent d'utiliser un pourcentage final plus important d'éthanol de qualité pour la biologie moléculaire pour conserver les spécimens sur le terrain et améliorer la qualité de l'ADN global.

8.4 Indices biotiques

8.4.1 Indice moléculaire suisse des diatomées (MDI-CH)

La législation actuelle recommande d'utiliser des diatomées benthiques pour évaluer le statut écologique des rivières et des ruisseaux. Les diatomées ont été choisies pour leur grande sensibilité aux conditions environnementales et parce qu'elles répondent rapidement aux modifications des facteurs physicochimiques et biologiques. Différents pays ont développé des indices biotiques en utilisant des diatomées pour évaluer l'impact environnemental. La plupart de ces indices se fondent sur la fréquence relative des espèces avec une pondération selon leur

valeur autoécologique. En Suisse, l'indice suisse des diatomées (DI-CH) a été proposé pour caractériser le statut biologique des rivières et des ruisseaux en utilisant les fréquences et les distributions de plus de 400 espèces de diatomées et de variétés morphologiques (Hürlimann & Niederhauser, 2007). Le DI-CH se fonde sur des paramètres chimiques indiquant la pollution d'origine anthropogénique et répartit la qualité de l'eau en 5 classes écologiques différentes sur une échelle de 1 à 8. Le calcul suit l'équation de moyenne pondérée, qui comprend une valeur autoécologique D et un facteur de pondération G spécifiques à chaque espèce. Il fait également intervenir un paramètre H qui correspond à la fréquence relative d'un taxon particulier dans l'échantillon. Traditionnellement, le DI-CH et les indices des diatomées des autres pays se calculent sur la base d'une analyse microscopique d'une communauté de diatomées. Les diatomées sont isolées des échantillons de biofilm et les frustules de diatomées, identifiées conformément aux directives (Hürlimann & Niederhauser, 2007), qui précisent notamment les valeurs écologiques et les facteurs de pondération associés à chaque morfo-espèce.

Un indice moléculaire pourrait présenter plusieurs avantages pour les évaluations de routine. Premièrement, l'évaluation de la qualité serait comparable à l'indice morphologique et pourrait donc être facilement utilisée pour compléter la méthode traditionnelle. De plus, comme de nombreux échantillons peuvent être traités simultanément en laboratoire, un indice moléculaire pourrait se révéler très utile pour un inventaire à large échelle. Depuis 2014, plusieurs études ont été menées en Europe pour tester l'utilisation du métabarcoding de l'ADNe afin d'évaluer la composition des communautés de diatomées et calculer les indices de qualité de l'eau (Kermarrec et al., 2014; Zimmerman et al., 2015; Vasselon et al., 2017a; Keck et al., 2018). Les objectifs de ces études consistaient à tester différents marqueurs, à compléter la base de référence et à analyser la corrélation entre les données morphologiques et moléculaires du point de vue de la composition des espèces et/ou de la valeur de l'indice de qualité de l'eau. La Suisse développe actuellement un indice moléculaire suisse des diatomées (MDI-CH), dont les premiers résultats sont très prometteurs (Visco et al., 2015; Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2017). Les études en cours élargissent la portée géographique des localités échan-

tionnées en analysant des données de diatomées des campagnes NAWA SPEZ et NAWA TREND (OFEV, 2013), également via le programme Interreg européen SYNAQUA (Lefrançois et al., 2017) et en collaboration avec les cantons suisses, des bureaux de conseil en environnement et des chercheurs français de l'Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE).

8.4.2 Indice oligochètes génétique de bio-indication des sédiments

Les sédiments représentent une composante essentielle des écosystèmes des rivières et des lacs. Ils sont par ailleurs en mesure de stocker certains types de contaminants. Certains polluants peuvent atteindre des concentrations suffisantes pour engendrer des effets néfastes sur les organismes benthiques et ainsi perturber le bon fonctionnement de l'écosystème. Les oligochètes sont de bons indicateurs biologiques de la qualité des sédiments, car ils sont limités à ce compartiment, présentent une faible mobilité ainsi qu'un mode trophique de collecteur essentiellement, avec ingestion de sédiments fins. De plus, ce groupe inclut un nombre important d'espèces présentant des sensibilités très variées à la pollution (Rodriguez & Reynoldson, 2011) et, de manière générale, les oligochètes sont abondamment présents dans les sédiments (Vivien et al., 2014). Plusieurs indices biologiques basés sur l'étude de la structure des communautés d'oligochètes ont été développés pour l'évaluation de la qualité biologique des sédiments des ruisseaux et des lacs. On mentionnera parmi eux l'indice oligochètes de bio-indication des sédiments (IOBS), qui permet d'évaluer la qualité biologique des sédiments fins/sablonneux dans les ruisseaux (norme AFNOR, NF T90-393 2016) et l'indice oligochètes de bio-indication lacustre (IOBL), qui décrit à la fois l'état de fonctionnement et la qualité biologique des sédiments (norme AFNOR, NF T90-393 2016). L'indice IOBS est utilisé depuis dix ans en Suisse dans le cadre de programmes d'observation de la qualité des ruisseaux et ponctuellement également (Vivien et al., 2014, 2015a). De plus, les communautés d'oligochètes ont, ces dernières décennies, régulièrement fait l'objet d'études en Suisse dans le but d'évaluer la qualité biologique des sédiments lacustres. Cependant, l'utilisation de ces indices oligochètes nécessite une solide expertise en matière de taxonomie des oligochètes. Il s'ensuit que le

développement d'un indice fondé sur l'identification des oligochètes par l'intermédiaire de codes-barres génétiques permettrait de résoudre les problèmes liés à l'identification des espèces et d'accroître l'utilisation des oligochètes comme indicateurs biologiques.

Un projet visant à développer des indices oligochètes génétiques est mené en Suisse depuis 2013. Il a permis de créer une base de référence contenant les codes-barres ADN des oligochètes aquatiques sur la base d'une analyse de spécimens récoltés en Suisse (Vivien et al., 2015b). Outre le développement de bases de référence, on notera que les approches de métabarcoding de l'ADN ont été appliquées pour évaluer la qualité des sédiments en utilisant des oligochètes. Malgré des différences significatives entre les approches morphologiques et moléculaires concernant la présence/l'absence et l'abondance des taxons, les études préliminaires montrent qu'il est possible de développer de telles approches en adaptant le calcul de l'indice et la définition des catégories de qualité (Vivien et al., 2016, 2019). Une autre méthode fondée sur le barcoding haut débit des oligochètes a été validée dans le cadre du programme Interreg SYNAQUA (Lefrançois et al., 2017). Cette méthode a l'avantage d'évaluer de façon fiable et exacte l'abondance des espèces sur un site. Les diagnostics de qualité biologique établis respectivement par des approches morphologiques et moléculaires concordaient sur tous les sites testés (Ruisseau et al., Vivien et al., 2019).

9 Conclusions et perspectives

La détection d'ADN d'espèces spécifiques dans des échantillons environnementaux et l'extensibilité des technologies utilisant le métabarcoding sont en passe de transformer radicalement la surveillance de la biodiversité et les méthodes d'évaluation biologique. Les technologies et techniques de détection décrites dans les présentes directives recèlent des avantages considérables par comparaison avec les approches classiques. Le principal avantage d'une approche fondée sur l'ADNe est de pouvoir identifier et surveiller un large éventail d'organismes, qui s'étend pratiquement des microbes jusqu'aux plantes et aux animaux. Il devient ainsi possible d'intégrer et de mieux déterminer les groupes d'indicateurs biologiques « classiques » utilisés pour le suivi de la biodiversité ou l'évaluation biologique, mais pas seulement : ces nouvelles approches offrent également des perspectives d'utilisation pour des groupes jusqu'alors sous-exploités, voire ignorés, pour ce même objectif. Les groupes très diversifiés comme les diptères et les oligochètes, qui posent des problèmes d'identification morphologique au niveau de l'espèce, sont très largement laissés de côté par les approches classiques, et ce bien qu'ils puissent fournir des informations complémentaires très précieuses sur l'état de la biodiversité et de l'écosystème. Les technologies d'ADNe peuvent permettre de tirer pleinement parti des informations fournies par ces groupes. De plus, les technologies que le présent document décrit peuvent potentiellement être (semi-)automatisées, un avantage parfois déjà exploité. L'utilisation de robots de laboratoire, les progrès rapides des technologies de séquençage et la possibilité de regrouper l'échantillonnage ADNe et l'échantillonnage habituel de l'eau destiné aux analyses chimiques pourraient permettre de fournir davantage de données, à un rythme plus soutenu et pour un prix moindre.

Un autre avantage essentiel s'appliquant à toutes les approches ADNe décrites ici est le caractère non invasif de l'échantillonnage pour les organismes macrobiens de grande taille, dont la présence peut être déduite à partir des traces d'ADN que ceux-ci diffusent dans l'environnement. Pouvoir détecter ces organismes dans l'environnement sans les capturer ni leur nuire est particulièrement important, d'une part, pour les espèces rares ou menacées et, d'autre part, dans les cas où l'échantillonnage est restreint ou soulève des problèmes éthiques.

Ce point concerne en particulier les poissons, les batraciens et d'autres vertébrés pour qui l'échantillonnage classique rime souvent avec manipulation directe, voire mise à mort, ce qu'on souhaite en principe éviter. Il est très avantageux de pouvoir récolter les mêmes informations ou des informations similaires sur l'occurrence de ces espèces sur la base d'un échantillon environnemental.

De plus, utiliser des échantillons d'ADNe pour évaluer la biodiversité ou comme bio-indicateurs permet de répartir le travail : l'échantillonnage sur le terrain dépend moins de technologies ou d'infrastructures spécifiques, et les personnes l'effectuant peuvent être formées relativement facilement. Il peut ainsi être réalisé directement par les parties prenantes, à la suite de quoi les échantillons d'ADNe sont stockés et transportés à des laboratoires moléculaires spécialisés. Ces laboratoires sont alors en mesure de traiter de manière centralisée une grande quantité d'échantillons dans des conditions hautement standardisées. Cette façon de procéder peut permettre, d'autant plus que le processus d'échantillonnage est en principe plus rapide, de prélever davantage d'échantillons, dans les dimensions tant spatiales que temporelle. Augmenter la couverture spatiale de l'échantillonnage améliore la résolution des données de biodiversité et l'efficacité de sa gestion.

Cependant, bien que la « nouvelle génération » de surveillance et d'évaluation biologiques utilisant des outils fondés sur l'ADNe ouvre la voie à de nombreuses possibilités novatrices, elle pose également certains défis. Par exemple, les approches ADNe décrites dans le présent document sont basées sur des biotechnologies qui évoluent et progressent rapidement. Dans une période de développement et de transition, comme c'est le cas actuellement, il n'est pas aisé de définir et d'arrêter des standards appelés à durer. Il faut s'attendre à ce que les évolutions méthodologiques aient une incidence sur certaines recommandations formulées dans le présent document.

