



PROJET META-IBD

INDICE BIOLOGIQUE DIATOMEES :

EVALUATION DE LA MISE EN ROUTINE DE LA METHODE DE
METABARCODING, A L'ECHELLE LOCALE (SUD-OUEST DE LA
FRANCE)

NOTE DE SYNTHÈSE

2021-2023



Table des matières

1	Contexte et objectifs du projet	4
2	Rôle des partenaires	4
3	Résultats synthétiques du projet.....	5
3.1	Mise en routine de la méthode de metabarcoding aux LPL	5
3.1.1	Transfert de méthode	5
3.1.2	Optimisation de la méthode.....	6
3.1.3	Ce qu'il faut retenir	7
3.1.4	Axes d'amélioration et questions soulevées	8
3.2	Evaluation de l'applicabilité de la base de référence Diat.Barcode à l'échelle locale	8
3.2.1	Comparaison des listes taxonomiques : locale vs Diat.Barcode	8
3.2.2	Liste des causes de divergence entre les deux méthodes.....	9
3.2.3	Ce qu'il faut retenir	11
3.2.4	Question soulevée	11
3.3	Etude comparative méthode de référence vs metabarcoding	12
3.3.1	Sur la pertinence de l'IBD.....	12
3.3.2	Sur la corrélation des notes IBD	13
3.3.3	Sur les classes de qualité.....	14
3.3.4	Sur la composition des peuplements.....	14
3.3.5	Ce qu'il faut retenir	15
4	Synthèse et questions soulevées	15

1 Contexte et objectifs du projet

Meta-IBD est un projet de recherche appliquée, financé par l'Agence de l'Eau Adour Garonne et mené par les Laboratoires des Pyrénées et des Landes, laboratoire de mesure et d'analyses (chef de file), Artemis, bureau d'études spécialiste en phycologie (études des algues), et Scimabio Interface, notamment spécialisée dans les approches ADN diatomées et le transfert opérationnel. D'une durée de 2 ans, l'objectif est d'évaluer, sur la base d'un test grandeur nature à l'échelle locale, si la méthode de metabarcoding développée sur les IBD par INRAE est fonctionnelle en conditions de routine, par comparaison avec les résultats obtenus avec la méthode de référence (microscopie).

Plus précisément, les actions visaient à :

- Etablir les listes taxonomiques de diatomées sur le bassin Adour Garonne par méthode de référence,
- Comparer ces listes à celles obtenues par metabarcoding par utilisation de la base de référence Diat.Barcode, et à en évaluer l'impact sur les indices IBD,
- Comparer les résultats de calculs de classes de qualité obtenus avec les deux méthodes,
- Evaluer si la méthode complète est fonctionnelle en conditions de routine.

2 Rôle des partenaires

Laboratoires des Pyrénées et des Landes

- Coordination et pilotage scientifique, administratif et financier du projet
- Récepteur de la méthode de metabarcoding sur ADNe, appliquée aux IBD
- Mise en routine de la méthode et optimisation
- Analyse des échantillons par metabarcoding sur ADNe jusqu'au rendu des listes taxonomiques à Artemis
- Analyses, synthèse et valorisation des données du projet

Scimabio-Interface

- Transfert de la méthode et formation/conseil (laboratoire + bioinformatique) vers LPL
- Analyses statistiques des données d'intercomparaison pour l'évaluation du transfert
- Analyses, synthèse et valorisation des données du projet

Artemis

- Echantillonnage des biofilms pour les deux méthodes et transfert des échantillons dédiés aux LPL
- Traitement des échantillons par la méthode de référence (microscopie)
- Détermination des IBD à partir des listes taxonomiques fournies par LPL
- Analyse des raisons de divergences des notes IBD entre les deux méthodes
- Analyses, synthèse et valorisation des données du projet

La force de ce consortium reposait sur la diversité des compétences de chacun et donc de leur parfaite complémentarité. Ainsi étaient représenté chaque maillon de la chaîne permettant la mise en place d'une nouvelle méthode en routine, à savoir (i) Scimabio Interface, structure compétente ayant la compréhension des deux méthodes sur les plans opérationnels et scientifiques et donc capable de transférer la méthode de metabarcoding en parfaite adéquation avec la méthode morphologique, (ii) LPL, laboratoire dont le cœur de métier est l'analyse, possédant les compétences techniques et scientifiques, l'équipement et l'expérience pour recevoir la méthode de metabarcoding et la rendre opérationnelle, et (iii) Artemis, spécialisé dans l'évaluation de la qualité biologique *via* l'IBD par méthode morphologique, pouvant apporter à la fois son expertise scientifique sur la taxonomie et également son expérience et ses connaissances sur l'aspect opérationnel de la méthode de microscopie.

