



OligoGen : Développement de méthodes oligochètes génétiques pour évaluer la qualité biologique des sédiments de cours d'eau

Rapport final 08.11.2023



Mentions légales

Editeur

Centre suisse d'écotoxicologie appliquée, 1015 Lausanne

Sur mandat de

Office Fédéral de l'Environnement (OFEV)

Auteurs

Régis Vivien	Centre suisse d'écotoxicologie appliquée
Benoît Ferrari	Centre suisse d'écotoxicologie appliquée
Kristina Cermakova	ID-Gene Ecodiagnosics
Jan Pawlowski	ID-Gene Ecodiagnosics

Accompagnement scientifique

Marie-Sophie Renevier	OFEV, Vivision Eau, Section Qualité des Eaux
Yael Schindler	OFEV, Vivision Eau, Section Qualité des Eaux
Christiane Ilg	VSA, Association des professionnels de la protection des eaux, Plateforme Qualité de l'eau

Remerciements

Nous remercions Emmanuelle Rohrbach et Alessandro Scapuso pour leur aide pour les amplifications par PCR et le séquençage dans le cadre de la partie du projet sur l'enrichissement de la base de données COI suisse et Pascal Mulatieri (Biol'Eau Sàrl) pour la réalisation des échantillonnages sur le terrain.

Contact

Régis Vivien: regis.vivien@centreecotox.ch

Citation

Vivien, R., Cermakova, K, Pawlowski, J., Ferrari, B.J.D. 2023. OligoGen : Développement de méthodes oligochètes génétiques pour évaluer la qualité biologique des sédiments de cours d'eau. Centre suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL, Lausanne.

Photo de couverture: Centre Ecotox, Lausanne



Résumé

Les sédiments sont une composante essentielle des écosystèmes fluviaux et lacustres et agissent comme récepteurs naturels pour de nombreux contaminants (par ex., métaux, HAP, PCB, pesticides organochlorés). Le manque de prise en compte du compartiment sédimentaire dans le cadre des programmes de surveillance peut conduire à des conclusions trop optimistes sur la qualité des cours d'eau. Il est crucial d'évaluer la qualité de ce compartiment pour déterminer s'il peut contribuer à la dégradation d'un écosystème.

Les oligochètes conviennent parfaitement pour l'évaluation in situ de la qualité biologique des sédiments. En effet, ils sont inféodés à ce compartiment, se déplacent peu et ont comme mode trophique essentiellement l'ingestion de sédiments fins. De plus, le groupe comprend un grand nombre d'espèces présentant des degrés très divers de sensibilité à la pollution, et les oligochètes sont généralement abondants dans les sédiments. L'Indice Oligochètes de Bioindication des Sédiments (IOBS) a été développé spécifiquement pour évaluer la qualité biologique des sédiments fins/sableux dans les cours d'eau. L'identification morphologique des oligochètes à l'espèce est cependant difficile et seule une partie des spécimens présents dans un échantillon peut généralement être identifiée à l'espèce.

L'utilisation de codes-barres génétiques faciliterait nettement l'identification des oligochètes aquatiques et l'établissement de diagnostics écologiques. Le séquençage à haut débit permet l'analyse moléculaire d'un grand nombre d'échantillons (par ex. sédiments, mélanges de spécimens ou spécimens isolés) en même temps et a été proposé comme un moyen efficace pour évaluer la biodiversité dans les programmes de suivi de la qualité des milieux. Dans des projets antérieurs, nous avons d'une part créé une base de données de référence des séquences du code-barre COI (=cytochrome c oxydase) des oligochètes aquatiques basée sur l'analyse de spécimens collectés en Suisse et d'autre part testé différentes méthodes de metabarcoding ADN(e) (analyse du sédiment total, sédiments tamisés et mélanges d'oligochètes) ainsi qu'une méthode basée sur le séquençage à haut débit de spécimens d'oligochètes marqués génétiquement (SHDspm). Les résultats obtenus avec cette dernière méthode (notes d'indice, abondances des espèces) ont été très concordants avec ceux de la méthode traditionnelle.

Les buts principaux du projet OligoGen sont de tester la méthode SHDspm sur 25 nouveaux sites répartis dans plusieurs cantons suisses, de tenter de la rendre applicable en routine et d'enrichir la base de données suisse de référence des séquences COI des oligochètes aquatiques. Les autres buts sont de tester sur une partie de ces sites des méthodes de metabarcoding basées sur l'analyse de l'éthanol préservant le matériel tamisé (SHDéth) et de mélanges de spécimens d'oligochètes (SHDmél). Pour cette dernière méthode, la même quantité de tissus entre spécimens a été incorporée dans chaque mélange.

Des corrélations très significatives entre les valeurs de l'IOBS calculées avec les données morphologiques et celles calculées avec les données de chacune des trois méthodes génétiques ont été obtenues. La concordance entre les résultats de la morphologie et ceux des méthodes de metabarcoding a pu être améliorée en adaptant pour les données génétiques le calcul de l'indice IOBS et les limites de classes de qualité. La méthode SHDspm s'est toutefois avérée nettement plus fiable que les méthodes SHDéth et SHDmél pour estimer les abondances des espèces, familles et sous-familles présentes dans les échantillons. Les méthodes SHDéth et SHDmél ont tendance entre autres à sous-estimer nettement les abondances des Naidinae et des Enchytraeidae. La méthode SHDspm présente donc l'avantage de pouvoir permettre de compléter le diagnostic établi sur la base de la seule note de l'indice IOBS en analysant les pourcentages des différentes espèces présentes dans un échantillon. La base de données COI de référence des oligochètes aquatiques a été enrichie de 78 nouvelles lignées (lignée = espèce), la plupart ayant été obtenues grâce au séquençage à haut débit. La base de données comprend actuellement 184 lignées.



Bien qu'ayant pu être validée dans le cadre de ce projet, la méthode SHDspm n'a toutefois pas pu être adaptée pour les analyses de routine, la méthode d'extraction d'ADN développée pour ce projet n'ayant pas permis d'obtenir un taux de succès d'amplification (PCR) suffisamment élevé. Cette méthode telle qu'appliquée dans le cadre de ce projet peut toutefois déjà être utilisée pour évaluer la qualité biologique des sédiments, mais le coût de l'analyse par échantillon est élevé. Les méthodes SHDéth et SHDmél n'ont pas pu être validées dans le cadre de ce projet en raison du nombre de données encore peu élevé et surtout du fait que ces méthodes n'ont pas permis d'estimer correctement les abondances des espèces, sous-familles et familles. Ces biais et en particulier ceux obtenus avec la méthode SHDmél pourraient en partie être expliqués par la méthode d'extraction d'ADN utilisée.

Les perspectives sont d'optimiser les étapes d'extraction de l'ADN et d'amplification de l'ADN par PCR pour permettre l'application de la méthode SHDspm en routine et de continuer l'enrichissement de la base de données COI de référence. Les méthodes SHDéth et SHDmél nécessiteront un développement important, incluant le test de ces approches en appliquant quelques autres méthodes d'extraction de l'ADN que celle utilisée dans le cadre de cette étude et, si les résultats ne s'améliorent pas significativement, le test de l'application de facteurs de correction aux nombres de reads (séquences) obtenus et la mise au point et l'utilisation de primers spécifiques des oligochètes.