Certains des problèmes liés aux approches ADNe ne pourront probablement pas être résolus en raison de la nature même de l'ADNe. Par exemple, l'ADNe ne fournit aucune information sur la structure démographique, sur l'âge ou sur la santé des individus, ni sur le statut (mort ou vivant) des organismes au moment de l'échantillonnage. De plus, en raison de différents facteurs biologiques et techniques, il est difficile de déduire le nombre d'organismes (donc l'abondance) à partir des données de métabarcoding. Bien qu'un lien entre le nombre de séquences et la biomasse ou l'abondance ait pu être établi pour certaines espèces de poissons, il n'existe encore aucun outil d'analyse universel qui fournirait des données quantitatives fiables sur l'abondance. Toutefois, ce dernier point pourrait être résolu, en particulier pour les approches s'intéressant à des espèces cibles.

Par rapport aux approches classiques, les données générées par les approches ADNe peuvent varier tant du point de vue de la qualité que de la quantité. Elles fournissent des informations d'un autre genre, qui ne sont pas nécessairement meilleures ou moins bonnes que celles obtenues par les approches classiques, mais souvent complémentaires. Il est important de ne pas brider les nouvelles approches en répétant les limitations de la méthodologie classique. Par exemple, bien que le métabarcoding d'échantillons mixtes fournisse des données sur la biodiversité assez directement comparables à celles de l'échantillonnage par filet troubleau classique, cette approche est limitée par le temps nécessaire à l'échantillonnage par filet troubleau et l'obtention d'un échantillon mixte nécessite des étapes de tri. Dans le cas des données dérivées de l'ADNe, les points de données individuels impliquent une plus grande incertitude et doivent être interprétés dans une perspective plus probabiliste que déterministe. Différents outils statistiques peuvent être nécessaires pour interpréter ces données (p.ex. statistique bayésienne), qui requièrent également une meilleure compréhension des faux positifs et des faux négatifs, ou de l'origine de tels résultats. Si de nombreuses recherches sont en cours à ce titre, il n'existe globalement pas de méthode de quantification de l'incertitude pour les techniques fondées sur des observations passées. Par ailleurs, du point de vue des dimensions spatiales et temporelle, les échelles et les conclusions sont potentiellement différentes. L'ADNe reflète des proprié-

tés régionales (au niveau d'un bassin versant) plutôt que locales. Selon l'environnement échantillonné, les échantillons pourraient être prélevés à une résolution temporelle bien plus élevée.

Pour terminer, les technologies ADNe ne sont pas destinées à remplacer les approches classiques, mais à exploiter au maximum leur potentiel pour améliorer et étendre la surveillance biologique. Par exemple, le métabarcoding génère d'énormes quantités de données de séquençage qui ne peuvent être attribuées à aucun taxon connu, mais qui contiennent des informations écologiques importantes. Il est actuellement possible, en se servant d'outils d'intelligence artificielle tels que l'apprentissage automatique supervisé, de comparer ces jeux de données contenant des séquences non attribuées à des bases de référence listant des millions de séquences dont le statut écologique est connu. Ce type d'analyse présente un avantage considérable, de deux manières : non seulement il tient compte de la présence ou de l'absence d'une espèce et de son abondance relative, mais il inclut également des analyses de réseau fournissant des informations sur les liens entre les différentes espèces et leur réponse à des variables environnementales.

De manière générale, les avantages sont convaincants et les nouvelles opportunités compensent largement les difficultés rencontrées. Les auteurs du présent document sont donc certains que la surveillance et l'évaluation biologiques comprendront des approches ADNe à l'avenir. Ils espèrent que le présent document facilitera la compréhension des méthodes fondées sur l'ADNe et contribuera à leur diffusion et à leur utilisation.

10 Protocoles d'échantillonnage

10.1 ADNe issu d'échantillons d'eau

Le présent protocole a été développé pour une campagne d'échantillonnage ADNe du programme NAWA TREND 2018/2019 pour les petits ruisseaux et les rivières. Il doit être considéré comme un guide pour la filtration manuelle des échantillons d'eau afin d'obtenir l'ADNe. Fondé sur les bonnes pratiques, ce protocole assure un certain équilibre entre les différents aspects du terrain. De manière générale, des procédures de travail propres doivent être suivies afin de réduire autant que possible les contaminations croisées. De plus, pour garantir que ce protocole fournisse de bons résultats, il faut maintenir les échantillons d'ADNe au froid.

Remarque: Ce protocole peut être modifié pour l'étape de filtration en utilisant une pompe à vide. Ce procédé est particulièrement recommandé en cas de gros volume d'eau ou d'un grand nombre d'échantillons.

Matériel

Pour chaque site d'échantillonnage :

- 2 x seringue 50 ml stérile à usage unique ;
- 4 x filtre Sterivex ;
- 8 x capuchon Luer-Lock ;
- 2 x sachet refermable par glissière.

Matériel supplémentaire sur le terrain :

- 1 l d'eau déionisée ou distillée et scalpel stérile pour les contrôles négatifs ;
- stylo indélébile pour le marquage ;
- glacière avec éléments réfrigérants pour stocker les échantillons d'ADNe durant le travail de terrain ;

- gants ;
- sac à déchets.

Protocole d'échantillonnage sur le terrain

1. Mettez des gants.



2. Sortez une seringue neuve de son emballage.



3. Déballez également un filtre Sterivex.



4. Prélevez un échantillon au bord de l'eau. Évitez de rentrer dans le cours d'eau afin de prévenir toute contamination croisée et tout brassage des sédiments. Choisissez un site représentatif et prélevez l'échantillon à environ 30 cm de distance de la rive. Effectuez le prélèvement à environ 5 cm sous la surface de l'eau.



5. Remplissez la seringue directement avec l'eau du cours d'eau, en veillant à prélever exactement 50 ml sans inclure de bulles d'air. Si des bulles se forment, tenez la seringue embout vers le haut et faites-les sortir.



6. Vissez complètement le filtre Sterivex sur la seringue.



7. Poussez l'eau avec un flux continu à travers le filtre. Il est conseillé de tenir le filtre afin d'éviter de le perdre s'il devait tomber.



8. Retirez le filtre Sterivex de la seringue.



9. Répétez les opérations 5 à 8 fois, jusqu'à avoir filtré 500 ml d'eau. En fonction des particules des sédiments, il n'est pas toujours possible de filtrer 500 ml d'eau avec un seul filtre. Il est important dans ce cas de prendre note du volume filtré.

10. Retirez le filtre Sterivex de la seringue, puis remplissez-la d'air. Vissez la seringue sur le filtre Sterivex.



11. Poussez l'air avec un flux continu à travers le filtre afin d'éliminer l'eau présente dans le boîtier du filtre.

Avant de faire sortir l'air : Après avoir fait sortir l'air :



12. Remettez la seringue dans son emballage d'origine.



13. Fermez le boîtier du filtre des deux côtés à l'aide des capuchons Luer-Lock.



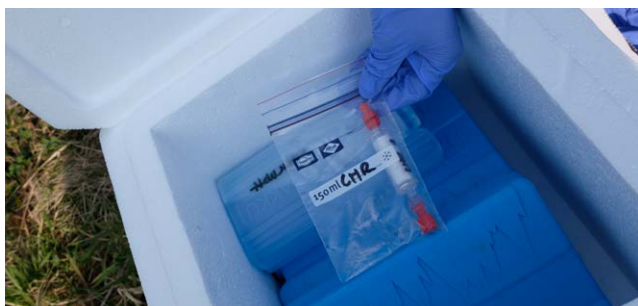
14. Marquez le filtre Sterivex fermé avec un identifiant unique.



15. Placez le boîtier du filtre dans le sachet refermable par glissière et marquez le sachet contenant l'échantillon en indiquant sur quelle rive le prélèvement a été effectué.



16. Placez le sachet refermable par glissière dans la glacière.



17. Prenez note du volume filtré.

18. Munissez-vous d'un deuxième filtre Sterivex et répétez les opérations 4 à 14 avec la même seringue.

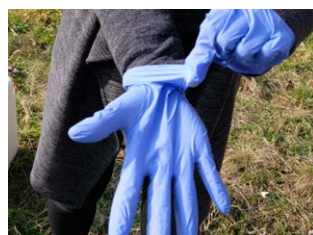


19. Placez le deuxième filtre Sterivex dans le sachet refermable par glissière contenant déjà le premier filtre Sterivex. Fermez correctement le sachet, puis placez-le dans la boîte réfrigérante.



20. Répétez les étapes 2 à 19 sur l'autre rive de la rivière. Pour réduire les contaminations, l'ADNe doit être échantillonné en amont de l'endroit où la personne effectuant le prélèvement a marché.

21. Prenez note du volume filtré et jetez les gants.



22. Une fois le travail de terrain terminé, les sachets contenant les filtres doivent être stockés à -20°C jusqu'à l'extraction.

Échantillonnage d'ADNe sur le terrain comme contrôle négatif (également appelé « blanc de terrain »)

Suivez le même protocole que celui décrit ci-avant pour les échantillons d'ADNe. Cependant, au lieu de prélever de l'eau de rivière, utilisez de l'eau déionisée ou distillée pour la filtration, en prenant soin de porter une nouvelle paire de gants. Le contrôle négatif devrait être ouvert uniquement sur le site où sont effectués les prélèvements. Si la seringue ne passe pas dans le goulot du conteneur, celui-ci peut être ouvert à l'aide d'un scalpel stérile.



10.2 Sédiments

Matériel (à usage unique)

- Gants
- Seringue 50 ml
- Coupelle en plastique
- Agitateur en plastique
- Tube 50 ml



Remarque : l'extrémité de la seringue doit être coupée avant l'échantillonnage. Utilisez pour ce faire un couteau aiguisé ou une scie nettoyé(e) à l'hypochlorite de sodium. Veillez à décontaminer la seringue coupée en l'exposant pendant une heure à la lumière UV avant de procéder à l'échantillonnage.

Remarque : ce protocole a été créé pour les sédiments fins. Il se peut qu'il ne soit pas idéal pour les sédiments grossiers. Dans un tel cas, raclez la couche de surface des sédiments avec une cuillère stérile et placez-la dans la coupelle en plastique. Si vous effectuez un carottage, répétez l'échantillonnage trois fois.

Protocole

1. Après avoir retiré le piston de la seringue, enfoncez la seringue dans les sédiments jusqu'à la marque des 50 ml.



2. Remettez le piston de la seringue dans la seringue et poussez pour faire sortir l'air résiduel. Sortez ensuite la seringue des sédiments. La carotte de sédiments doit rester dans la seringue : soyez prudent à cette étape, car des sédiments grossiers pourraient tomber.



3. Il peut être important de retirer les sédiments de surface pour éviter de récolter du phytobentos. Poussez pour faire les sédiments jusqu'à la marque des 20 ml



4. Poussez pour faire tomber 10 ml de sédiments dans la coupelle en plastique, puis rincez la seringue dans la rivière.



5. Répétez les étapes 1 à 4 à différents endroits de la rivière.
6. Mélangez tous les sédiments récoltés à l'aide de l'agitateur en plastique, puis versez-les dans le tube de 50 ml.