3 Résultats synthétiques du projet

3.1 Mise en routine de la méthode de metabarcoding aux LPL

3.1.1 Transfert de méthode

Scimabio Interface avait pour mission le transfert de la méthode de metabarcoding vers LPL, laboratoire d'analyses. Le transfert d'une méthode de recherche vers un laboratoire de routine implique plusieurs étapes afin de s'assurer que cette méthode est mise en œuvre de manière fiable et efficace. L'organisme de transfert joue donc un rôle crucial dans le processus, pour garantir le succès de la transition de la recherche vers l'opérationnel. Ces étapes clés étaient (i) de transmettre les éléments indispensables à la mise en place technique et scientifique au laboratoire incluant les protocoles, les formations techniques et notamment bioinformatiques, le conseil et le suivi tout au long de la mise en place, (ii) d'évaluer les performances de l'analyse transférée, par rapport à des critères établis et attendus, sur la base des éléments fournis par LPL, (iii) et enfin de confirmer le succès du transfert par une intercomparaison basée sur des analyses conduites en parallèle par les deux structures et validée par Scimabio

Interface, garant des conclusions quant à la réussite de la mise en routine de la méthode de metabarcoding aux LPL.

Ainsi, lors de ce transfert de compétence, les LPL ont mis en place en interne les adaptations et procédures utiles à la mise en routine de la méthode transférée et ont également mis à point la partie de séquençage proprement dite (préparation des librairies et séquençage MiSeq (Illumina), non transférée par Scimabio car généralement sous-traitée en plate-forme de séquençage. Les protocoles sont disponibles en libre accès (voir liens internet en fin de document).

La méthode ainsi mise en place a été testée à l'aide d'un panel d'échantillons connus et calibrés, fournis par Artemis (panel des deux bassins du sud-ouest) et par Scimabio Interface (panel utilisé dans le cadre d'un exercice d'intercalibration européen). Les données obtenues par LPL ont été intégrées par Scimabio Interface dans le jeu de données d'intercalibration afin d'évaluer les performances et les critères attendues. Les résultats ont montré que les données obtenues par LPL s'intégraient de manière homogène dans le jeu de données européen et que les performances étaient donc satisfaisantes. Le transfert technique et bioinformatique s'est donc déroulé sans difficultés.

3.1.2 Optimisation de la méthode

Afin de répondre aux exigences d'analyses de routine, LPL a procédé à une optimisation des protocoles sur deux étapes : (i) l'extraction de l'ADN total et (ii) la partie bioinformatique dédiée à l'assignation à la base de référence Diat.Barcode.

La partie extraction a été optimisée de manière à obtenir de l'ADN quantifiable dans un souci de contrôle qualité. Pour cela, une étape de sonication du biofilm, associée à une automatisation de l'extraction proprement dite (automate extracteur), a été ajoutée et a permis d'atteindre l'objectif.

Concernant la partie bioinformatique, deux stratégies bioinformatiques (Dada2 et Mothur), rendant des résultats similaires pour des calculs IBD diatomées metabarcoding, ont été transférées et comparées. Pour des raisons de facilité d'implémentation aux LPL, l'approche via Mothur a été retenue. L'approche bioinformatique appliquée via ce logiciel implique le regroupement des séquences en fonction de leur similarité génétique sous forme de paquets de séquence appelés OTU (Operational Taxonomic Unit). La méthode de création des OTU a été conservée (Furthest Neighbor), cependant il a été décidé en accord avec Scimabio Interface de modifier le pourcentage de similarité utilisé en le passant de 95% à 99% pour améliorer la finesse d'assignation taxonomique. Enfin, la partie d'assignation taxonomique des OTUs à la base de référence génétique Diat.Barcode a été modifiée en intégrant une double

méthode : i) le classificateur conventionnel RDP qui permet d'assigner rapidement un grand nombre de séquence ; ii) l'approche par BLAST est utilisée en 2^{ème} intention pour les OTUs qui n'ont pas pu être assignées à l'espèce via RDP.