Glossaire

IOBS : Indice oligochètes de bioindication des sédiments

IOBSgen: IOBS génétique

IBCH: Indice suisse de qualité basé sur les communautés de macroinvertébrés benthiques

ID-CH : Indice suisse des diatomées

SHDspm: Séquençage à haut débit de spécimens d'oligochètes marqués génétiquement

SHDéth : Séquençage à haut débit d'échantillons d'éthanol préservant les sédiments tamisés

SHDmél : Séquençage à haut débit de mélanges de spécimens d'oligochètes

Morpho : Morphologie

ADN(e) : ADN environnemental

COI : Cytochrome c oxydase

PCR : Polymérase chain reaction

Primer : Amorce

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate



Table des matières

Résumé	i
Glossaire	iii
1 Introduction	1
1.1 Problématique des sédiments	1
1.2 Les oligochètes, bioindicateurs de la qualité des sédiments	1
1.3 Identification des oligochètes à l'aide de codes-barres génétiques	1
1.4 L'approche « metabarcoding ADN(e) »	2
1.5 Séquençage à haut-débit de spécimens marqués génétiquement	2
1.6 Etudes suisses antérieures sur l'utilisation des codes-barres génétiques pour évaluer la qualité biologique des sédiments.....	2
1.7 Projet OligoGen	3
2 Matériel et méthodes.....	4
2.1 Sites et répartition des analyses.....	4
2.2 Prélèvement et tamisage des échantillons pour les analyses morphologiques et génétiques.....	5
2.3 Préparation des échantillons pour la méthode SHDéth	5
2.4 Tri des spécimens pour l'étude Morpho, le SHDspm et le SHDmél	5
2.5 Préparation des spécimens pour la Morpho et identifications.....	6
2.6 Préparation des échantillons pour la méthode SHDspm	6
2.7 Préparation des échantillons pour la méthode SHDmél	6
2.8 Extraction d'ADN et amplification par PCR.....	6
2.8.1 Méthode SHDspm	6
2.8.2 Méthode SHDmél	7
2.8.3 Méthode SHDéth	7
2.9 Marquage des primers, préparation des librairies et séquençage Illumina	7
2.10 Analyse des séquences et assignation taxonomique	8
2.11 Indice oligochètes et diagnostic écologique complémentaire	8
2.12 Analyse des données génétiques et analyses statistiques	9
2.13 Enrichissement de la base de données COI de référence.....	10
3 Résultats	11
3.1 Succès du séquençage et assignations taxonomiques (méthodes SHDspm, SHDéth et SHDmél)	11
3.2 Diversité obtenue avec la morphologie et les méthodes génétiques	11
3.3 Méthode Morpho vs méthode SHDspm.....	12
3.4 Méthode Morpho vs méthodes de metabarcoding ADN(e).....	18
3.4.1 Méthode SHDéth	18
3.4.2 Méthode SHDmél	19
3.5 Méthode SHDspm vs méthodes de metabarcoding ADN(e).....	20



3.6	Base de données COI de référence	20
4	Discussion.....	22
4.1	Méthode SHDspm	22
4.2	Méthodes de metabarcoding ADN(e)	23
4.2.1	Méthode SHDéth	23
4.2.2	Méthode SHDmél	24
4.3	Base de données COI de référence	26
4.4	Synthèse de l'état d'avancement de la recherche sur les différentes méthodes génétiques et les perspectives de développement	26
4.5	Synergies avec le développement de méthodes génétiques pour évaluer la qualité biologique des sédiments des lacs	28
5	Références.....	29
Annexes		33
Annexe 1		33
Annexe 2 Tab. 1 à 11		35
Annexe 3		66



1 Introduction

1.1 Problématique des sédiments

Les sédiments sont une composante essentielle des écosystèmes fluviaux et lacustres. En effet, ils jouent un rôle important pour de nombreuses espèces en tant qu'habitat ou site de nidification, représentant ainsi un milieu significatif pour la diversité biologique (Höss et al., 2011). Les sédiments remplissent également des fonctions écologiques majeures, dont la plupart sont essentielles au bon fonctionnement des cycles biogéochimiques. Les sédiments agissent également comme récepteurs naturels pour certains contaminants. Les éléments traces métalliques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polybiphényles chlorés (PCB) ou les pesticides organochlorés (OC) qui ne se trouvent qu'à l'état de traces dans l'eau, sont des exemples de substances toxiques et hydrophobes qui ont tendance à s'accumuler dans la phase sédimentaire (Wang, 1987). Ces substances peuvent atteindre des concentrations suffisantes pour induire des effets néfastes sur les organismes benthiques et ainsi perturber le bon fonctionnement de l'écosystème (Höss et al., 2011; Gurung et al., 2018). Ces effets peuvent se produire non seulement localement, mais également au niveau de l'hydrosystème via le transport des sédiments et la libération de contaminants. Par exemple, des sédiments contaminés peuvent être remobilisés lors d'épisodes de hautes eaux (Wolfram et al., 2012). Ainsi, le manque de prise en compte du compartiment sédimentaire dans le cadre des programmes de surveillance peut conduire à des conclusions trop optimistes sur la qualité des cours d'eau (Lafont et al., 2010). Il est crucial d'évaluer la qualité de ce compartiment pour déterminer s'il peut contribuer à la dégradation d'un écosystème (Casado et al., 2021). Une évaluation complète de ce compartiment nécessite de combiner des tests écotoxicologiques, une évaluation des communautés in situ et des analyses chimiques (triade, Chapman, 1990 ; Beauvais et al., 2020 ; Casado et al., 2021).

1.2 Les oligochètes, bioindicateurs de la qualité des sédiments

Les oligochètes conviennent parfaitement pour l'évaluation in situ de la qualité biologique des sédiments. En effet, ils sont inféodés à ce compartiment, se déplacent peu et leur mode trophique est essentiellement l'ingestion de sédiments fins. De plus, le groupe comprend un grand nombre d'espèces présentant des degrés très divers de sensibilité à la pollution (Rodriguez & Reynoldson, 2011), et les oligochètes sont généralement abondants dans les sédiments (Vivien et al., 2020a). Diverses méthodes biologiques basées sur l'analyse des communautés d'oligochètes ont été proposées pour évaluer la qualité des sédiments fins/sableux dans les cours d'eau, parmi lesquelles l'Indice Oligochètes de Bioindication des Sédiments (IOBS) (AFNOR, 2016; Vivien et al., 2020a). Cet indice est avant tout un indicateur des pollutions de type toxique (Vivien et al., 2020a) et son application permet ainsi de compléter l'information écologique fournie par les autres bioindicateurs (IBCH et DI-CH) (Vivien et al., 2015). Cet indice a été appliqué en routine par le Service de l'écologie de l'eau du canton de Genève entre 2010 et 2013 (Vivien et al., 2015; 2020a) et de manière ponctuelle par d'autres cantons (Vaud et Valais).