7. Inscrivez une référence sur le tube, puis congelez-le à -20°C . Indiquez la méthode d'échantillonnage que vous avez utilisée (carottage ou raclage).

10.3 Biofilm

Matériel (à usage unique)

- Brosses à dents
- Assiette en plastique
- Pipettes stériles
- 3 x tubes 2 ml avec tampon de conservation de l'ADN
- Sachet refermable par glissière



Remarque : la procédure d'échantillonnage est basée sur le module diatomées publié par l'OFEV (Hürlimann & Niederhauser, 2007). Les exigences s'appliquant à l'échantillonnage morphologique valent également pour les applications moléculaires.

Remarque : pour chaque site d'échantillonnage, trois échantillons sont prélevés (répétitions), puis transférés dans trois tubes d'échantillonnage.

Remarque : le matériel d'échantillonnage doit être jeté après utilisation. Il y a lieu d'employer du nouveau matériel d'échantillonnage pour chaque site d'échantillonnage. Les mêmes galets peuvent être utilisés pour les analyses à la fois morphologiques et moléculaires.

Protocole

1. Mouillez la brosse à dents en la trempant dans l'eau de la rivière.
2. Récoltez 3 à 5 galets selon la procédure d'échantillonnage du module diatomées (Hürlimann & Niederhauser 2007), en veillant à utiliser des matériaux jetables.



3. Raclez la surface des galets au-dessus de l'assiette en plastique à l'aide d'une brosse à dents à usage unique.



4. Récoltez environ 1 ml du biofilm à l'aide de la pipette et transférez-le dans un tube préparé contenant un tampon de conservation. Répétez cette étape trois fois sur chaque site d'échantillonnage.



5. Inscrivez une référence sur le tube, puis complétez la liste en y inscrivant les détails de l'échantillon.
6. Placez les tubes dans le sachet refermable par glissière et conservez-les à -20°C .

11 Bonnes pratiques et documentation des procédures pour les approches ADNe

Les éléments listés ci-après comprennent les principaux aspects pertinents à considérer pour garantir que les parties prenantes puissent reproduire la procédure ADNe pour la détection d'espèces cibles et pour le metabarcoding. Ces éléments correspondent à des normes minimales généralement acceptées pour assurer une utilisation et une application comparables des approches ADNe. Les listes d'éléments sont conçues spécifiquement pour aider les praticiens et les parties prenantes à identifier les aspects importants dont il faut tenir compte pour le suivi de la biodiversité et l'évaluation biologique fondées sur l'ADNe.

Échantillonnage

Les éléments suivants constituent des lignes directrices essentielles qui doivent être suivies par toute personne effectuant un échantillonnage ADNe (très probablement les praticiens eux-mêmes).

- Les personnes prélevant des échantillons d'ADNe doivent avoir suivi une formation spécifique.
- La méthode d'échantillonnage (p. ex. précipitation, filtration, volume échantillonné, échantillonnage mixte) et tout le matériel d'échantillonnage (type de filtre, etc.) doivent être bien documentés.
- L'utilisation de consommables jetables (p. ex. gants, filtres à usage unique, brosses à dents à usage unique pour récolter les diatomées) doit être explicitement indiquée et il convient de faire une différence entre ces consommables et le matériel réutilisable.
- Les procédures de nettoyage pour l'équipement à usage multiple doivent être clarifiées et documentées. Les procédures de nettoyage doivent éliminer/décomposer l'ADN. L'utilisation de l'éthanol seul ne suffit pas. Les objets doivent être complètement recouverts d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à une concentration minimale de 1,5 % de NaOCl pendant au moins 1 minute, puis rincés avec de l'eau exempte d'ADN pour éliminer toute trace d'hypochlorite de sodium. Il est également

possible d'utiliser un traitement par rayons UV ou des solutions commerciales telles que «DNA away» ou d'autres produits similaires.

- Il est impératif de fournir une description détaillée du site d'échantillonnage, qui inclura les coordonnées géographiques et la profondeur de l'eau.
- Des contrôles négatifs adéquats doivent être effectués sur le terrain et analysés durant tout le flux des travaux de laboratoire.
- Il y a lieu de garantir la conservation des échantillons (chaîne de congélation continue ou utilisation de solutions tampons appropriées) et de documenter les détails de la conservation.

Configuration du laboratoire

La configuration des laboratoires effectuant des tâches liées à l'ADNe doit être soumise à une certification. Le laboratoire moléculaire concerné doit être conforme à la norme ISO 17025 ou à une norme équivalente. De plus, dans le cas d'une analyse ADNe, il faut porter une attention particulière aux éléments listés ci-après.

- Pour garantir une haute qualité pour les analyses ADNe, le laboratoire dans lequel l'ADNe est extrait puis analysé doit être configuré conformément aux bonnes pratiques. Il doit notamment disposer de pièces et d'équipements spéciaux utilisés spécifiquement pour l'extraction d'ADNe ainsi que pour les étapes antérieures et postérieures à la PCR, comme indiqué au chapitre 5.
- Les produits et les équipements utilisés pour manipuler des produits en aval de la PCR (p. ex. des pipettes), ne doivent jamais entrer dans le laboratoire propre. Le flux des travaux doit être unidirectionnel, tant pour les produits que pour le personnel.
- Dans l'idéal, le laboratoire présentera une pression de l'air positive afin de refouler toute contamination. Pour prévenir toute contamination, l'air entrant dans le labo-

ratoire propre à travers les systèmes de ventilation doit être filtré (p. ex. filtre HEPA).

- Les parois et les meubles du laboratoire doivent être faciles à nettoyer (p. ex. avec de l'hypochlorite de sodium ou d'autres substances décomposant l'ADN; l'éthanol seul ne suffit pas) et le nettoyage doit être effectué régulièrement.
- Le personnel de laboratoire travaillant dans le laboratoire propre doit porter des vêtements de protection pour éviter de contaminer les échantillons.
- Il est préférable de réaliser l'ensemble des tâches sous hotte afin de protéger les échantillons contre les contaminations.
- Des équipements de laboratoire séparés (pipettes, table de travail stérile, etc.) ainsi que des espaces clairement associés à la tâche concernée doivent être utilisés pour préparer des réactifs exempts d'ADN tels que des aliquotes d'amorces et d'autres produits chimiques.

Travaux de laboratoire moléculaire

Comme le domaine de l'ADNe et les technologies associées évoluent rapidement, il est essentiel de dresser des rapports exacts. La liste ci-après présente les points importants dont il faut tenir compte.

- Il y a lieu de fournir des protocoles de laboratoire détaillés pour chaque étape, de l'extraction d'ADNe au séquençage, y compris les amorces PCR utilisées et les conditions PCR, ou alors d'indiquer la référence des protocoles utilisés.
- Des contrôles négatifs et positifs doivent être inclus et leurs résultats, indiqués.
- Un niveau de validation (www.edna-validation.com) doit être fourni pour les tests spécifiques à une espèce.
- Le nombre de réplicats techniques et leur traitement doivent être indiqués.
- Doivent également être indiqués les caractéristiques de la plate-forme de séquençage ainsi les paramètres spécifiques du séquençage.
- Le stockage à long terme des extraits d'ADNe et d'autres produits résultant d'analyses moléculaires doit faire l'objet d'une convention spécifique.

Traitement et stockage des données

Il y a lieu de discuter avec les clients et les sous-traitants de tous les aspects liés au traitement et au stockage des données et d'en définir clairement les modalités par contrat.

- On pourra demander au sous-traitant de fournir les éléments suivants ou de les rendre disponibles dans des bases de données ouvertes au public :
 - l'ensemble des données de séquençage brutes (résultats obtenus avec le séquenceur, sans aucune modification);
 - les données de séquençage filtrées (après traitement bio-informatique);
 - un tableau des OTU/ASV mentionnant les fréquences relatives (après attribution taxonomique).
- Le rapport portant sur les données de séquençage doit inclure :
 - une référence ou de la documentation sur la chaîne de traitement bio-informatique utilisée pour l'analyse des données de séquençage et, en particulier, les paramètres et les seuils utilisés pour la filtration des données de séquençage;
 - une référence sur la base de données utilisée pour l'attribution taxonomique;
 - de la documentation sur les analyses statistiques et l'interprétation de leurs résultats.

Glossaire

Adaptateur

Ensemble de courtes séquences nucléotidiques attachées à des séquences ADN durant le processus de séquençage à haut débit. Les adaptateurs sont utilisés pour identifier les séquences d'ADN appartenant à chaque échantillon au cours de l'analyse bio-informatique.

ADN environnemental (ADNe, *sensu lato*):

Ensemble de matériel génomique provenant d'organismes vivants ou de traces laissées par ceux-ci (p. ex. peau, cellules, mucus, écailles, urine, excréments, salives, gamètes ou restes d'individus morts) présents dans des environnements variés tels que l'eau, les sédiments, le sol ou l'air.

Amorce

Courte séquence d'ADN simple brin utilisée pour répliquer l'ADN durant la PCR. On utilise en général une paire d'amorces bordant la région à répliquer par la polymérase.

Amplicon

Fragment d'ADN amplifié par PCR.

Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Procédé générant des copies d'une séquence définie d'ADN à l'aide d'une polymérase.

Apprentissage automatique supervisé

Technique de modélisation statistique utilisant un jeu de données entièrement annoté, c'est-à-dire qui comprend à la fois des étiquettes de référence (valeurs des indices biotiques ou statut de qualité écologique) et des caractéristiques (variables et distribution des OTU) pour établir un modèle prédictif sur la base d'un algorithme d'apprentissage automatique. Le modèle obtenu par apprentissage est utilisé pour prédire les étiquettes de nouveaux échantillons sur la base de la distribution de leurs caractéristiques.

Attribution taxonomique

Identification taxonomique des séquences d'ADN fondée sur des bases de référence.

Base de référence

Collection de séquences d'ADN chacune liée à un spécimen identifié par morphologie et, idéalement, stockée dans des collections de musées. Les bases de référence servent à réaliser l'attribution taxonomique des séquences d'ADN obtenues à partir d'ADNe ou d'échantillons mixtes.

Chimère

Séquence génomique artéfactuelle créée au cours de l'amplification PCR par combinaison de fragments d'ADN de différentes origines.

Clustering

Regroupement de séquences sur la base d'un seuil de similarité fixe ou d'une autre méthode générant des OTU (voir ci-dessous).

Code-barres ADN

Courte séquence d'ADN d'un marqueur génétique permettant d'identifier des espèces.

Contamination

Présence d'ADN étranger qui ne proviennent pas de l'échantillon.

Contrôle négatif

Opération destinée à dépister d'éventuelles contaminations survenues lors de l'échantillonnage sur le terrain, de l'extraction d'ADN et/ou de la PCR.

Échantillon mixte

Échantillon comprenant des organismes entiers et leurs fragments, issus de l'environnement et récoltés manuellement (p. ex. un échantillon obtenu par filet troubleau).

Espèce cryptique

Espèce qu'il est impossible de différencier à partir des caractères morphologiques.