Ces optimisations ont permis d'augmenter la finesse d'assignation taxonomique et d'améliorer l'adéquation entre les résultats issus des deux méthodes (ADN vs microscopie). De plus, cela a également permis d'augmenter le volume d'échantillons analysable à savoir environ 360 échantillons en 6 à 10 jours ouvrés hors calcul IBD. La validation de la méthode (répétabilité, reproductibilité, sensibilité, spécificité) est en cours aux LPL, dans la mesure des possibilités d'accès à des matériaux de référence et à des référentiels de validation. Enfin, afin de finaliser l'analyse jusqu'à l'obtention de la note IBD sur un site, au cours de ce projet, les données générées par séquençage par LPL et transformées en listes taxonomiques ont été systématiquement transmises à Artemis, diatomiste, qui s'est chargé de traduire ces listes en notes IBD et en classes de qualité. Ce mode de fonctionnement en duo, laboratoire générateur de données sur base d'approche de biologie moléculaire et diatomiste, expert en écologie des diatomées, nous a conforté dans l'idée qu'une telle méthode ne pouvait être conduite à bien qu'en associant les deux acteurs.

La méthode de metabarcoding a donc été stabilisée et rendue prête à être appliquée sur les échantillons terrain prélevés par Artemis.

3.1.3 Ce qu'il faut retenir

a/ Le transfert technique et bioinformatique dans un laboratoire de routine de biologie moléculaire peut se faire sans difficulté, à condition que ce transfert soit réalisé par un organisme compétent et conscient des pré-requis de laboratoire, et que le laboratoire receveur soit équipé et possède les compétences adéquates.

b/ La méthode est opérationnelle sur la partie laboratoire. Concernant la partie bioinformatique, elle est également opérationnelle mais peut être encore optimisée notamment par automatisation de certaines tâches d'assignation.

c/ 360 échantillons sont analysables en 6 à 10 jours ouvrés hors calcul IBD.

d/ La validation de la méthode est en cours aux LPL, en s'appuyant notamment sur le référentiel technique pour la validation indépendante des outils utilisant l'ADN environnemental (Guigues et al, 2023).

e/ L'évaluation de l'IBD doit se faire en duo laboratoire/diatomiste pour une bonne pertinence d'après notre expérience dans ce projet.

3.1.4 Axes d'amélioration et questions soulevées

a/ La validation complète de la méthode doit être finalisée. Sur ce point, il est essentiel de réfléchir, dans le cadre d'une utilisation routine par les laboratoires dans le futur, à la mise en place d'interlocuteurs référents sur les différentes étapes de maintien des performances à savoir : (i) le transfert de méthode, (ii) la fabrication/stockage et maintien des matériaux de référence, (iii) la mise en place d'essais interlaboratoire, (iv) la mise à jour et l'entretien qualitatif de la base Diat.Barcode dans le temps, notamment en lien avec l'évolution taxonomique, (v) la veille technologique et bioinformatique pour pouvoir répondre à des éventuels changements ou abandon de technologies.

b/ L'assignation par Blast doit être automatisée pour parfaire la méthode et la conditionner en mode routine.

3.2 Evaluation de l'applicabilité de la base de référence Diat.Barcode à l'échelle locale

Cette partie visait à déterminer si la base de référence, créée et implémentée actuellement par INRAE à l'aide de données source variées, était adaptée à son utilisation dans un contexte local géographiquement, ici les bassins Adour, Nives, Gaves, dans le sud-ouest de la France et dans un cadre d'analyses de routine.

Deux étapes ont été réalisées pour évaluer l'applicabilité de la méthode et donc de la base de référence : (i) la comparaison des listes taxonomiques locales avec celle de la base Diat.Barcode et (ii) l'établissement de la liste des causes de divergences d'indices IBD obtenus respectivement par les deux méthodes.