1.3 Identification des oligochètes à l'aide de codes-barres génétiques

L'identification morphologique des oligochètes à l'espèce est cependant difficile et seule une partie des spécimens présents dans un échantillon peut généralement être identifiée à l'espèce (Vivien et al., 2020a). Ces difficultés liées à l'identification des espèces ont empêché une large utilisation de cette taxocénose pour le suivi de la qualité biologique des milieux.

L'utilisation de codes-barres génétiques faciliterait nettement l'identification des oligochètes aquatiques et l'établissement de diagnostics écologiques des sédiments (Vivien et al., 2017). Le code-barres mitochondrial cytochrome c oxydase (COI) est bien adapté pour l'identification des oligochètes aquatiques et terrestres. Un seuil de divergence génétique de 10% (COI) a été considéré comme approprié pour distinguer les espèces d'oligochètes aquatiques (e.g. Vivien et al., 2017;



Zhou et al., 2010; Prantoni et al., 2018). Cependant, ce seuil doit être ajusté pour certaines espèces, par ex. celles des genres *Nais*/*Uncinai*s (Vivien et al., 2017). Une base de données de référence des séquences COI d'oligochètes aquatiques basée sur l'analyse de spécimens collectés en Suisse est en cours de développement (Vivien et al., 2017; 2020b).

1.4 L'approche « metabarcoding ADN(e) »

Le séquençage à haut débit permet l'analyse moléculaire d'un grand nombre d'échantillons en même temps et a été proposé comme un moyen efficace pour évaluer la biodiversité dans les programmes de suivi de la qualité des milieux (Taberlet et al., 2018; Carew et al., 2013; 2018). La grande majorité des études utilisant cette technologie pour évaluer la qualité biologique des écosystèmes aquatiques repose sur l'analyse de l'ADN extrait de l'eau, des sédiments ou de mélanges de spécimens préalablement triés (Vivien et al., 2019). Le principal problème de ces méthodes, appelées metabarcoding ADN(e), est le manque de précision dans l'estimation de l'abondance de chaque espèce présente dans un échantillon (Vivien et al., 2016; Elbrecht et al., 2017; Pawlowski et al., 2018). Cela limite leur application pour établir des diagnostics écologiques car ceux-ci sont largement basés sur le pourcentage de chaque taxon présent dans un échantillon. Néanmoins, certaines études ont montré une bonne congruence entre l'approche metabarcoding ADN(e) et les méthodes traditionnelles pour analyser des changements dans les communautés (e.g. Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2021; Keck et al., 2022; Hänfling et al., 2016) et estimer la biomasse des espèces détectées dans l'ADN environnemental (ADNe) (Salter et al., 2019; Schenk et al., 2019). Le recours à des facteurs de correction des nombres de séquences (reads) pour les espèces dont les abondances sont systématiquement sous- ou surestimées dans les jeux de données a été suggéré, par ex. pour les oligochètes (Vivien et al., 2016) ou les diatomées (Vasselon et al. 2018), mais il existe aussi d'autres méthodes pour compenser les éventuels biais des analyses du metabarcoding ADN(e) (Tsuji et al., 2022 ; Cordier et al., 2021).

1.5 Séquençage à haut-débit de spécimens marqués génétiquement

Le problème de l'estimation de l'abondance des taxons mentionné ci-dessus pourrait être résolu en triant les spécimens d'un échantillon et en marquant génétiquement chacun d'entre eux lors de l'amplification par PCR, avant d'effectuer le séquençage à haut débit (Shokralla et al., 2014; 2015; Hebert et al., 2018). Cette approche est plus chronophage que les méthodes de metabarcoding ADN(e), mais elle optimise la qualité des diagnostics écologiques en fournissant des données correctes et précises sur les abondances des espèces. Une telle méthode ne serait praticable pour les analyses de routine que si le nombre de spécimens séquencés par site pouvait être limité à environ 50.

1.6 Etudes suisses antérieures sur l'utilisation des codes-barres génétiques pour évaluer la qualité biologique des sédiments

Une étude réalisée en Suisse a investigué les possibilités d'utiliser le metabarcoding ADN(e), à travers l'analyse de l'ADN extrait de mélanges de spécimens d'oligochètes, du sédiment total et des sédiments tamisés pour évaluer la qualité des sédiments à l'aide de la structure des communautés des oligochètes (Vivien et al., 2019). Cette étude a montré que malgré des différences significatives de la structure des communautés obtenues avec les données morphologiques et génétiques en termes de présence/absence des espèces et de pourcentages des espèces, les classes de qualité biologique établies pour chaque site à partir de ces deux types de données (morphologiques et génétiques) étaient concordantes. Le calcul de l'indice oligochètes à partir des données génétiques a toutefois dû être adapté pour atténuer l'effet des biais des abondances des espèces. De plus, l'analyse de l'ADN extrait de spécimens mélangés a permis d'obtenir une évaluation plus correcte de la biodiversité que l'analyse de l'ADN extrait du sédiment total et des sédiments tamisés. Dans le cadre du projet Synaqua (Interreg 2017-2019, Lefrançois et al., 2018), nous avons comparé les résultats du metabarcoding du sédiment total à ceux de l'analyse



morphologique sur des sites de cours d'eau et de lac, et des discordances importantes de la qualité biologique des sédiments ont été obtenues entre les deux approches, malgré des tentatives d'adaptation du calcul de l'indice aux données génétiques (résultats non publiés).

L'approche basée sur le séquençage à haut débit de spécimens marqués génétiquement a été appliquée dans le cadre du projet Synaqua pour évaluer la composition des communautés d'oligochètes dans des sédiments de cours d'eau et de lac (Vivien et al., 2020b). Malgré le fait qu'un nombre restreint de spécimens ont été séquencés par site (33 et 66), les diagnostics écologiques obtenus avec les données morphologique et génétiques étaient similaires. Mais l'approche telle qu'appliquée dans le cadre de ce projet n'était pas applicable en routine et nécessitait des adaptations telles que le raccourcissement de la durée de l'extraction de l'ADN.

1.7 Projet OligoGen

Le projet OligoGen a pour but principal d'acquérir de nouvelles données sur la comparaison entre les résultats de la méthode morphologique classique (Morpho) et de celle basée sur le séquençage à haut débit de spécimens d'oligochètes marqués génétiquement (SHDspm), de tenter de rendre cette méthode génétique applicable en routine, et d'enrichir la base de données de référence suisse des séquences COI des oligochètes aquatiques.

Les autres objectifs du projet sont de continuer à tester des méthodes de metabarcoding DNA(e), incluant l'analyse de l'ADN extrait de mélanges de spécimens d'oligochètes (SHDmél) et de l'éthanol préservant les sédiments tamisés (SHDéth). En complément, une expérimentation a été réalisée au laboratoire pour tester la méthode de metabarcoding ADNe sur de l'eau porale récupérée après exposition d'oligochètes dans des aquariums contenant du sédiment (présentation de l'approche et des résultats uniquement en Annexe 1 et Annexe 2 Tab. 1).