Extraction d'ADN

Processus de laboratoire comprenant des étapes physiques et chimiques, dont l'objectif est de libérer et de purifier de l'ADN à partir de cellules ou d'autres éléments.

Inhibiteur de PCR

Facteur entravant voire empêchant l'amplification d'ADN durant la PCR par interaction avec la matrice ADN, l'enzyme polymérase ou d'autres cofacteurs utilisés dans la PCR.

Librairie

Collection de fragments d'ADN préparés pour le séquençage à haut débit (HTS). Des adaptateurs spécifiques sont ligués à chaque extrémité des fragments d'ADN.

Marqueur génétique

Région d'ADN génomique (p.ex. fragment du gène COI, région V9 du gène de l'ARN ribosomique 18S) permettant d'identifier des espèces au sein d'un groupe taxonomique spécifique.

Métabarcoding

Approche d'identification des espèces d'un échantillon complexe (p.ex. ADNe ou échantillon mixte) fondée sur les amplicons produits par séquençage à haut débit (HTS).

Métacode-barres

Séquence résultant du métabarcoding et produite par séquençage à haut débit d'amplicons.

Mitochondrie

Organelle présente dans la plupart des organismes eucaryotes et utilisée dans le métabolisme énergétique cellulaire. Les gènes mitochondriaux évoluent plus rapidement que le génome nucléaire, raison pour laquelle ils sont souvent utilisés comme des codes-barres ADN (p.ex. COI, 16S ou 12S).

Multiplexage

Approche consistant à effectuer une amplification PCR simultanée de différents marqueurs ou un séquençage de différents échantillons afin d'optimiser le flux des travaux moléculaires.

PCR numérique (aussi appelée PCR digitale) (dPCR)

Technique PCR qui divise l'échantillon en des milliers de partitions. Une réaction PCR se produit dans chaque partition et la réussite de l'amplification est détectée par fluorescence.

PCR quantitative (qPCR)

Approche permettant de quantifier des produits ADN au cours de l'amplification en chaîne par polymérase sur la base de l'intensité de la fluorescence. Le signal fluorescent peut être produit soit par liaison d'un marqueur non spécifique à l'ADN double brin soit par une sonde spécifique. Le signal fluorescent s'intensifie au fur et à mesure que l'ADN s'accumule. Il est ensuite quantifié par comparaison avec le signal produit par une quantité connue d'ADN.

Polymérase

Enzyme synthétisant les molécules d'ADN durant la PCR en répliquant une séquence d'ADN existante.

Précipitation d'ADN

Technique qui concentre l'ADN présent dans une solution aqueuse par ajout de sels et d'éthanol à la solution et qui fait se déposer l'ADN (le précipite).

Répétition (aussi appelée réplicat ou échantillon répétitif)

Nouvelle réalisation de l'échantillonnage ou de l'amplification PCR destinée à évaluer la variabilité de la méthode et à vérifier la cohérence des résultats obtenus.

Séquençage à haut débit (HTS)

Méthode, également appelée séquençage nouvelle génération (NGS), qui produit des milliers de séquences d'ADN par des technologies de séquençage massivement parallèle.

Séquençage par la méthode Sanger

Méthode de séquençage d'ADN à faible débit mais de haute qualité couramment utilisée pour le barcoding de spécimens uniques.

Seuil

Valeur la plus faible acceptée pour un critère de qualité spécifique, utilisée au cours de nombreuses étapes du traitement bio-informatique destiné à nettoyer les données HTS.

Solution de conservation

Composé ajouté aux échantillons pour la conservation à long terme (p.ex. éthanol).

Sonde PCR

ADN simple brin conçu pour se lier à une région d'intérêt située dans le fragment amplifié. Au cours de l'amplification, la polymérase décompose la sonde et libère un fluorochrome émetteur attaché à la sonde, ce qui génère une émission de fluorescence quantifiable.

Unité taxonomique opérationnelle (*operational taxonomic units*, OTU)

Cluster de séquences regroupées en fonction de leur similarité, considéré comme représentatif d'espèces moléculaires.

Variant de séquences d'amplicon (*amplicon sequence variants*, ASV)

Séquence d'ADN individuelle produite par séquençage à haut débit d'amplicons après élimination des fausses séquences générées au cours de l'amplification et du séquençage PCR.

Bibliographie

Adrian-Kalchhauser I. & Burkhardt-Holm P. (2016): An eDNA Assay to Monitor a Globally Invasive Fish Species from Flowing Freshwater. – PLoS ONE 11 : e0147558. (en anglais)

AFNOR. (2016): NF T90-393 | Qualité de l'eau – Échantillonnage, traitement et analyse des oligochètes dans les sédiments des eaux de surface continentales | Norm'Info.

Agersnap S., Larsen W. B., Knudsen S. W., Strand D., Thomsen P. F., Hesselsøe M., Mortensen P. B., Vrålstad T., & Møller P. R. (2017): Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. – PLoS ONE 12 : e0179261. (en anglais)

Aird D., Ross M. G., Chen W.-S., Danielsson M., Fennell T., Russ C., Jaffe D. B., Nusbaum C., & Gnirke A. (2011): Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. – Genome Biology 12 : R18. (en anglais)

Altermatt F., Little C.J., Mächler E., Wang S., Zhang X., & Blackman R.C. (2020). Uncovering the complete biodiversity structure in spatial networks – the example of riverine systems. – Oikos 129: 607-618.

Amberg J. J., Grace McCalla S., Monroe E., Lance R., Baerwaldt K., & Gaikowski M. P. (2015): Improving efficiency and reliability of environmental DNA analysis for silver carp. – Journal of Great Lakes Research 41 : 367-373. (en anglais)

Apothéloz-Perret-Gentil L., Cordonier A., Straub F., Ise-
li J., Esling P., & Pawlowski J. (2017): Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. – Molecular Ecology Resources 17(6): 1231-1242. (en anglais)

Baker C. S., Steel D., Nieukirk S., & Klinck H. (2018): Environmental DNA (eDNA) From the Wake of the Whales: Droplet Digital PCR for Detection and Species Identification. – Front. Mar. Sci. 5 : 133. (en anglais)

Barnes M. A. & Turner C. R. (2016): The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. – Conserv Genet 17 : 1-17. (en anglais)

Bass D., Stentiford G. D., Littlewood D. T. J., & Hartikainen H. (2015): Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. – Trends Parasitol. 31 : 499-513. (en anglais)

Beentjes K. K., Speksnijder A. G. C. L., Schilthuisen M., Schaub B. E. M., & van der Hoorn B. B.. (2018): The influence of macroinvertebrate abundance on the assessment of freshwater quality in The Netherlands. – Metabarcoding and Metagenomics 2 : e26744. (en anglais)

Benateau S., Gaudard A., Stamm C., & Altermatt F. (2019): Climate change and freshwater ecosystems. Impacts on water quality and ecological status. – Office fédéral de l'environnement (OFEV), Berne. Hydro-CH2018 Project: 110 pp. (en anglais)

Berney C., Fahrni J., & Pawlowski J. (2004): How many novel eukaryotic 'kingdoms'? Pitfalls and limitations of environmental DNA surveys. – BMC Biology 2 : 13. (en anglais)

Biggs J., Ewald N., Valentini A., Gaboriaud C., Dejean T., Griffiths R. A., Foster J., Wilkinson J. W., Arnell A., Brotherton P., Williams P., & Dunn F. (2015): Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). – Biological Conservation 183 : 19-28. (en anglais)

Birk S., Bonne W., Borja A., Brucet S., Courrat A., Poikane S., Solimini A., van de Bund W., Zampoukas N., & Hering D. (2012): Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. – Ecological Indicators 18 : 31-41. (en anglais)

- Bista I., Carvalho G. R., Walsh K., Seymour M., Hajibabaei M., Lallias D., Christmas M., & Creer S. (2017): Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. – *Nature Communications* 8: 14087. (en anglais)
- Blackman R. C., Constable D., Hahn C., Sheard A. M., Durkota J., Haenfling B., & Lawson Handley L. (2017): Détection of a new non-native freshwater species by DNA metabarcoding of environmental samples – first record of *Gammarus fossarum* in the UK. – *Aquatic Invasions* 12: 177-189. (en anglais)
- Blackman R. C., Mächler E., Altermatt F., Arnold A., Beja P., Boets P., Egeter B., Elbrecht V., Filipe A. F., Jones J. I., Macher J., Majaneva M., Martins F. M. S., Múrria C., Meissner K., Pawlowski J., Yáñez P. L. S., Zizka V. M. A., Leese F., Price B., & Deiner K. (2019): Advancing the use of molecular methods for routine freshwater macroinvertebrate biomonitoring – the need for calibration experiments. – *Metabarcoding and Metagenomics* 3: e34735. (en anglais)
- Buchner D., Beermann A. J., Laini A., Rolauffs P., Vitecek S., Hering D., & Leese F. (2019): Analysis of 13,312 benthic invertebrate samples from German streams reveals minor deviations in ecological status class between abundance and presence/absence data (F. Frontalini, éd.). – *PLoS ONE* 14: e0226547. (en anglais)
- Bureau de coordination du MDB. (2014): Rapport méthodologique du MBD. Description des méthodes et indicateurs. Office fédéral de l'environnement, Berne. Connaissance de l'environnement n° 1410. 107 pp. Office fédéral de l'environnement (OFEV), Berne.
- Buxton A., Groombridge J., & Griffiths R. (2018): Comparison of Two Citizen Scientist Methods for Collecting Pond Water Samples for Environmental DNA Studies. – *Citizen Science: Theory and Practice* 3: 2. (en anglais)
- Bylemans J., Furlan E. M., Hardy C. M., McGuffie P., Lintermans M., & Gleeson D. M. (2017): An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). – *Methods in Ecology and Evolution* 8: 64-655. (en anglais)
- Callahan B. J., McMurdie P. J., & Holmes S. P. (2017): Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. – *The ISME Journal* 11: 2639-2643. (en anglais)
- Cannon M. V., Hester J., Shalkhauser A., Chan E. R., Logue K., Small S. T., & Serre D. (2016): *In silico* assessment of primers for eDNA studies using PrimerTree and application to characterize the biodiversity surrounding the Cuyahoga River. – *Scientific Reports* 6: 22908. (en anglais)
- Carew M. E., Pettigrove V. J., Metzeling L., & Hoffmann A. A. (2013): Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. – *Frontiers in Zoologie* 10: 45. (en anglais)
- Carim K. J., McKelvey K. S., Young M. K., Wilcox T. M., & Schwartz M. K. (2016): A protocol for collecting environmental DNA samples from streams. – Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-355. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 18 pp. (en anglais)
- Carraro L., Hartikainen H., Jokela J., Bertuzzo E., & Rinaldo A. (2018): Estimating species distribution and abundance in river networks using environmental DNA. – *PNAS* 115: 11724-11729. (en anglais)
- Carraro L., Mächler E., Wüthrich R., & Altermatt F. (2020) Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. – *Nature Communications* 11: 3585.
- Charvoz L. (2019): Monitoring and detection of invasive newt *Lissotriton vulgaris meridionalis* in Geneva's south bank ponds (Université de Genève). – Mémoire de maîtrise. Consulté sur <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:118872> (en anglais)