3.2.1 Comparaison des listes taxonomiques : locale vs Diat.Barcode

Une liste de taxons retrouvés dans le bassin du Sud-Ouest a été réalisée par Artemis à partir de ses propres analyses réalisées en 2019 et 2020. Cette liste a été comparée à la liste issue de la base de référence Diat.Barcode, version 10 (voir lien internet en fin de document).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Nombre de taxons DB Artemis	632
Nombre de taxons Artemis présents dans DiatBarcode	209
Nombre de taxons Artemis absents dans DiatBarcode	423
Nombre de taxons pris en compte calcul IBD	330
% de taxons communs	33 %
% de taxons manquants	67 % dont 78% entrant dans la note IBD

Le nombre de taxons « locaux » manquants dans la base de référence Diat.Barcode représente un pourcentage de 67% dont 78% entrent dans le calcul de la note IBD ce qui laisse prédire à ce stade des performances moindres dans l'identification des taxons par la méthode ADN au niveau local. Cependant, sur ces 78%, seuls 9% (30 espèces sur 330) montrent une abondance relative supérieure à 5%. Or, par expérience les taxons montrant une abondance relative inférieure à 5% contribuent de manière négligeable dans l'indice IBD. La complétion immédiate de la base pour l'optimisation de l'utilisation de l'outil au niveau local, en intégrant les taxons spécifiques aux hydroécotones, peut donc se faire sur un nombre relativement faible de taxons et donc plus rapidement. Une complétion plus complète peut intervenir dans un deuxième temps afin d'obtenir une base exhaustive.

3.2.2 Liste des causes de divergence entre les deux méthodes

Cette deuxième étape a été réalisée conjointement par LPL et Artémis, à partir du jeu de données constitué dans le cadre de Meta-IBD en 2021 et 2022, à partir des échantillons traités par Artemis pour le compte de l'Agence de l'Eau Adour Garonne, dans le cadre de la surveillance DCE, et co-traités par LPL, pour la méthode ADN (prélèvement réalisé par Artemis, extraction ADN/amplification rbcl/préparation des librairies et séquençage MiSeq (Illumina)/traitement bioinformatique des séquences/listes taxonomiques par LPL).

Les divergences ont été considérées seulement sur les échantillons montrant des écarts d'IBD supérieurs à 2, une différence inférieure pouvant être considérée comme un biais inhérent à la méthode de référence. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant.

Problématique identifiée	Taxons concernés	Causes et/ou correction
Taxons absents dans Diatbarcode	32 taxons	Implémentation dans Diatbarcode
Taxons non identifiés en ADN mais présents dans Diatbarcode	10 taxons (NDIS, ESLE, ADLA, NDIS, NZSU, APED, AD SH, CSNU, DPSG, ADRI)	Frustules vides ?
Mauvaise identification par ADN	9 taxons (ACHD, ADMI, COCO, ADSB, ACHD, ADMI, NAVI, ADSB, SELL)	Résolution par Blast = 5 taxons Problème persistant = 4 taxons
Non identifiable à l'espèce en ADN	8 taxons (NITZ, AMID/AMPH, NITZ, BACI/NITZ, CAGR, NFIL/NFIC , CATO, AMID)	Pas de distinction entre espèces
Niveau de finesse taxonomique	3 taxons (GPAR/GSPP, NPAD/NPAL, CPLA/CPLI)	Variants non identifiés/non différenciés dans Diatbarcode ou taxons laissés en sp
Divergence d'identification taxonomique	9 taxons (GPAR/GSPP, CPLA/CPLI, , ADMI, Ulnaria, DCOF, GMIN/GOMP, RUNI, NCTE, NINC)	Résolution par Blast = 5 taxons Problème persistant = 4 taxons
Surestimation abondance par ADN	18 taxons (NPAL, MVAR, GMMI, NAMC, NES C, DVUL, NLAN, CPED, UULN, NTPT, GMMI, UULN, MVAR, N LIN, EMIN, DVUL, CTUM, PLEV)	Grandes espèces (>50 µm) et/ou coloniales Facteur de correction ?
Sous-estimation abondance par ADN	17 taxons (KOBG, NAMP, AD SH, ADPY, NCTE, APED, SNIG, ADMI, KOBG, EEXI, NP AE, NAMP, NFON, MP MI , SNIG , CSNU, DPSG)	Petites espèces Facteur de correction ?