2 Matériel et méthodes

2.1 Sites et répartition des analyses

Au total, 25 sites ont été échantillonnés dans 8 cantons différents (Vaud, Genève, Neuchâtel, Berne, Fribourg, Soleure, Argovie et Schaffhouse) entre février 2021 et février 2022 (Tab. 1:). L'analyse morphologique (Morpho) et le séquençage à haut débit de spécimens marqués (SHDspm) ont été effectuées sur tous les sites, alors que le séquençage à haut débit de l'éthanol (SHDéth) a été effectué sur 18 sites et le séquençage à haut débit de mélanges de spécimens (SHDmél) sur 9 sites. A noter que toutes les analyses ont été effectuées en réplicat unique, sauf le SHDmél. Pour cette dernière analyse, deux fois 50 spécimens ont été analysés sur huit sites et une fois 50 spécimens sur un site (site Source, cours d'eau Tinière).

Tab. 1: Détail de l'échantillonnage des 25 sites d'OligoGen

Site	Cours d'eau	Abrév. site	Date échantillonnage	Coordonnées
Source	Benenté (VD)	BEN**	16/02/2021	540702 159720
embouchure	Boiron (VD)	BOI**	16/02/2021	526179 149801
UNIL	Chamberonne (VD)	UNIL***	25/02/2021	534341 152706
Source	Tinière (VD)	TIN***	25/02/2021	563990 140171
Source	Dou (BE)	Dou**	31/03/2021	569841 224114
Source	Eaux-Chaudes (GE)	ECH**	30/03/2021	489371 116732
Source	Graben (BE)	Grabe***	31/03/2021	574706 225325
Source	Fleurier (NE)	Fle***	31/03/2021	534367 193701
NAWA_SH_145	Landgrabe (SH)	Land***	11/05/2021	674870 279824
NAWA_BE_902	Urtenen (BE)	Urt***	07/06/2021	607585 212703
NAWA_AG_137	Möhlinbach (AG)	MOH***	07/06/2021	632608 265780
NAWA_BE_138	Chrümlisbach (BE)	Chrum***	07/06/2021	605391 219158
Spez 017	Ballmoosbach (BE)	Spez17***	09/02/2022	603217 210481
Spez 018	Kanal Burgermoos (BE)	Spez18**	28/02/2022	580316 210009
Spez 019	Richigenbach	Spez19**	09/02/2022	610773 196500
Spez 027	Le Bainoz (FR)	SP027**	09/02/2022	552124 183577
Spez 052	Le Seyon (NE)	SEY-Sp52**	28/02/2022	561900 211400
BDM_626235	Dorfbach/Schweissackerkanal (SO)	SOL**	09/02/2022	625981 235628
EPFL1	Sorge (VD)	EPF1*	13/08/2021	2°53'38.75 1°15'3'020
Taulard	Pétause (VD)	TAUL*	05/07/2021	2°53'34.5 1°15'7'176
Dorigny	Mèbre (VD)	DORI*	12/08/2021	2°53'7.983 1°15'8'932
EPFL2	Sorge (VD)	EPF2*	06/09/2021	2°53'3'113 1°15'2'951
Lavaux	Pétause (VD)	LAV*	05/07/2021	2°53'3'740 1°15'9'024
Mau-Paccot	Mèbre (VD)	MPA*	12/07/2021	2°53'6'027 1°15'9'239
Cugy	Mèbre (VD)	Cugy*	12/07/2021	2°53'7'983 1°15'8'932

* sites pour lesquels seuls l'analyse Morpho et le SHDspm ont été effectués

** sites pour lesquels seuls l'analyse Morpho, le SHDspm et le SHDéth ont été effectués

*** sites pour lesquels l'analyse Morpho, le SHDspm, le SHDéth et le SHDmél ont été effectués

Pour pouvoir rendre la méthode SHDspm applicable en routine, nous avons testé sur quatre sites (S2, S6, S1, S9) si nous pouvions raccourcir la méthode d'extraction d'ADN avec guanidine, en effectuant les PCR directement à partir de la guanidine diluée. Les résultats ont été positifs, i.e. le fragment COI de tous les spécimens (48 par site) a pu être amplifié et séquencé. Cette méthode utilisant une extraction d'ADN raccourcie a donc été retenue pour le projet OligoGen. De plus, nous avons testé sur deux autres sites (Sor, VEN) s'il était possible d'extraire l'ADN de l'éthanol préservant le matériel tamisé. Les résultats ont montré une grande diversité de séquences d'oligochètes et des nombres de reads correspondant aux oligochètes élevés dans les échantillons d'éthanol. Nous avons donc décidé d'analyser l'éthanol conservant le refus du tamis dans le cadre du projet OligoGen. Comme une analyse morphologique a été effectuée en parallèle sur les échantillons de cette étude préliminaire, les résultats de ces six sites (Tab. 2:) ont pu être utilisés et incorporés dans les tableaux de résultats.



Tab. 2: Détail de l'échantillonnage des six sites des études préliminaires

Site	Cours d'eau	Abrév. site	Date échantillonnage	Coordonnées
BN2	Bras-Neuf (VS)	S2*	18/11/19	2°56'382 1°12'4882
ST06	Stockalper (VS)	S6*	21/11/19	2°56'460 1°12'563
I1	canal des îles (VS)	S1*	18/11/19	2°56'4591 1°12'3481
ST09	Stockalper (VS)	S9*	21/11/19	2°55'768 1°13'3726
UNIL	Sorge (VD)	Sor**	2021	2°53'767 1°15'2765
Amont STEP	Venoge (VD)	VEN**	2021	2°53'1895 1°15'5129

* sites pour lesquels seuls l'analyse Morpho et le SHDspm ont été effectués

** sites pour lesquels seuls l'analyse Morpho et le SHDéth ont été effectués

2.2 Prélèvement et tamisage des échantillons pour les analyses morphologiques et génétiques

Les échantillons de sédiments ont été prélevés et tamisés en suivant les procédures de la norme française AFNOR (AFNOR, 2016). Sur chaque site, les 10 premiers centimètres de sédiments ont été prélevés à l'aide d'un filet de type Surber (vide de maille de 0,2 mm) à trois endroits différents espacés de 5-20m. Les sédiments d'un même site ont été combinés et fixés avec du formol tamponné à pH neutre env. 20% (ThermoFisher Scientific, Ecublens, Suisse) selon le protocole proposé par Vivien et al. (2018), pour obtenir une concentration finale de formaldéhyde de 4%. Le formol fixe de manière optimale les oligochètes. Une étude a montré que la fixation des oligochètes avec du formol tamponné à pH neutre 4 % et la conservation des oligochètes dans ce milieu pendant une durée allant jusqu'à 30 jours convenaient pour les analyses génétiques ultérieures (Vivien et al., 2018). Les échantillons de sédiments ont été stockés à 4°C pendant 1 à 5 jours avant le tamisage, puis tamisés à travers une colonne de tamis à mailles de 5 mm et 0,5 mm. Le matériel retenu sur le tamis de 0,5 mm a été transféré dans une boîte Tupperware et conservé dans de l'éthanol absolu (150-250 ml, suivant la quantité de matériel tamisé) à -20°C.