-
- Civade R., Dejean T., Valentini A., Roset N., Raymond J.-C., Bonin A., Taberlet P., & Pont D. (2016): Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. – PLoS ONE 11: e0157366. (en anglais)
- Clusa L., Ardura A., Gower F., Miralles L., Tsartsianidou V., Zaiko A., & Garcia-Vazquez E. (2016): An Easy Phylogenetically Informative Method to Trace the Globally Invasive *Potamopyrgus* Mud Snail from River's eDNA. – PLoS ONE 11: e0162899. (en anglais)
- Clusa L., Miralles L., Basanta A., Escot C., & García-Vázquez E. (2017): eDNA for detection of five highly invasive molluscs. A case study in urban rivers from the Iberian Peninsula. – PLoS ONE 12: e0188126. (en anglais)
- Cowart D. A., Renshaw M. A., Gantz C. A., Umek J., Chandra S., Egan S. P., Lodge D. M., & Larson E. R. (2018): Development and field validation of an environmental DNA (eDNA) assay for invasive clams of the genus *Corbicula*. – Management of Biological Invasions 9: 27-37. (en anglais)
- Craine J. M., Henson M. W., Thrash J. C., Hanssen J., Spooner G., Fleming P., Pukonen M., Stahr F., Spaulding S., & Fierer N. (2018): Environmental DNA reveals the structure of phytoplankton assemblages along a 2900-km transect in the Mississippi River. – bioRxiv 261727. (en anglais)
- Cruickshank S. S., Bühler C., & Schmidt B. R. (2019): Quantifying data quality in a citizen science monitoring program: False negatives, false positives and occupancy trends. – Conservation Science and Practice: e54. (en anglais)
- Danielopol D. L., Pospisil P., & Rouch R. (2000): Biodiversity in groundwater: a large-scale view. – Trends in Ecology & Evolution 15: 223-224. (en anglais)
- De Souza L. S., Godwin J. C., Renshaw M. A., & Larson E. (2016): Environmental DNA (eDNA) Detection Probability Is Influenced by Seasonal Activity of Organisms. – PLoS ONE 11: e0165273. (en anglais)
- De Ventura L., Kopp K., Seppälä K., & Jokela J. (2017): Tracing the quagga mussel invasion along the Rhine river system using eDNA markers: early detection and surveillance of invasive zebra and quagga mussels. – MBI 8: 101-112. (en anglais)
- Deagle B. E., Bax N., Hewitt C. L., & Patil J. G. (2003): Development and evaluation of a PCR-based test for detection of *Asterias* (Echinodermata: Asteroidea) larvae in Australian plankton samples from ballast water. – Mar. Freshwater Res. 54: 709-719. (en anglais)
- Deiner K. & Altermatt F. (2014): Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. – PLoS ONE 9: e88786. (en anglais)
- Deiner K., Bik H. M., Mächler E., Seymour M., Lacoursière-Roussel A., Altermatt F., Creer S., Bista I., Lodge D. M., de Vere N., Pfrender M. E., & Bernatchez L. (2017): Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. – Molecular Ecology 26: 5872-5895. (en anglais)
- Deiner K., Fronhofer E. A., Mächler E., Walser J.-C., & Altermatt F. (2016): Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. – Nature Communications 7: 12544. (en anglais)
- Deiner K., Lopez J., Bourne S., Holman L., Seymour M., Grey E. K., Lacoursière A., Li Y., Renshaw M. A., Pfrender M. E., Rius M., Bernatchez L., & Lodge D. M. (2018): Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method. – Metabarcoding and Metagenomics 2: e28963. (en anglais)
- Deiner K., Walser J.-C., Mächler E., & Altermatt F. (2015): Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. – Biological Conservation 183: 53-63. (en anglais)
- Doi H., Uchii K., Takahara T., Matsushashi S., Yamanaka H., & Minamoto T. (2015): Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. – PLoS ONE 10: e0122763. (en anglais)

- Dougherty M. M., Larson E. R., Renshaw M. A., Gantz C. A., Egan S. P., Erickson D. M., & Lodge D. M. (2016): Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. – *Journal of Applied Ecology* 53: 722-732. (en anglais)
- Dubey S., Dufresnes C. & Rameier P. (2019): Détermination de la distribution du triton crêté italien invasif (*Triturus carnifex*) dans le secteur de Bâle par le biais d'analyses génétiques. Hintermann & Weber AG, Montreux. – Rapport final. 16 pp.
- Dufresne Y., Lejzerowicz F., Apothéloz-Perret-Gentil L., Pawlowski J., & Cordier T. (2019): SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. – *BMC Bioinformatics* 20: 88. (en anglais)
- Dunn N., Priestley V., Herraiz A., Arnold R., & Savolainen V. (2017): Behavior and season affect crayfish detection and density inference using environmental DNA. – *Ecology and Evolution* 7: 777-7785. (en anglais)
- Eckert K. A. & Kunkel T. A. (1991): DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. – *PCR Methods Appl.* 1: 17-24. (en anglais)
- Egan S. P., Barnes M. A., Hwang C.-T., Mahon A. R., Feder J. L., Ruggiero S. T., Tanner C. E., & Lodge D. M. (2013): Rapid Invasive Species Detection by Combining Environmental DNA with Light Transmission Spectroscopy. – *Conservation Letters* 6: 402-409. (en anglais)
- Egan S. P., Grey E., Olds B., Feder J. L., Ruggiero S. T., Tanner C. E., & Lodge D. M. (2015): Rapid Molecular Detection of Invasive Species in Ballast and Harbor Water by Integrating Environmental DNA and Light Transmission Spectroscopy. – *Environ. Sci. Technol.* 49: 4113-4121. (en anglais)
- 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: e0130324. (en anglais)
- Elbrecht V. & Leese F. (2017): Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. – *Front. Environ. Sci.* 5: 11. (en anglais)
- Elbrecht V., Vamos E. E., Meissner K., Aroviita J., & Leese F. (2017): Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. – *Methods in Ecology and Evolution* 8(10): 1265-1275. (en anglais)
- Erickson R. A., Merkes C. M., Jackson C. A., Goforth R. R., & Amberg J. J. (2017): Seasonal trends in eDNA detection and occupancy of bigheaded carps. – *Journal of Great Lakes Research* 43: 762-770. (en anglais)
- Esling P., Lejzerowicz F., & Pawlowski J. (2015): Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing. – *Nucleic Acids Res.* 43: 2513-2524. (en anglais)
- Evans N. T., Olds B. P., Renshaw M. A., Turner C. R., Li Y., Jerde C. L., Mahon A. R., Pfreder M. E., Lamberti G. A., & Lodge D. M. (2016): Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. – *Molecular Ecology Resources* 16: 29-41. (en anglais)
- Fahner N. A., Shokralla S., Baird D. J., & Hajibabaei M. (2016): Large-Scale Monitoring of Plants through Environmental DNA Metabarcoding of Soil: Recovery, Resolution, and Annotation of Four DNA Markers. – *PLoS ONE* 11: e0157505. (en anglais)
- Fernández S., Rodríguez S., Martínez J. L., Borrell Y. J., Ardura A., & García-Vázquez E. (2018): Evaluating freshwater macroinvertebrates from eDNA metabarcoding: A river Nalón case study. – *PLoS ONE* 13: e0201741. (en anglais)
- Fernández S., Rodríguez-Martínez S., Martínez J. L., García-Vázquez E., & Ardura A. (2019): How can eDNA contribute in riverine macroinvertebrate assessment? A metabarcoding approach in the Nalón River (Asturias, Northern Spain). – *Environmental DNA* 1: 385-401. (en anglais)

- Ficetola G. F., Miaud C., Pompanon F., & Taberlet P. (2008): Species detection using environmental DNA from water samples. – *Biol. Lett.* 4: 423-425. (en anglais)
- Fonseca V. G., Nichols B., Lallias D., Quince C., Carvalho G. R., Power D. M., & Creer S. (2012): Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSU metagenetic analyses. – *Nucleic Acids Res.* 40: e66. (en anglais)
- Frey K. G., Herrera-Galeano J. E., Redden C. L., Luu T. V., Servetas S. L., Mateczun A. J., Mokashi V. P., & Bishop-Lilly K. A. (2014): Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. – *BMC Genomics* 15: 96. (en anglais)
- Fujiwara A., Matsushashi S., Doi H., Yamamoto S., & Minamoto T. (2016): Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds. – *Freshwater Science* 35: 748-754. (en anglais)
- Gantz C. A., Renshaw M. A., Erickson D., Lodge D. M., & Egan S. P. (2018): Environmental DNA detection of aquatic invasive plants in lab mesocosm and natural field conditions. – *Biol Invasions* 20: 2535-2552. (en anglais)
- Geerts A. N., Boets P., Van den Heede S., Goethals P., & Van der heyden C. (2018): A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): a lab and field evaluation. – *Ecological Indicators* 84: 564-572. (en anglais)
- Geiger M. F., Herder F., Monaghan M. T., Almada V., Barbieri R., Bariche M., Berrebi P., Bohlen J., Casal-Lopez M., Delmastro G. B., Denys G. P. J., Dettai A., Doadrio I., Kalogianni E., Kärst H., Kottelat M., Kovačić M., Laporte M., Lorenzoni M., Marčić Z., Özuluğ M., Perdices A., Perea S., Persat H., Porcelotti S., Puzzi C., Robalo J., Šanda R., Schneider M., Šlechtová V., Stoumboudi M., Walter S., & Freyhof J. (2014): Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. – *Molecular Ecology Resources* 14: 1210-1221. (en anglais)
- Geller J., Meyer C., Parker M., & Hawk H. (2013): Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. – *Molecular Ecology Resources* 13: 851-861. (en anglais)
- Gingera T., Bajno R., Docker M., & Reist J. (2017): Environmental DNA as a detection tool for zebra mussels *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) at the forefront of an invasion event in Lake Winnipeg, Manitoba, Canada. – *MBI* 8: 287-300. (en anglais)
- Goldberg C. S., Pilliod D. S., Arkle R. S., & Waits L. P. (2011): Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. – *PLoS ONE* 6: e22746. (en anglais)
- Goldberg C. S., Sepulveda A., Ray A., Baumgardt J., & Waits L. P. (2013): Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). – *Freshwater Science* 32: 792-800. (en anglais)
- Goldberg C. S., Strickler K. M., & Pilliod D. S. (2015): Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. – *Biological Conservation* 183: 1-3. (en anglais)
- Goldberg C. S., Turner C. R., Deiner K., Klymus K. E., Thomsen P. F., Murphy M. A., Spear S. F., McKee A., Oyler-McCance S. J., Cornman R. S., Laramie M. B., Mahon A. R., Lance R. F., Pilliod D. S., Strickler K. M., Waits L. P., Fremier A. K., Takahara T., Herder J. E., & Taberlet P. (2016): Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. – *Methods Ecol Evol* 7: 1299-1307. (en anglais)
- Hajibabaei M., Shokralla S., Zhou X., Singer G. A. C., & Baird D. J. (2011): Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. – *PLoS ONE* 6: e17497. (en anglais)