La base de référence Diat.Barcode montre des lacunes sur un certain nombre de taxons présents dans la zone d'étude et sur le plan également de la taxonomie proprement dite. Ainsi, pour être rendue applicable dans le cadre d'une analyse de routine, cette base doit répondre à plusieurs critères :

- Prise en compte seulement des taxons présents dans le territoire français, comprenant ceux entrant dans le calcul IBD. Ceci permet de maintenir une diversité dans la base de référence afin de limiter les erreurs d'assignations tout en l'allégeant pour focaliser sur les taxons informatifs,
- Implémentation des taxons manquants, prioritairement ceux montrant des abondances > 5%, au niveau national, avec prise en compte des spécificités locales par hydroécocorégion,
- Affiner la taxonomie sur certains taxons restés en sp,
- Rendre cohérent la taxonomie de la base, créée à l'origine pour des questions et besoins de recherche, avec la taxonomie de routine pour les analyses IBD, plus opérationnelle et permettant de faire certaines simplifications (e.g. regroupement de taxons proches avec écologies similaires).

Un axe intéressant pourrait être de diviser la base Diat.Barcode existante en deux bases différenciées : (i) une base générale, dédiée à la recherche et à l'implémentation de nouveaux taxons sur le plan écologique et en rapport direct avec l'évolution de la taxonomie des diatomées, et (ii) une base dédiée et spécifique à l'utilisation opérationnelle et donc au calcul de l'IBD. Cela impliquerait donc de reprendre la base Diat.Barcode et de la modéliser en fonction de ces critères.

3.2.3 Ce qu'il faut retenir

La base Diat.Barcode n'est pas suffisamment adaptée en l'état à la mise en œuvre de la méthode de metabarcoding sur ADN environnemental, dans un cadre de routine pour l'évaluation de la qualité de l'eau des rivières dans un contexte DCE. Il est cependant nécessaire de garder à l'esprit que la méthode en microscopie montre également des biais qui peut conduire à une divergence des méthodes et donc une moins bonne corrélation des notes IBD en découlant. Ces biais sont décrits par la suite.

3.2.4 Question soulevée

La base Diat.Barcode doit être divisée et réadaptée spécifiquement pour la rendre opérationnelle en routine. A long terme, pour des besoins de routine et uniquement dans ce cadre, il est nécessaire qu'elle soit maintenue, curée taxonomiquement en lien avec l'évolution taxonomique morphologique, par un organisme dédié.

De plus les connaissances taxonomiques opérationnelles sont mises à jour annuellement pour la microscopie. Lors de ces exercices, la taxonomie est discutée et leur codification sous forme de code à 4 lettres est définie pour simplifier l'intégration des inventaires dans les logiciels de calculs de notes IBD (SEEE, Omnidia). Il serait aussi pertinent que la base Diat.barcode opérationnelle bénéficie de ces mises à jour annuelles taxonomiques et de codifications des taxons pour faciliter le calcul opérationnel des IBD ADN. Cela permettrait aussi de garder de la cohérence avec la taxonomie utilisée pour les IBD morphologiques.

3.3 Etude comparative méthode de référence vs metabarcoding

Les inventaires issus de la méthode de metabarcoding (IBD ADN) ont été fournis à Artemis afin de déterminer l'IBD, *via* une intégration dans le logiciel OMNIDIA pour le calcul de l'IBD. En 2021 ont été comparés les inventaires issus d'échantillons traités par LPL de diverses manières :

- Avec des séquences représentatives d'OTU construits à 95% de similarité (OTU 95%), avec et sans transformation en biovolume,
- Avec des séquences représentatives d'OTU construits à 99% de similarité (OTU 99%), avec et sans transformation en biovolume.

Sur les prélèvements de 2022, l'analyse a été menée avec les inventaires issus du traitement avec des OTU 99% sans transformation en biovolume pour une raison de non-pertinence de la note IBD avec le biovolume (voir plus bas).