2.3 Préparation des échantillons pour la méthode SHDéth

Une fois l'éthanol ajouté au matériel tamisé (juste après le tamisage), l'éthanol des 18 échantillons destinés aux analyses génétiques de l'éthanol a été récupéré après 24h. Il a tout d'abord été transféré dans un récipient de 5L (préalablement bien nettoyé) en le faisant passer à travers un tamis avec un vide de maille de 0,2mm, pour s'assurer qu'aucun oligochète ne soit présent dans l'éthanol. Immédiatement après ce transfert, de l'éthanol absolu a été remis dans les boîtes Tupperware qui ont été conservées à -20°C. Puis, l'éthanol a été transféré du récipient de 5L dans des tubes Falcon de 50ml (3-5 tubes par site). Ces échantillons d'éthanol ont été conservés à -20°C pendant un mois environ avant d'effectuer les analyses génétiques.

2.4 Tri des spécimens pour l'étude Morpho, le SHDspm et le SHDmél

Le tri des spécimens a été effectué selon les directives de la norme française AFNOR (AFNOR, 2016). Pour chaque site, les sédiments tamisés (conservés dans de l'éthanol absolu) ont été transférés dans une cuve de sous-échantillonnage en plexiglas (5 x 5 cases), et le contenu de cases, ou de fractions de case en cas de fortes densité d'oligochètes, sélectionnées au hasard a été transféré dans des boîtes de Pétri et examiné à l'aide d'une loupe binoculaire sur fond noir, jusqu'à ce que 100 spécimens pour la Morpho, 48 spécimens pour le SHDspm et une ou deux fois 50 spécimens pour le SHDmél aient été récoltés. Les oligochètes ainsi sortis pour chacune des trois analyses ont ensuite été conservés dans de l'éthanol absolu (dans des flacons en verre avec vis) à -20°C.



2.5 Préparation des spécimens pour la Morpho et identifications

Les 100 oligochètes sortis ont été montés (la partie antérieure seulement pour les grands spécimens) sur des lames dans une solution d'enrobage composée d'acide lactique, de glycérol et d'alcool polyvinylique (Reymond, 1994). Les spécimens d'oligochètes ont été identifiés au niveau taxonomique le plus bas (espèce si possible) à l'aide d'un microscope.

2.6 Préparation des échantillons pour la méthode SHDspm

Les 48 spécimens de chaque site ont été placés dans les puits (un spécimen par puit) d'une plaque de 96 puits (Sarstedt, réf. 72.1979.102) dans lesquels un volume d'éthanol absolu de 0,03 ml a été préalablement ajouté (une plaque peut donc contenir les spécimens de 2 sites). La taille des spécimens d'un échantillon peut fortement varier, de 1-2 mm à plusieurs centimètres. Les spécimens de très petite taille (par ex. les espèces *Cernosvitoviella* spp., *Marionina argentea* ou les individus immatures de Tubificinae et Lumbriculidae) ont été transférés dans les puits en entier, alors que seule la partie postérieure des spécimens de plus grande taille (plus de 5 mm) a été transférée dans les puits. Les puits ont été fermés à l'aide de couvercles en plastiques (Brand, réf. BR781413) et les plaques ont été stockées à -20°C.

2.7 Préparation des échantillons pour la méthode SHDmél

Comme mentionné précédemment, une fois 50 spécimens (un site) ou deux fois 50 spécimens (huit sites) ont été sortis par site (donc 17 échantillons ont été préparés au total). Comme la taille des spécimens varie considérablement au sein d'un même échantillon, des quantités de tissu équivalentes entre les spécimens ont été préparés afin de limiter l'impact de la biomasse sur le nombre des séquences obtenues, et donc sur les pourcentages des espèces. Les individus de très petite taille ont été inclus dans le mélange en entier (par ex. les espèces *Cernosvitoviella* spp., *Marionina argentea* ou les individus immatures de Tubificinae et Lumbriculidae) et les spécimens de plus grande taille ont été découpés, de sorte que la quantité de tissu des fragments soit similaire à celle des plus petits spécimens de l'échantillon. Les 50 spécimens et fragments de spécimens d'un même échantillon ont été mélangés dans un tube Eppendorf (un tube par échantillon) contenant environ 100ul d'éthanol absolu. Les mélanges de spécimens ont été conservés à -20°C.

Il a été noté ce qui a été mis dans les mélanges, mais la plupart des individus ont été identifiés à la famille ou sous-famille. Seules les abondances des espèces *Emboliocephalus velutinus* et *Chaetogaster diaphanus* ont été relevées. Pour certains échantillons, la part des tubificidés sans et avec soies capillaires a été déterminée.

2.8 Extraction d'ADN et amplification par PCR

2.8.1 Méthode SHDspm

Avant l'extraction de l'ADN, les échantillons ont été séchés pendant 24 heures à température ambiante.

L'ADN génomique total a été extrait en appliquant une méthode thiocyanate de guanidine (Tkach et Pawlowski, 1999) raccourcie. Un volume de 30 µl de guanidine a été ajouté dans chaque puit (contenant un spécimen ou fragment de spécimen) de la plaque et la plaque a été incubée à 60°C pendant 12h. Ensuite, une certaine quantité de guanidine (contenant l'ADN) de chaque puit a été transférée dans les puits d'une autre plaque en diluant la guanidine 100 fois.

Les primers spécifiques des métazoaires « mCOLintF » et « dgHCO2198 » (Leray et al., 2013) ont été utilisés pour amplifier un court fragment (313 paires de bases) du gène COI de chaque extrait d'ADN. Les amplifications PCR ont été réalisées dans un volume total de 25 µl contenant 0,1 µl de FastStart™ Taq polymérase 5U/µl (Sigma-Aldrich), 2,5 µl de tampon PCR (concentré



10x) avec $MgCl_2$ (Roche), 0,5 μ l de chaque primer (10 μ M chacun), 0,5 μ l d'un mélange contenant 10 mM de chaque dNTP (Roche), 0,1 μ l d'albumine de sérum bovin à 50mg/ml et 1 μ l de matrice d'ADN. La PCR suivait le programme du type « touchdown » pour augmenter la spécificité des amplifications. La PCR commençait par une incubation à 95°C pendant 5min, suivie des 16 premiers cycles qui comportaient : la dénaturation pendant 10s à 95°C, annealing pendant 30s à une température de 62°C diminuant de 1°C à chaque cycle (47°C au 16e cycle) et l'élongation pendant 60s à 72°C. Ces 16 premiers cycles étaient suivis de 35 cycles qui comportaient les mêmes étapes mais avec une température d'annealing de 46°C.

Le produit de PCR de chaque spécimen a été visualisé sur un gel d'agarose (électrophorèse). Pour les spécimens sans bande visible sur gel, la PCR a été répétée en diluant la guanidine (contenant l'ADN) 100 fois (à nouveau) et 300 fois. Pour ces spécimens, le produit de PCR montrant sur gel la bande la plus nette (100 ou 300 fois) a été utilisé.

2.8.2 Méthode SHDmél

Avant l'extraction d'ADN, une partie de l'éthanol surnageant a été enlevée de chaque tube et les mélanges de spécimens ont été séchés pendant 12h à température ambiante.

L'ADN génomique total a été extrait dans chaque tube en utilisant le kit Blood and Tissue (Qiagen), en incluant une incubation de 24h à 56°C dans le tampon de lyse.