- Hänfling B., Lawson Handley L., Read D. S., Hahn C., Li J., Nichols P., Blackman R. C., Oliver A., & Winfield I. J. (2016): Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. – *Molecular Ecology* 25: 3101-3119. (en anglais)
- Harper L. R., Buxton A. S., Rees H. C., Bruce K., Brys R., Halfmaerten D., Read D. S., Watson H. V., Sayer C. D., Jones E. P., Priestley V., Mächler E., Múrria C., Garcés-Pastor S., Medupin C., Burgess K., Benson G., Boonham N., Griffiths R. A., Lawson Handley L., & Hänfling B. (2019a): Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. – *Hydrobiologia* 826: 25-41. (en anglais)
- Harper L. R., Lawson Handley L., Carpenter A. I., Ghazali M., Di Muri C., Macgregor C. J., Logan T. W., Law A., Breithaupt T., Read D. S., McDevitt A. D., & Hänfling B. (2019b): Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. – *Biological Conservation* 238: 108225. (en anglais)
- Harper L. R., Lawson Handley L., Hahn C., Boonham N., Rees H. C., Gough K. C., Lewis E., Adams I. P., Brotherton P., Phillips S., & Hänfling B. (2018): Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). – *Ecology and Evolution* 8: 6330-6341. (en anglais)
- Harper L. R., McNeill D. C., & Downie J. R. (2017): The latest chapter in a conservation story: completing 10 years of post-translocation monitoring for a population of great crested newt (*Triturus cristatus*) in Scotland. – *The Glasgow Naturalist* 26: 29-44. (en anglais)
- Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L., & deWaard, J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. – *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 313-321. (en anglais)
- Herder J., Valentini A., Bellemain E., Dejean T., van Delft J. J. C. W., Thomsen P. F., & Taberlet P. (2014): Environmental DNA. A review of the possible applications for the detection of (invasive) species. – Nijmegen: Stichting RAVON, 2013-104. (en anglais)
- Holderegger R., Stapfer A., Schmidt B. R., Grünig C., Meier R., Csencsics D., & Gassner M. (2019): Werkzeugkasten Naturschutzgenetik: eDNA Amphibien und Verbund. Birmensdorf: Eidg. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL 81. 56 pp. (en allemand)
- Hollingsworth P. M., Graham S. W., & Little D. P. (2011): Choosing and Using a Plant DNA Barcode. – *PLoS ONE* 6: e19254. (en anglais)
- Hunter M. E., Dorazio R. M., Butterfield J. S. S., Meigs-Friend G., Nico L. G., & Ferrante J. A. (2017): Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence-absence surveys of environmental DNA. – *Molecular Ecology Resources* 17: 221-229. (en anglais)
- Hürlimann J. & Niederhauser P. (2007): Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau. – Diatomées Niveau R (région). Office fédéral de l'environnement, Berne. État de l'environnement n° 0740: 132 pp.
- Hutchins P. R., Sepulveda A. J., Martin R. M., & Hopper L. R. (2018): Improved Conventional PCR Assay for Detecting *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in Fish Tissues. – *J. Aquat. Anim. Health* 30: 164-170. (en anglais)
- Hyman O. J., & Collins J. P. (2012): Evaluation of a filtration-based method for detecting *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural bodies of water. – *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 185-195. (en anglais)
- Jane S. F., Wilcox T. M., McKelvey K. S., Young M. K., Schwartz M. K., Lowe W. H., Letcher B. H., & Whiteley A. R. (2015): Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. – *Molecular Ecology Resources* 15: 216-227. (en anglais)
- Jerde C. L., Mahon A. R., Chadderton W. L., & Lodge D. M. (2011): "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. – *Conservation Letters* 4: 150-157. (en anglais)

- Kalchhauser I., Mutzner P., Hirsch P. E., & Burkhardt-Holm P. (2013): Arrival of round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) and bighead goby *Ponticola kessleri* (Günther, 1861) in the High Rhine (Switzerland). – BIR 2 : 79-83. (en anglais)
- Känel B., Michel C., & Reichert P. (2017): Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau. Macrophytes – niveau R (région) et niveau C (cours d'eau). Office fédéral de l'environnement, Berne. Projet : 118 pp.
- Keck F., Vasselon V., Rimet F., Bouchez A., & Kahlert M. (2018): Boosting DNA metabarcoding for biomonitoring with phylogenetic estimation of operational taxonomic units' ecological profiles. – Molecular Ecology Resources 18 : 1299-1309. (en anglais)
- Kermarrec L., Franc A., Rimet F., Chaumeil P., Frigerio J.-M., Humbert J.-F., & Bouchez A. (2014): A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. – Freshwater Science 33 : 349-363. (en anglais)
- Keskin E. (2014): Detection of invasive freshwater fish species using environmental DNA survey. – Biochemical Systematics and Ecology 56 : 68-74. (en anglais)
- Kirshtein J. D., Anderson C. W., Wood J. S., Longcore J. E., & Voytek M. A. (2007): Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. – Dis. Aquat. Org. 77 : 11-15. (en anglais)
- Kitano T., Umetsu K., Tian W., & Osawa M. (2007): Two universal primer sets for species identification among vertebrates. – Int. J. Legal Med. 121 : 423-427. (en anglais)
- Klymus K. E., Marshall N. T., & Stepien C. A. (2017): Environmental DNA (eDNA) metabarcoding assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes. – PLoS ONE 12 : e0177643. (en anglais)
- Klymus K. E., Merkes C. M., Allison M. J., Goldberg C. S., Helbing C. C., Hunter M. E., Jackson C. A., Lance R. F., Mangan A. M., Monroe E. M., Piaggio A. J., Stokdyk J. P., Wilson C. C., & Richter C. A. (2019): Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. – Environmental DNA 00 : 1-12. (en anglais)
- Klymus K. E., Richter C. A., Chapman D. C., & Paukert C. (2015): Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. – Biological Conservation 183 : 77-84. (en anglais)
- Kneibelsberger T., Dunz A. R., Neumann D., & Geiger M. F. (2015): Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding. – Molecular Ecology Resources 15 : 562-572. (en anglais)
- Krieg R., Weston A., King A. & Zenker A. (2019a): Aufspüren von Flusskrebspopulationen anhand environmental DNA (eDNA) mittels Wasserproben, Validierung der eDNA Methode und Felddatierungen in ausgewählten Gewässern. Projet national réalisé sur mandat de l'OFEV et des cantons AG, AR, BL, BS, BE, GR, JU, LU, SG, SO, SZ, UR, VD et ZG. – Rapport de projet. 53 pp. (en allemand)
- Krieg, R., Weston, A., King, A., Sieber N., Vorburger C., Hartikainen H. & Zenker A. (2019b): Aufspüren von Nachweis von Wassertierkrankheiten mit Hilfe der sogenannten Umwelt-DNA (eDNA) Methode aus Wasserproben. Entwicklung einer Mehrfachnachweismethode bzw. Erstellen einer Schweizer Risikokarte für Wassertierkrankheiten. Projet national réalisé sur mandat de l'OFEV et des cantons AG, AR, BL, GE, GL, GR, JU, LU, SH, SZ, TI, VD, ZG et ZH. – Rapport de projet. 40 pp. (en allemand)
- Kunz M., Schindler Wildhaller Y., & Dietzel A. (2016): État des cours d'eau suisses. Résultats de l'Observation nationale de la qualité des eaux de surface (NAWA) 2011-2014. Office fédéral de l'environnement, Berne. État de l'environnement n°1620 : 92 pp. (en allemand)
- Küry D., Lubini V., & Stucki P. (2019): Quell-Lebensräume – Anleitung zur systematischen Erfassung und Ermittlung ihrer Bedeutung im Naturschutz. Rapport d'experts réalisé sur mandat de l'Office fédéral de l'environnement (OFEV). (en allemand)

- Kuzmina M. L., Braukmann T. W. A., & Zakharov E. V. (2018): Finding the pond through the weeds: eDNA reveals underestimated diversity of pondweeds. – *Appl Plant Sci* 6 (5): e01155. (en anglais)
- Lanzén A., Lekang K., Jonassen I., Thompson E. M., & Troedsson C. (2017): DNA extraction replicates improve diversity and compositional dissimilarity in metabarcoding of eukaryotes in marine sediments. – *PLoS ONE* 12: e0179443. (en anglais)
- Laramie M. B., Pilliod D. S., Goldberg C. S., & Strickler K. M. (2015): Environmental DNA sampling protocol – filtering water to capture DNA from aquatic organisms. – U. S. Geological Survey Techniques and Methods, Reston, VA. 2-A13. 15 pp. (en anglais)
- Lee D. F., Lu J., Chang S., Loparo J. J., & Xie X. S. (2016): Mapping DNA polymerase errors by single-molecule sequencing. – *Nucleic Acids Res.* 44: e118. (en anglais)
- Leese F., Bouchez A., Abarenkov K., Altermatt F., Borja Á., Bruce K., Ekrem T., Čiampor F., Čiamporová-Zaťová Z., Costa F. O., Duarte S., Elbrecht V., Fontaneto D., Franc A., Geiger M. F., Hering D., Kahlert M., Kalamujić Stroil B., Kelly M., Keskin E., Liska I., Mergen P., Meissner K., Pawlowski J., Penev L., Reyjol Y., Rotter A., Steinke D., van der Wal B., Vitecek S., Zimmermann J., & Weigand A. M. (2018): Chapter Two – Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: A Perspective Derived From the *DNAqua-Net* COST Action. In Bohan D. A., Dumbrell A. J., Woodward G., & Jackson M. (éd.), *Advances in Ecological Research*, pp. 63-99. Next Generation Biomonitoring: Part 1. – Academic Press. (en anglais)
- Lefrançois E., Apothéloz-Perret-Gentil L., Blancher P., Botreau S., Chardon C., Crepin L., Cordier T., Cordonier A., Domaizon I., Ferrari B. J. D., Guéguen J., Hustache J.-C., Jacas L., Jacquet S., Lacroix S., Mazon A.-L., Pawlowska A., Perney P., Pawlowski J., Rimet F., Rubin J.-F., Trevisan D., Vivien R., & Bouchez A. (2018): Development and implementation of eco-genomic tools for aquatic ecosystem biomonitoring: the SYNAQUA French-Swiss program. – *Environ Sci Pollut Res Int* 25: 33858-33866. (en anglais)
- Lejzerowicz F., Esling P., Pillet L., Wilding T. A., Black K. D., & Pawlowski J. (2015): High-throughput sequencing and morphology perform equally well for benthic monitoring of marine ecosystems. *Scientific Reports* 5: 13932. (en anglais)
- Leray M., Yang J. Y., Meyer C. P., Mills S. C., Agudelo N., Ranwez V., Boehm J. T., & Machida R. J. (2013): A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. – *Frontiers in Zoology* 10: 34. (en anglais)
- Lubini V., Stucki P., Vicentini H., & Kury D. (2016): Bewertung von Quell-Lebensräumen in der Schweiz. Entwurf für ein strukturelles und faunistisches Verfahren. – Rapport réalisé sur mandat de l'Office fédéral de l'environnement (OFEV). (en allemand)
- Macher J.-N., Vivancos A., Piggott J. J., Centeno F. C., Matthaei C. D., & Leese F. (2018): Comparison of environmental DNA and bulk-sample metabarcoding using highly degenerate cytochrome c oxidase I primers. – *Molecular Ecology Resources* 18: 1456-1468. (en anglais)
- Mächler E., Deiner K., Steinmann P., & Altermatt F. (2014): Utility of environmental DNA for monitoring rare and indicator macroinvertebrate species. – *Freshwater Science* 33: 1174-1183. (en anglais)
- Mächler E., Little C. J., Wüthrich R., Alther R., Fronhofer E. A., Gounand I., Harvey E., Hürlemann S., Walser J.-C., & Altermatt F. (2019): Assessing different components of diversity across a river network using eDNA. – *Environmental DNA* 1: 290-301. (en anglais)
- Mahon A. R., Jerde C. L., Chadderton W. L., & Lodge D. M. (2011): Using environmental DNA to elucidate the Asian Carp (genus *Hypophthalmichthys*) invasion front in the Chicago Area Waterway System. In *Integrative and Comparative Biology*, pp. E85-E85. – Oxford Univ Press Inc Journals Dept, 2001 Evans Rd, Cary, NC 27513 USA. (en anglais)