Des résultats après traitement par classificateur BLAST ont également été soumis à la comparaison des IBD de manière générale (corrélation) et de la composition des peuplements pour une sélection de stations (celles qui présentaient une grande différence de note).

Les résultats sont présentés par thème, de manière synthétique, par la suite.

3.3.1 Sur la pertinence de l'IBD

Pour rappel, selon la norme, le pourcentage d'unités diatomiques contributif au calcul de l'IBD doit être pris en compte. Si celui-ci est :

- Inférieur ou égal à 25 %, aucune note IBD ne peut être attribuée ; l'IBD est alors non calculable (NC).
- Compris entre 25 et 50 %, l'IBD doit être émis avec des réserves.

Les résultats ont montré qu'avec l'utilisation des biovolumes comme facteur correcteur, la pertinence n'était pas bonne avec un grand nombre de notes non calculables et/ou réservées, comme illustré dans le tableau ci-dessous.

BILAN PERTINENCE IBD en nb de relevés en 2021				
	MICROSCOPIE	ADN sans BIOVOL95	ADN sans BIOVOL99	ADN BIOVOL 95
TOTAL réserve	18	34	27	70
TOTAL Non calculable	0	1	1	77

Cependant, la correction par ce facteur de correction améliore la tendance générale de corrélation entre IBD calculé par méthode morphologique (IBD morpho) et celui calculé par ADN (IBD ADN). Bien que la tendance générale soit améliorée, la correction n'est pas suffisamment stabilisée en l'état pour un calcul réglementaire de l'IBD et n'a donc pas été conservé car : i) les inventaires corrigés quantitativement ne répondaient plus aux exigences de calculs de l'IBD en termes de taxons contributeurs, ii) certains échantillons étaient très affectés par la correction qui finit de dégrader l'écart entre IBD morpho et IBD ADN. Ainsi, la méthode retenue était celle constituant des OTU à 99% de similarité, sans transformation en biovolume.

Cette pertinence est très dépendante de l'abondance d'*Achnanthydium delmontii* (ADMO), non prise en compte encore à ce jour dans l'IBD. L'intégration de ce taxon est en cours, ce qui va augmenter les performances sur ce critère.

3.3.2 Sur la corrélation des notes IBD

La corrélation des notes IBD est meilleure avec OTU 99%, avec une amélioration du coefficient de corrélation (r^2) entre 2021 et 2022 et en 2022, après assignation par BLAST.

La corrélation des notes est meilleure dans le bassin Gaves et Nives, comparativement à Adour.

- Sur les points de divergence de notes IBD

En 2021, les résultats sont meilleurs avec OTU 99% comparativement à OTU 95%.

Les résultats sont améliorés en conservant OTU 99% et on note une différence entre les stations de l'Adour et des Gaves et Nives, avec de meilleurs résultats dans les stations des Gaves et Nives.

En 2021, on obtient, d'une manière générale, tous les relevés confondus : 77% des notes présentent une différence inférieure à 2 points et 53% à un point (tous relevés confondus). Pour Gaves et Nives, ce pourcentage est de 79% et 52% contre 76% et 53% pour Adour.

En 2022, on obtient 77% notes présentent une différence inférieure à 2 points et 54% à un point (tous relevés confondus). Pour Gaves et Nives, on obtient 81% de notes qui ont moins de 2 points de différence et 62% avec une différence de 1 point.

Pour Adour ces valeurs sont respectivement de 51% et 34%.

3.3.3 Sur les classes de qualité

Avec la méthode ADN, les résultats montrent, comparativement à la microscopie, moins de stations dans la classe très bonne et davantage de sites qui entrent dans la classe de mauvaise qualité.

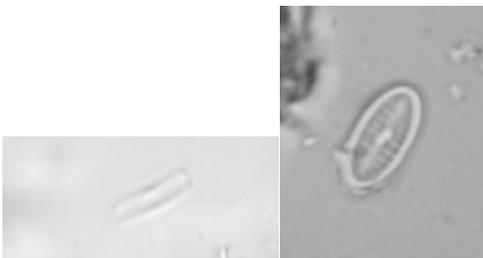
Pour les plus grandes différences de notes (>2 points), une comparaison des peuplements station par station a été réalisée.