Les primers utilisés et le programme de la PCR sont identiques à ceux décrits dans la section 2.8.1. Trois PCR ont été effectuées par échantillon et les produits des 3 PCR ont été combinés.

2.8.3 Méthode SHDéth

L'éthanol préparé pour chaque échantillon a été filtré en utilisant des filtres en microfibres de verre, Grade GF/F (Whatman) avec vide de maille de 0,7 μ m. Puis les filtres ont été séchés pendant 3h à température ambiante avant de procéder à l'extraction de l'ADN en utilisant le kit Blood and Tissue (Qiagen). D'abord, les filtres secs ont été incubés avec 360 μ l du tampon ATL et 40 μ l de protéinase K pendant 24h à 56°C. Le lysat a été récupéré en centrifugeant 3 min à 5000 rpm. Ensuite, l'ADN a été extrait du lysat en suivant les instructions du kit, avec le volume de 400 μ l pour le tampon AL et l'éthanol. L'élution finale a été effectuée dans 100 μ l du tampon AE.

Les primers utilisés et le programme de la PCR sont identiques à ceux décrits dans la section 2.8.1. Trois PCR ont été effectuées par échantillon et les produits des 3 PCR ont été mélangés.

2.9 Marquage des primers, préparation des librairies et séquençage Illumina

Des primers marqués portant 8 nucléotides attachés à l'extrémité 5' de chaque primer ont été utilisés. Une combinaison unique de primers marqués a été utilisée pour chaque spécimen (méthode SHDspm) et pour chaque échantillon (SHDmél et SHDéth) afin de multiplexer tous les spécimens ou échantillons dans une librairie de séquençage unique (Esling et al., 2015). Le produit de PCR de chaque spécimen et échantillon a ensuite été quantifié par électrophorèse capillaire à l'aide de l'instrument QIAxcel (Qiagen, Hilden, Allemagne). Des concentrations équimolaires de produits de PCR ont été regroupées dans un seul tube (un tube par site pour le SHDspm et un tube pour l'ensemble des sites ou échantillons pour le SHDmél et le SHDéth). L'ADN de chaque tube a ensuite été purifié à l'aide du kit PCR High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics).

Une librairie par site a ensuite été préparée pour la méthode SHDspm, alors que pour les méthodes SHDmél et SHDéth, l'ensemble des échantillons ont été incorporés dans une seule librairie. Les librairies ont été préparées à l'aide du kit TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation (Illumina) en suivant les instructions du kit pour inclure un index unique comme étiquette pour



chaque librairie. Les librairies ont été quantifiées par qPCR à l'aide du kit KAPA Library Quantification (Roche). Enfin, les librairies ont été séquencées sur un instrument MiSeq en utilisant un séquençage apparié pendant 500 cycles.

2.10 Analyse des séquences et assignation taxonomique

Des analyses bioinformatiques ont été réalisées à l'aide du pipeline SLIM (Dufresne et al., 2019). Les reads bruts fastq ont été filtrés par qualité en supprimant toute séquence avec une moyenne de score de qualité inférieure à 30 et en supprimant toutes les séquences avec des bases ambiguës ou tout mésappariement avec le primer marqué. Les séquences en paire ont ensuite été assemblées, les chimères retirées et les séquences regroupées en ASV (Amplicon Sequence Variants) à l'aide de l'algorithme dada2 du R package (Callahan et al., 2016).

Pour assigner taxonomiquement les séquences, nous avons considéré que les séquences divergeant de moins de 10% appartenaient à la même espèce, à l'exception des espèces des genres *Nais* et *Uncinai*s (seuil de 8%) (Vivien et al., 2017). Les séquences obtenues (SHDspm, SHDmél et SHDéth) ont d'abord été assignées taxonomiquement en utilisant notre base de données de référence COI suisse (Vivien et al., 2020b) en utilisant les algorithmes VSEARCH (Rognes et al., 2016) avec 90% de similitude, calculée comme le nombre d'appariements/(longueur d'alignement moins le nombre de lacunes terminales). Ensuite, chaque séquence non assignée à l'aide de notre base de données de référence a été comparée aux séquences de la base de données GenBank (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Concernant la méthode SHDspm, les séquences qui ne pouvaient pas être assignées à l'aide de ces bases de données ont été identifiées en construisant des arbres phylogénétiques (comprenant les séquences de notre base de données et les nouvelles séquences). Les spécimens assignés taxonomiquement à l'aide de ces arbres ont été identifiés au niveau de la famille ou de la sous-famille. Les identifications incertaines de lignées à l'aide de Genbank (divergence génétique significative entre les séquences de GenBank et nos séquences) ont été vérifiées en construisant des arbres phylogénétiques et en calculant les distances génétiques. Concernant les méthodes SHDmél et SHDéth, les séquences de GenBank divergeant jusqu'à 20% avec nos séquences et correspondant aux oligochètes aquatiques et Lumbricidae ont été analysées en les incorporant dans un arbre phylogénétique (comprenant les séquences de notre base de données et les nouvelles séquences) pour vérifier les assignations (si nécessaire, calcul des distances génétiques), assigner les séquences (par ex. à la famille ou sous-famille) et vérifier si plusieurs séquences appartenaient à une même lignée. Pour construire les arbres phylogénétiques, la méthode Neighbour joining a été appliquée à l'aide du programme Seaview v.4.4.0 (Gouy et al., 2010), avec 1000 réplicats de bootstrap. Les distances génétiques (p-distances) ont été calculées à l'aide du programme MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011).

L'assignation des séquences du SHDéth a été effectuée une fois la base de données COI de référence mise à jour suite au travail de séquençage Sanger de spécimens sélectionnés (barcoding) et à l'application de la méthode SHDspm. L'assignation des séquences du SHDmél a été effectuée une fois la base de données COI de référence mise à jour suite à l'application de la méthode SHDéth.

2.11 Indice oligochètes et diagnostic écologique complémentaire

Pour évaluer la qualité biologique des sédiments fins/sableux des cours d'eau, nous avons appliqué le calcul de l'indice IOBS (AFNOR, 2016 ; Vivien et al., 2020a) aussi bien avec les données génétiques qu'avec les données morphologiques selon la formule suivante :

$$\text{IOBS} = 10S^T^{-1}$$

où S est le nombre total de taxons identifiés par échantillon, et T est le pourcentage de tubificidés avec ou sans soies capillaires dominant dans l'échantillon de sédiment (vers matures et immatures combinés). Les tubificidés comprennent les sous-familles Tubificinae, Rhyacodrilinae et



Phallo-drilinae. L'indice classe la qualité biologique des sédiments comme suit : IOBS ≥ 6 : très bonne, 3 - 5,9 : bonne, 2 - 2,9 : moyenne, 1 - 1,9 : médiocre, < 1 : mauvaise.