- Mahon A. R., Jerde C. L., Galaska M., Bergner J. L., Chaderton W. L., Lodge D. M., Hunter M. E., & Nico L. G. (2013): Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments. – PLoS ONE 8: e58316. (en anglais)
- Mansfeldt C., Deiner K., Mächler E., Fenner K., Eggen R. I. L., Stamm C., Schönenberger U., Walser J.-C., & Altermatt F. (2020): Microbial community shifts in streams receiving treated wastewater effluent. – Science of The Total Environment 709: 135727. 12 pp. (en anglais)
- Martins F. M. S., Galhardo M., Filipe A. F., Teixeira A., Pinheiro P., Paupério J., Alves P. C., & Beja P. (2019): Have the cake and eat it: Optimizing nondestructive DNA metabarcoding of macroinvertebrate samples for freshwater biomonitoring. – Molecular Ecology Resources 19: 863-876. (en anglais)
- Maruyama A., Nakamura K., Yamanaka H., Kondoh M., & Minamoto T. (2014): The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. – PLoS ONE 9: e114639. (en anglais)
- Matsushashi S., Doi H., Fujiwara A., Watanabe S., & Minamoto T. (2016): Evaluation of the Environmental DNA Method for Estimating Distribution and Biomass of Submerged Aquatic Plants. – PLoS ONE 11: e0156217. (en anglais)
- Mauvisseau Q., Coignet A., Delaunay C., Pinet F., Bouchon D., & Souty-Grosset C. (2018): Environmental DNA as an efficient tool for detecting invasive crayfishes in freshwater ponds. – Hydrobiologia 805: 163-175. (en anglais)
- McInerney P., Adams P., & Hadi M. Z. (2014): Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. – Molecular Biology International 2014: 287430. (en anglais)
- Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J. Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Arai H., Kondoh M., & Iwasaki W. (2015): MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. – Royal Society Open Science 2: 150088. (en anglais)
- Monchamp M.-E., Spaak P., Domaizon I., Dubois N., Bouffard D., & Pomati F. (2018): Homogenization of lake cyanobacterial communities over a century of climate change and eutrophication. – Nat Ecol Evol 2: 317-324. (en anglais)
- Nathan L. M., Simmons M., Wegleitner B. J., Jerde C. L., & Mahon A. R. (2014): Quantifying Environmental DNA Signals for Aquatic Invasive Species Across Multiple Detection Platforms. – Environ. Sci. Technol. 48: 12800-12806. (en anglais)
- Nevers M. B., Byappanahalli M. N., Morris C. C., Shively D., Przybyla-Kelly K., Spoljaric A. M., Dickey J., & Roseman E. F. (2018): Environmental DNA (eDNA): A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). – PLoS ONE 13: e0191720. (en anglais)
- OFEV. (2013): NAWA – Observation nationale de la qualité des eaux de surface. Cours d'eau. Office fédéral de l'environnement, Berne. Connaissance de l'environnement n° 1327: 72 p.
- OFEV. (2019a): Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau (IBCH_2019). Macrozoobenthos – niveau R. 1^{ère} édition actualisée 2019; 1^{re} édition 2010. Office fédéral de l'environnement, Berne. L'environnement pratique n° 1026: 58 p.
- OFEV. (2019b): État et évolution des eaux souterraines en Suisse. Résultats de l'Observation nationale des eaux souterraines NAQUA, état 2016. Office fédéral de l'environnement, Berne. État de l'environnement n° 1901: 144 p.
- Pawlowski J., Audic S., Adl S., Bass D., Belbahri L., Berney C., Bowser S. S., Cepicka I., Decelle J., Dunthorn M., Fiore-Donno A. M., Gile G. H., Holzmann M., Jahn R., Jirků M., Keeling P. J., Kostka M., Kudryavtsev A., Lara E., Lukeš J., Mann D. G., Mitchell E. A. D., Nitsche F., Romero M., Saunders G. W., Simpson A. G. B., Smirnov A. V., Spouge J. L., Stern R. F., Stoeck T., Zimmermann J.,

Schindel D., & de Vargas C. (2012): CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. – PLoS Biol. 10: e1001419. (en anglais)

Pawlowski J., Kelly-Quinn M., Altermatt F., Apothé-
loz-Perret-Gentil L., Beja P., Boggero A., Borja A., Bou-
chez A., Cordier T., Domaizon I., Feio M. J., Filipe A. F.,
Fornaroli R., Graf W., Herder J., Hoorn B. van der, Iwan
Jones J., Sagova-Mareckova M., Moritz C., Barquín J.,
Piggott J. J., Pinna M., Rimet F., Rinkevich B., Sousa-San-
tos C., Specchia V., Trobajo R., Vasselon V., Vitecek S.,
Zimmerman J., Weigand A., Leese F., & Kahlert M. (2018):
The future of biotic indices in the ecogenomic era: Inte-
grating (e)DNA metabarcoding in biological assessment
of aquatic ecosystems. – Sci. Total Environ 637-638:
1295-1310. (en anglais)

Pedersen M. W., Overballe-Petersen S., Ermini L., Sarkis-
sian C. D., Haile J., Hellstrom M., Spens J., Thomsen P. F.,
Bohmann K., Cappellini E., Schnell I. B., Wales N. A.,
Carøe C., Campos P. F., Schmidt A. M. Z., Gilbert M. T. P.,
Hansen A. J., Orlando L., & Willerslev E. (2015): Ancient
and modern environmental DNA. – Philosophical Tran-
sactions of the Royal Society B: Biological Sciences 370:
20130383. (en anglais)

Piaggio A. J., Engeman R. M., Hopken M. W., Hum-
phrey J. S., Keacher K. L., Bruce W. E., & Avery M. L.
(2014): Detecting an elusive invasive species: a diagnos-
tic PCR to detect Burmese python in Florida waters and
an assessment of persistence of environmental DNA.
– Molecular Ecology Resources 14: 374-380. (en anglais)

Piñol J., Mir G., Gomez-Polo P., & Agustí N. (2015): Uni-
versal and blocking primer mismatches limit the use of
high-throughput DNA sequencing for the quantitative
metabarcoding of arthropods. – Molecular Ecology
Resources 15: 819-830. (en anglais)

Pont D., Rocle M., Valentini A., Civade R., Jean P., Maire A.,
Roset N., Schabuss M., Zornig H., & Dejean T. (2018):
Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish
biodiversity in large rivers despite its downstream trans-
portation. – Scientific Reports 8: 1-13. (en anglais)

Potapov V. & Ong J. L. (2017): Examining Sources of Error
in PCR by Single-Molecule Sequencing. – PLoS ONE 12:
e0169774. (en anglais)

Preissler K., Watzal A. D., Vences M., & Steinfartz S.
(2019): Detection of elusive fire salamander larvae (*Sala-
mandra salamandra*) in streams via environmental DNA.
– Amphibia-Reptilia 40: 55-64. (en anglais)

Quail M. A., Smith M., Coupland P., Otto T. D., Harris S. R.,
Connor T. R., Bertoni A., Swerdlow H. P., & Gu Y. (2012):
A tale of three next generation sequencing platforms:
comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illu-
mina MiSeq sequencers. – BMC Genomics 13: 341. (en
anglais)

Rees H. C., Bishop K., Middleditch D. J., Patmore J. R. M.,
Maddison B. C., & Gough K. C. (2014b): The application
of eDNA for monitoring of the Great Crested Newt in the
UK. – Ecol Evol 4: 4023-4032. (en anglais)

Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J.,
Patmore, J. R. M., & Gough K. C. (2014a). REVIEW: The
detection of aquatic animal species using environmental
DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. Jour-
nal of Applied Ecology 51(5): 1450-1459. (en anglais)

Reid A. J., Carlson A. K., Creed I. F., Eliason E. J., Gell P. A.,
Johnson P. T. J., Kidd K. A., MacCormack T. J., Olden J. D.,
Ormerod S. J., Smol J. P., Taylor W. W., Tockner K., Ver-
maire J. C., Dudgeon D., & Cooke S. J. (2019): Emerging
threats and persistent conservation challenges for
freshwater biodiversity. – Biological Reviews 94: 849-
873. (en anglais)

Riascos L., Geerts A. N., Oña T., Goethals P., Ceval-
los-Cevallos J., Vanden Berghe W., Volckaert F. A. M.,
Bonilla J., Muylaert K., Velarde E., Boets P., & Van der
heyden C. (2018): DNA-based monitoring of the alien
invasive North American crayfish *Procambarus clarkii* in
Andean lakes (Ecuador). – Limnologia 70: 20-25. (en
anglais)