3.3.4 Sur la composition des peuplements

Les principaux problèmes détectés ont été listés dans le tableau synthétique en paragraphe 3.2.2.

Certains problèmes sont récurrents et peuvent induire des différences de notation importante :

- **Identification de GPAR en microscopie contre GSPP en ADN, taxon plus poluo-résistant donc « tirant » la note vers le bas**
- **Surestimation en microscopie de frustules sans doute morts (photos prises sans traitement de frustules) dans certaines cas ADMI, KOBG « tirant la note vers le haut » ; c'est le cas au Rejtons à Tartas, en 2021 comme en 2022.**



- **Surestimation en ADN des grandes espèces et/ou coloniales**
- **Sous-estimation en ADN des petites espèces**
- **Détection d'ADMI pas toujours évidente en ADN et resté au genre.**

Le traitement par BLAST a permis de détecter des taxons non identifiés à l'espèce sans BLAST, ce qui montre l'intérêt de ce traitement.

Il ressort également de cette étude une moindre richesse taxonomique à partir de l'ADN comparativement aux inventaires issus de la microscopie. En moyenne, sur l'ensemble des relevés, on obtient 31 taxons pour la microscopie, contre seulement 12 pour l'ADN.

	MOY	MAX	MIN
ADN Blast 2022	12	21	1
MIC 2022	31	71	7

3.3.5 Ce qu'il faut retenir

- La transformation en biovolume améliore la corrélation des notes IBD d'une manière générale mais génère un fort pourcentage de taxons non pris en compte dans l'IBD, ce qui rend la note non pertinente et/ou non calculable pour un nombre important de relevés au sens de la Norme NF T 90-354 ;
- Les meilleurs résultats en termes de comparaison de notes IBD MIC vs ADN sont obtenus avec des OTU construits à 99% de similarité (OTU 99%) sans transformation des inventaires en biovolume, avec le traitement BLAST ;
- Les écarts de notes d'IBD sont moins importants dans les stations du bassin Gaves et Nives comparativement à celles d'Adour ;
- La comparaison de inventaires montre des problèmes récurrents de différence d'identification et ou d'appréciation de l'abondance (voir tableau de synthèse) ; parmi ces discordances, certaines induisant les plus grandes différences de notes pourraient être facilement corrigées (ex GPAR/GSPP).

4 Synthèse et questions soulevées

Le projet a montré que la méthode ADN donne des résultats relativement satisfaisants et encore perfectibles (améliorations techniques par LPL, prise en compte ADMO, ...). En ce qui concerne l'estimation de la qualité biologique du milieu avec toutefois une différence en fonction du jeu de données, les résultats sont nettement meilleurs pour les stations du bassin versant des Gaves et Nives, surtout en 2022 ; cela en raison d'une richesse taxonomique moins grande. En 2021, 79% des notes ont une différence < 2 points et dans 18% de cas, pas de différence ; en 2022, 81% des notes ont une différence < à 2 points, 17% n'ont aucune différence. Ce pourcentage sera encore plus élevé avec la prise en compte d'ADMO.

Le projet a permis de mettre en évidence des pistes de travail pour améliorer la méthode et la rendre encore plus performante à l'échelle locale (voir tableau en paragraphe 2.2.2).

Le projet a également permis de se projeter dans un cadre opérationnel et a fait ressortir certains problèmes dans l'application de l'IBD *sensu* selon la norme NF-T-90-34, notamment en ce qui concerne le pourcentage d'unités taxonomiques. On a vu que la transformation en biovolume rendait les résultats peu probants avec beaucoup d'IBD non pertinents ou même

non calculables. La question se pose alors de l'aspect normatif : est-ce que le cadre réglementaire actuel est adapté à la correction quantitative ? Faut-il ajuster les normes existantes ou en créer de nouvelles adaptées à l'ADNe ?

Cette notion de taille est à prendre en considération. En effet, logiquement, les grandes espèces sont mieux représentées avec l'ADN :

- Espèces coloniales : MVAR, GMMI, DGEM, DVUL
- Grandes diatomées : PLEV, UULN, NTPT, NLAN...