Vivien et al. (2019) ont proposé de modifier le calcul de l'indice IOBS pour évaluer la qualité biologique de sédiments de cours d'eau à partir de données de séquençage à haut débit d'ADN(e) extrait d'échantillons de sédiment total, de sédiments tamisés et de mélanges de spécimens, selon la formule suivante :

$$\text{IOBS}_{\text{gen}} = 10 \text{ST}_{\text{tot}}^{-1}$$

où S est le nombre total de taxons identifiés par échantillon, et T_{tot} est le pourcentage de tubificidés totaux (avec et sans soies capillaires, vers matures et immatures combinés). Vivien et al. (2019) ont en plus proposé, pour les données de metabarcoding basées sur l'analyse de l'ADN extrait de mélanges de spécimens, de modifier les limites des classes de qualité biologique selon : IOBS_{gen} ≥ 3 : très bonne qualité, 2 - 2,9 : bonne, 1,5 - 1,9 : moyenne, 0,6 - 1,4 : médiocre, $\leq 0,5$: mauvaise. La limite de chaque classe de qualité doit en effet être abaissée étant donné la plus grande valeur du dénominateur qui résulte de cette modification de calcul.

Dans cette étude, l'espèce *Emboloccephalus velutinus* (Tubificinae avec soies capillaires) n'a pas été prise en compte dans le calcul du pourcentage de tubificidés avec soies capillaires (et tubificidés totaux) car cette espèce est sensible aux pollutions (Lafont, 1989), contrairement aux autres espèces de Tubificinae. Une modification de la norme sur ce point serait nécessaire. Comme cette espèce est généralement en faible abondance dans les cours d'eau, il n'a pas été précisé dans la norme que cette espèce ne devait pas être incluse dans le % des Tubificinae. Dans notre étude, cette espèce a été abondante sur le site source (Dou) et assez abondante sur le site Source (Fleurier), et il a donc fallu adapter le calcul de l'indice.

Pour la morphologie, lorsque les pourcentages de tubificidés sans et avec soies capillaires étaient de 0, le nombre de taxons a été divisé par 1% pour pouvoir obtenir une note d'indice. Pour les données génétiques, lorsque les pourcentages de tubificidés sans et avec soies capillaires étaient de 0 ou inférieurs à 1%, le nombre de taxons a été divisé par 1%, ceci pour permettre d'obtenir une note d'indice et pour éviter que les valeurs d'IOBS soient extrêmement élevées (par ex. >3000).

Dans le cadre des suivis de la qualité biologique des cours d'eau, une analyse des pourcentages des taxons présents dans l'échantillon est également effectuée, les indices biologiques étant par essence réducteurs d'information. Cette analyse permet de compléter le diagnostic de qualité biologique, et parfois de le corriger. Par ex., un pourcentage élevé d'une espèce (autre que Tubificinae) plutôt résistante à résistante aux pollutions (par ex. *Nais elinguis*) dans un échantillon suggère la présence d'une pollution de type chimique malgré la qualité biologique satisfaisante indiquée par l'IOBS. Autre exemple, dans le cas de deux sites présentant une qualité biologique médiocre indiquée par l'IOBS, si l'un présente un pourcentage significatif d'espèces sensibles aux pollutions (par ex. *Marionina argentea*), il peut être considéré comme étant moins impacté que l'autre site présentant un pourcentage nul ou faible d'espèces sensibles.

2.12 Analyse des données génétiques et analyses statistiques

La pertinence des méthodes génétiques a été évaluée en comparant leurs résultats à ceux de la méthode Morpho, qui seule a été validée sur la base d'un grand nombre de données sur la relation entre le gradient de pollution chimique des sédiments et la structure des communautés d'oligochètes (Vivien et al., 2020a). Les données des méthodes SHD_{éth} et SHD_{mél} ont également été comparées à celles de la méthode SHD_{spm}.

Comme cette dernière méthode apporte des informations fiables et précises sur les abondances des différentes lignées présentes dans un échantillon, cette comparaison (SHD_{spm} avec SHD_{éth} et SHD_{mél}) permet entre autres de mettre en évidence les lignées dont l'abondance est systématiquement surestimée ou sous-estimée par les méthodes de metabarcoding et donc d'étudier



les possibilités d'appliquer des facteurs de correction aux nombres de reads des lignées dont l'abondance est constamment surestimée ou sous-estimée par les méthodes de metabarcoding.

Des analyses de régression linéaire entre les valeurs de l'indice IOBS et les pourcentages des familles/sous-familles qui étaient les plus fréquentes dans nos échantillons (Tubificinae avec soies capillaires, Tubificinae sans soies capillaires, Tubificinae totaux, Naidinae, Lumbriculidae et Enchytraeidae) obtenus à l'aide des données morphologiques d'une part et génétiques d'autre part ont été réalisées. Pour chaque relation, nous avons déterminé le coefficient de détermination R^2 et appliqué le test de Pearson (Excel Microsoft corporation ; Free Statistics and Forecasting Software, Wessa, 2023).

L'analyse des données inclut une comparaison des abondances des espèces, sous-familles et familles entre morphologie et génétique étant donné que d'éventuels biais des abondances obtenues avec les analyses génétiques peuvent d'une part entraîner des différences de notes d'indice entre la morphologie et la génétique, et d'autre part un diagnostic écologique complémentaire peu fiable sur la base de l'analyse des pourcentages des taxons présents dans l'échantillon.

2.13 Enrichissement de la base de données COI de référence

La base de données des séquences COI des oligochètes aquatiques a été enrichie de deux manières différentes :

- En sélectionnant des spécimens provenant de différents sites et milieux et en identifiant morphologiquement et par séquençage Sanger chacun d'entre eux (approche barcoding)
- Par les analyses des séquences des spécimens marqués (SHDspm), des mélanges de spécimens (SHDmél) et des échantillons d'éthanol (SHDéth).

La partie postérieure (environ 0,5 cm) des spécimens sélectionnés a été coupée et conservée dans de l'éthanol absolu à -20°C (dans des tubes Ependorf) pour les analyses génétiques. La partie antérieure de ces spécimens, ainsi que celle de certains spécimens (env. 20 par site) utilisés pour la méthode SHDspm, a été montée sur lame selon la procédure décrite dans le § 2.5 et les spécimens ont été identifiés à l'espèce (si possible) par microscopie.

Un fragment de 658 paires de bases du gène COI de chaque individu a été séquençé (barcoding). L'ADN génomique total a été extrait en appliquant la méthode thiocyanate de guanidine décrite par Tkach & Pawlowski (1999). Nous avons utilisé les primers LCO 1490 et HCO 2198 (Folmer et al., 1994) pour amplifier le fragment COI. Les amplifications PCR ont été réalisées dans un volume total de 20 µl contenant 0,2 µl de Taq polymérase 5U/µl (Roche, Bâle, Suisse), 2 µl de tampon PCR (concentré 10x) avec $MgCl_2$ (Roche), 0,5 µl de chaque amorce (10 µM chacun), 0,4 µl d'un mélange contenant 10 mM de chaque dNTP (Roche) et 1 µl du produit de l'extraction d'ADN. Le programme de la PCR comprend une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 40 s, une étape d'annealing à 44°C pendant 45 s, une élongation à 72°C pendant 1 min et une élongation finale à 72°C pendant 8 min.

Les produits de PCR ont ensuite été séquençés bidirectionnellement à l'aide de la méthode Sanger sur l'instrument Applied Biosystems 96-capillary 3730xl par la société Fasteris (Suisse) en utilisant les mêmes primers (LCO 1490 et HCO 2198) et en suivant le protocole du fabricant. L'editing des séquences brutes et la génération de séquences consensus ont été réalisées à l'aide de CodonCode Aligner (CodonCode Corporation).