- Riaz T., Shehzad W., Viari A., Pompanon F., Taberlet P., & Coissac E. (2011): ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. – *Nucleic Acids Res* 39: e145. (en anglais)
- Rimet F., Gusev E., Kahlert M., Kelly M. G., Kulikovskiy M., Maltsev Y., Mann D. G., Pfannkuchen M., Trobajo R., Vaselon V., Zimmermann J., & Bouchez A. (2019): Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. – *Sci Rep* 9: 1-12. (en anglais)
- Robinson C. V., Uren Webster T. M., Cable J., James J., & Consuegra S. (2018): Simultaneous detection of invasive signal crayfish, endangered white-clawed crayfish and the crayfish plague pathogen using environmental DNA. – *Biological Conservation* 222: 241-252. (en anglais)
- Rocchi S., Tisserant M., Valot B., Laboissière A., Frosard V., & Reboux G. (2016): Quantification of *Saprolegnia parasitica* in river water using real-time quantitative PCR: from massive fish mortality to tap drinking water. – *International journal of environmental health research* 27(1): 1-10. (en anglais)
- Rodriguez P. & Reynoldson T. B. (2011): *The Pollution Biology of Aquatic Oligochaetes*. – Springer Netherlands. (en anglais)
- Sales N. G., McKenzie M. B., Drake J., Harper L. R., Browett S.S., Coscia I., Wangenstein O. S., Baillie C., Bryce E., Dawson D. A., Ochu E., Hänfling B., Handley L. L., Mariani S., Lambin X., Sutherland C., & McDevitt A. D. (2019): Fishing for mammals: landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from lotic ecosystems. – *bioRxiv*: 629758. (en anglais)
- Sansom B. J. & Sassoubre L. M. (2017): Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates to Model Freshwater Mussel eDNA Transport in a River. – *Environ. Sci. Technol.* 51: 14244-14253. (en anglais)
- Schager E. & Peter A. (2004): *Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau en Suisse: Poissons* niveau R. Stucki P. (2010): *Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau en Suisse: Macrozoobenthos*. – niveau R. Office fédéral de l'environnement, Berne. *L'environnement pratique* n° 1026: 61 pp.
- Schenk J., Geisen S., Kleinboelting N., & Traunspurger W. (2019): Metabarcoding data allow for reliable biomass estimates in the most abundant animals on earth. – *Metabarcoding and Metagenomics* 3: e46704. (en anglais)
- Schneider J., Valentini A., Dejean T., Montarsi F., Taberlet P., Glaizot O., & Fumagalli L. (2016): Detection of Invasive Mosquito Vectors Using Environmental DNA (eDNA) from Water Samples. – *PLoS ONE* 11: e0162493. (en anglais)
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium, & Fungal Barcoding Consortium Author List. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 6241-6246. (en anglais)
- Scriver M., Marinich A., Wilson C., & Freeland J. (2015): Development of species-specific environmental DNA (eDNA) markers for invasive aquatic plants. – *Aquatic Botany* 122: 27-31. (en anglais)
- Seymour M., Durance I., Cosby B. J., Ransom-Jones E., Deiner K., Ormerod S. J., Colbourne J. K., Wilgar G., Carvalho G. R., Bruyn M. de, Edwards F., Emmett B. A., Bik H. M., & Creer S. (2018): Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. – *Communications Biology* 1: 4. (en anglais)
- Sigsgaard E. E., Carl H., Møller P. R., & Thomsen P. F. (2015): Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. – *Biological Conservation* 183: 46-52. (en anglais)
- Smart A. S., Tingley R., Weeks A. R., Rooyen A. R. van, & McCarthy M. A. (2015): Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. – *Ecological Applications* 25: 1944-1952. (en anglais)

- Sohlberg E., Bomberg M., Miettinen H., Nyssönen M., Salavirta H., Vikman M., & Itävaara M. (2015): Revealing the unexplored fungal communities in deep groundwater of crystalline bedrock fracture zones in Olkiluoto, Finland. – *Front Microbiol* 6: 573. (en anglais)
- Stoeckle B. C., Kuehn R., & Geist J. (2016): Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? – *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 26: 1120-1129. (en anglais)
- Strand D. A., Jussila J., Johnsen S. I., Viljamaa-Dirks S., Edsman L., Wiik-Nielsen J., Viljugrein H., Engdahl F., & Vrålstad T. (2014): Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. – *Journal of Applied Ecology* 51: 544-553. (en anglais)
- Strickler K. M., Fremier A. K., & Goldberg C. S. (2015): Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. – *Biological Conservation* 183: 85-92. (en anglais)
- Stucki P. (2010): Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau en Suisse: Macrozoobenthos. – niveau R. Office fédéral de l'environnement, Berne. L'environnement pratique n° 1026: 61 pp.
- Taberlet P., Bonin A., Coissac E., & Zinger L. (2018): Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. – Oxford University Press. (en anglais)
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A., Vermat T., Corthier G., Brochmann C., & Willerslev E. (2007): Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. – *Nucleic Acids Res* 35: e14. (en anglais)
- Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H., & Kawabata Z. (2012): Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. – *PLoS ONE* 7: e35868. (en anglais)
- Thomsen P. F., & Willerslev E. (2015): Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. – *Biological Conservation* 183: 4-18. (en anglais)
- Thomsen P. F., Kielgast J., Iversen L. L., Møller P. R., Rasmussen M., & Willerslev E. (2012): Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. – *PLoS ONE* 7: e41732. (en anglais)
- Tréguier A., Paillisson J.-M., Dejean T., Valentini A., Schlaepfer M. A., & Roussel J.-M. (2014): Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. – *Journal of Applied Ecology* 51: 871-879. (en anglais)
- Tsuji S., Takahara T., Doi H., Shibata N., & Yamanaka H. (2019): The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. – *Environmental DNA* 1: 99-108. (en anglais)
- Turner C. R., Barnes M. A., Xu C. C. Y., Jones S. E., Jerde C. L., & Lodge D. M. (2014): Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. – *Methods in Ecology and Evolution* 5: 676-684. (en anglais)
- US Fish and Wildlife Service. (2019): Quality assurance project plan. eDNA monitoring of bighead and silver carps. (en anglais)
- Ushio M., Fukuda H., Inoue T., Makoto K., Kishida O., Sato K., Murata K., Nikaido M., Sado T., Sato Y., Takeshita M., Iwasaki W., Yamanaka H., Kondoh M., & Miya M. (2017): Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. – *Molecular Ecology Resources* 17: e63-e75. (en anglais)
- Valentini A., Taberlet P., Miaud C., Civade R., Herder J., Thomsen P. F., Bellemain E., Besnard A., Coissac E., Boyer F., Gaboriaud C., Jean P., Poulet N., Roset N., Copp G. H., Geniez P., Pont D., Argillier C., Baudoin J.-M., Peroux T., Crivelli A. J., Olivier A., Acqueberge M., Le Brun M., Møller P. R., Willerslev E., & Dejean T. (2016): Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. – *Mol. Ecol.* 25: 929-942. (en anglais)

Vasselon V., Domaizon I., Rimet F., Kahlert M., & Bouchez A. (2017b): Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter? – *Freshwater Science* 36: 162-177. (en anglais)

Vasselon V., Rimet F., Tapolczai K., & Bouchez A. (2017a): Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France). – *Ecological Indicators* 82: 1-12. (en anglais)

Visco J. A., Apothéloz-Perret-Gentil L., Cordonier A., Esling P., Pillet L., & Pawlowski J. (2015): Environmental Monitoring: Inferring the Diatom Index from Next-Generation Sequencing Data. – *Environ. Sci. Technol.* 49: 7597-7605. (en anglais)

Vivien R., Apothéloz-Perret-Gentil L., Pawlowski J., Werner I., & Ferrari B. J. D. (2019): Testing different (e)DNA metabarcoding approaches to assess aquatic oligochaete diversity and the biological quality of sediments. – *Ecological Indicators* 106: 105453. (en anglais)

Vivien R., Apothéloz-Perret-Gentil L., Pawlowski P., Werner I., Lafont M., & Ferrari B. J. D. (2020): High-throughput DNA barcoding of oligochaetes for abundance-based indices to assess the biological quality of sediments in streams and lakes. – *Scientific Reports* 10(1): 2041 (en anglais)

Vivien R., Ferrari B. J. D., & Pawlowski J. (2016): DNA barcoding of formalin-fixed aquatic oligochaetes for biomonitoring. – *BMC Res Notes* 9(1): 342. (en anglais)

Vivien R., LaFont M., & Ferrari B. J. D. (2015a): Utilisation des communautés d'oligochètes pour l'évaluation de la qualité biologique et du fonctionnement des cours d'eau: un bilan à partir de données genevoises (Suisse). – *Archives des Sciences* 68: 105-116.

Vivien R., Lejzerowicz F., & Pawlowski J. (2016): Next-Generation Sequencing of Aquatic Oligochaetes: Comparison of Experimental Communities. – *PLoS ONE* 11: e0148644. (en anglais)

Vivien R., Tixier G., & Lafont M. (2014): Use of oligochaete communities for assessing the quality of sediments in watercourses of the Geneva area (Switzerland) and Artois-Picardie basin (France): proposition of heavy metal toxicity thresholds. – *Ecohydrology & Hydrobiology* 14: 142-151. (en anglais)

Vivien R., Wyler S., Lafont M., & Pawlowski J. (2015b): Molecular Barcoding of Aquatic Oligochaetes: Implications for Biomonitoring. – *PLoS ONE* 10: e0125485. (en anglais)

Wangensteen O. S., Palacín C., Guardiola M., & Turon X. (2018): DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. – *PeerJ* 6: e4705. (en anglais)

Weigand A. M. & Macher J.-N. (2018): A DNA metabarcoding protocol for hyporheic freshwater meiofauna: Evaluating highly degenerate COI primers and replication strategy. – *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e26869. (en anglais)

Weigand H., Beermann A. J., Čiampor F., Costa F. O., Csabai Z., Duarte S., Geiger M. F., Grabowski M., Rimet F., Rulik B., Strand M., Szucsich N., Weigand A. M., Willassen E., Wyler S. A., Bouchez A., Borja A., Čiamporová-Zaťovičová Z., Ferreira S., Dijkstra K.-D. B., Eisendle U., Freyhof J., Gadawski P., Graf W., Haegerbaeumer A., van der Hoorn B. B., Japoshvili B., Keresztes L., Keskin E., Leese F., Macher J. N., Mamos T., Paz G., Pešić V., Pfannkuchen D. M., Pfannkuchen M. A., Price B. W., Rinkevich B., Teixeira M. A. L., Várbró G., & Ekrem T. (2019): DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. – *Science of The Total Environment* 678: 499-524. (en anglais)

Williams M. R., Stedtfeld R. D., Engle C., Salach P., Fakher U., Stedtfeld T., Dreelin E., Stevenson R. J., Latimore J., & Hashsham S. A. (2017): Isothermal amplification of environmental DNA (eDNA) for direct field-based monitoring and laboratory confirmation of *Dreissena* sp. – *PLoS ONE* 12: e0186462. (en anglais)

Winding A., Bang-Andreasen T., Hansen L. H., Panitz F., Krogh P. H., Krause-Jensen D., Stæhr P. A., Nicolaisen M., Hendriksen N. B., Sapkota R., Santos S., & Andersen L. W. (2019): eDNA in environmental monitoring. (en anglais)

Wüthrich R. & Altermatt F. (2019): Aquatische Monitoringprogramme NAWA und BDM. Synergien, Strategien und Visionen. Office fédéral de l'environnement (OFEV), Berne. 88 pp. (en allemand)

Zimmermann J., Glöckner G., Jahn R., Enke N., & Gemeinholzer B. (2015): Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. – *Molecular Ecology Resources* 15: 526-542. (en anglais)

Zizka V. M. A., Leese F., Peinert B., & Geiger M. F. (2019): DNA metabarcoding from sample fixative as a quick and voucher-preserving biodiversity assessment method 1. – *Genome* 62: 122-136. (en anglais)