Des pistes doivent être creusées pour prendre en considération cela :

- Comment compenser ces différences de tailles chez les espèces ? Le biovolume a été utilisé comme facteur correcteur mais n'est pas optimal pour une utilisation en routine à ce stade car l'outil historique n'a pas été stabilisé en ce sens. Une autre option serait d'utiliser un facteur de correction empirique, permettant de passer d'une correction taxonomique individuelle à une correction directe de la note IBD. Il s'agit donc bien ici de d'intégrer cet aspect de facteur correcteur pour optimiser totalement l'analyse en routine et la rendre compatible avec l'IBD morphologique.

- Est-il nécessaire de corriger ? Il existe la possibilité d'évoluer vers du « taxonomie free » qui permet de ne pas affecter la donnée quantitative, de s'affranchir des biais taxonomiques (complétion de base de référence, connaissances taxonomiques) et donc d'utiliser la totalité des données génétiques obtenues, à explorer.

- Modifier la façon de compter au microscope avec un sous comptage des grandes avec un grossissement moindre 40x par ex au lieu de x 100 ?

Aujourd'hui, les deux méthodes peuvent être complémentaires et apporter chacune des informations utiles pour un diagnostic de l'état écologique des cours d'eau plus complet. Chacune peut permettre à l'autre de s'améliorer. Chacune d'elle possède des biais et des atouts qu'il faut continuer à identifier afin d'analyser leur impact et les utiliser pour améliorer les méthodes. L'ADN peut sans doute permettre de revoir l'identification morphologique dans le cas d'espèces proches morphologiquement : NPAD/NPAL ; GPAR/GSPP ; GPUM/GBOB.... De même, la séparation de taxons est difficile en microscopie concernant le grand complexe ADMI. La méthode ADN peut donc être un moyen de progresser dans l'identification de ces formes.

La méthode ADN permet certainement une meilleure estimation quand il y a beaucoup de frustules morts. Par exemple, à Retjons à Tartas : la note IBD issue de l'ADN est plus en

adéquation avec la physicochimie du milieu ; la méthode microscopique peut-elle être améliorée sachant cela, par l'établissement d'un pourcentage mort/vivant sur le matériel frais ?

Liens internet vers les protocoles

Prélèvements biofilms rivière : <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ben6jdhe>

Extraction ADN en utilisant le kit Nucleospin Soil (Macherey-Nagel) :

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd52i88e>

Préparations des PCR rbcL avec pour objectif un séquençage Miseq en 2 step PCR

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd94i98w>

Base de référence Diat.Barcode, version 10 :

<https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/dataverse/inrae>

Référence

Nathalie Guigues, Isabelle Vitte, Sylvie Betat, Lucas Sire, Pierre Boissery, Isabelle Domaizon, Vincent Dubut. 2023. Référentiel technique pour la validation indépendante des outils utilisant l'ADN environnemental. Convention OFB LNE n° 21.0902 du 08/09/21.

Titre du rapport	Note de synthèse - Projet META-IBD	
Auteurs du rapport (ordre alphabétique)	Florence Peres, Valentin Vasselon, Isabelle Vitte	
Période couverte	Mai 2021	Septembre 2023

Titre du projet	Indice Biologique Diatomées : Evaluation de la mise en routine de la méthode de Metabarcoding, à l'échelle locale (sud-ouest de la France)
Acronyme du projet	META-IBD
Durée du projet	1 ^{er} mai 2021 – 31 septembre 2023

Coordinateur de projet	Laboratoires des Pyrénées et des Landes	Dr Isabelle VITTE i.vitte@labopl.com
Partenaire financier	Agence de l'Eau Adour Garonne	Monsieur Jean-Pierre REBILLARD jean-pierre.rebillard@eau-adour-garonne.fr Monsieur Lomig LEBORGNE lomig.leborgne@eau-adour-garonne.fr
Partenaires scientifiques	Laboratoires des Pyrénées et des Landes	Dr Isabelle VITTE i.vitte@labopl.com Madame Adeline Jouanillou a.jouanillou@labopl.com
	Scimabio Interface	Dr Valentin VASSELON valentin.vasselon@scimabio-interface.fr
	Artemis	Dr Florence PERES florence.peres@artemis.ovh