Les séquences obtenues ont été visualisées sur un arbre incluant les séquences de notre base de données de référence. Pour construire cet arbre, la méthode Neighbour joining a été appliquée à l'aide du programme Seaview v.4.4.0 (Gouy et al., 2010), avec 1000 répliqués de bootstrap. Les séquences correspondant à des nouvelles lignées ont été comparées aux séquences de la base de données GenBank (BLAST). Pour l'assignation taxonomique des séquences, un seuil de 10% de variation génétique a été appliqué pour distinguer les lignées et les distances génétiques (p-distances) ont été calculées à l'aide du programme MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011).



3 Résultats

3.1 Succès du séquençage et assignations taxonomiques (méthodes SHDspm, SHDéth et SHDmél)

Concernant la méthode de SHDspm, sur chaque site, une grande majorité des spécimens a pu être séquençée, le taux de succès de séquençage s'élevant à 97,55%, et les séquences obtenues ont pu toutes être assignées taxonomiquement en utilisant notre base de données de référence (57% des lignées obtenues), GenBank (22%) et en construisant des arbres (20%). Concernant les méthodes SHDéth et SHDmél, sur chaque site, un grand nombre de reads correspondant aux oligochètes et une diversité d'oligochètes significative ont été obtenus. Les séquences obtenues ont été assignées en utilisant notre base de données (83% et 90% des lignées obtenues, respectivement) et GenBank (17% et 10%, respectivement).

3.2 Diversité obtenue avec la morphologie et les méthodes génétiques

Chacune des méthodes génétiques a permis d'obtenir un nombre total de taxons (sur l'ensemble des sites) nettement plus élevé que l'analyse morphologie (Annexe 2 Tab. 2-7) : 103 lignées pour la méthode SHDspm contre 49 pour la Morpho (29 sites), 98 lignées pour la méthode SHDéth contre 51 pour la Morpho (20 sites) et 60 lignées pour la méthode SHDmél contre 39 pour la Morpho (9 sites) (Tab. 3:). C'est en particulier au sein des Enchytraeidae (3 méthodes génétiques), des Tubificinae (3 méthodes génétiques) et des Naidinae (méthode SHDéth) que la génétique a permis de détecter un nettement plus grand nombre de taxons que la morphologie. L'identification des Enchytraeidae est pour la grande majorité des espèces très difficile (une expertise est nécessaire) et n'est le plus souvent possible que lorsque les spécimens sont à l'état mature. De plus, les Enchytraeidae comprennent des espèces cryptiques. Le nombre plus important de taxons de Tubificinae obtenus génétiquement est expliqué par le fait que cette sous-famille comprend un grand nombre d'espèces cryptiques et d'espèces identifiables que lorsque les individus sont à l'état mature. Les Naidinae comprennent également des espèces cryptiques et la méthode SHDéth a permis de détecter des espèces de cette sous-famille probablement très peu abondantes dans les échantillons. Par ex., l'espèce *Chaetogaster limnaei* (Naidinae), détectée uniquement par la génétique sur un des sites, est une espèce très rare en Suisse.

Tab. 3: Nombres de taxons d'Enchytraeidae, Naidinae, Tubificinae, Pristininae, Rhyacodrilinae, Lumbriculidae, Haplotaxidae, Lumbricidae et Oligochaeta sp. obtenus pour l'analyse morphologique (Morpho) et le séquençage des spécimens marqués (SHDspm ; 29 sites), pour l'analyse Morpho et le séquençage à haut débit des échantillons d'éthanol (SHDéth ; 20 sites) et pour l'analyse Morpho et le séquençage à haut débit des mélanges de spécimens (SHDmél ; 9 sites)

	Morpho vs SHDspm		Morpho vs SHDéth		Morpho vs SHDmél	
	Morpho	SHDspm	Morpho	SHDéth	Morpho	SHDmél
Enchytraeidae	14	49	14	28	12	25
Naidinae	6	8	6	16	5	6
Tubificinae	17	30	19	34	14	20
Pristininae	1	2	1	1	0	1
Rhyacodrilinae	3	3	3	4	3	2
Lumbriculidae	5	6	5	9	2	3
Haplotaxidae	1	1	1	1	1	1
Lumbricidae	2	4	2	4	2	2
Oligochaeta sp.	0	0	0	1	0	0
Total	49	103	51	98	39	60



3.3 Méthode Morpho vs méthode SHDspm

Les pourcentages des familles, sous-familles et groupes de Tubificinae avec et sans soies capillaires obtenus avec les données morphologiques et génétiques sont globalement très concordants (Tab. 4:).

Les corrélations entre les pourcentages d'Enchytraeidae, de Lumbriculidae, de Naidinae et de Tubificinae (totaux et regroupés en avec et sans soies capillaires) obtenues morphologiquement et génétiquement sont toutes très significatives (Tab. 5:).

Par contre, des discordances concernant les nombres de taxons peuvent être observées sur plusieurs sites. Le nombre de taxons identifiés génétiquement est par ex. nettement plus élevé dans les échantillons BEN et Cugy contenant un pourcentage élevé d'Enchytraeidae, dont les espèces sont pour la plupart non identifiables morphologiquement.

Les diagnostics écologiques établis sur la base des notes d'IOBS obtenues à partir des données morphologiques et génétiques sont pour la plupart concordantes (env. 80% des cas). Les corrélations entre les valeurs d'IOBS obtenues génétiquement et morphologiquement sont très significatives. On observe cependant six discordances de type objectif de bonne qualité biologique atteint/non atteint, dont 5 sont légères (qualité moyenne/bonne qualité), et 3 présentent des notes d'indices proches. Les 3 discordances présentant des différences de notes d'indices assez importantes (SPO27, Fle et UNIL) sont expliquées par des nombres de taxons obtenus très différents. Dans l'échantillon SPO27, le plus grand nombre de taxons obtenu génétiquement est expliqué par la détection d'espèces d'Enchytraeidae non ou difficilement identifiables morphologiquement et d'espèces cryptiques de *Tubifex tubifex* et de *Limnodrilus hoffmeisteri*. Dans le cas des deux autres échantillons, le plus grand nombre de taxons obtenu morphologiquement peut être entre autres dû au hasard du tri des spécimens et au fait qu'un plus grand nombre de spécimens a été identifié morphologiquement que génétiquement.



Tab. 4: Pour chaque site, de TIN à Sor, indication du nombre de taxa (Nb taxa), pourcentages des familles, sous-familles, groupes de Tubificinae avec et sans soies capillaires et valeurs d'IOBS obtenues à partir des données de la Morpho, du séquençage à haut débit de spécimens marqués (SHDspm), du séquençage à haut débit de l'éthanol (SHDéth) et du séquençage à haut débit des mélanges de spécimens (SHDmél, mélanges 1 et 2) ; les cases grises surlignent les discordances importantes entre les données morphologiques et génétiques ; pour les résultats d'IOBSgen de la méthode SHDéth, la limite supérieure de la classe de qualité moyenne a été modifiée de sorte qu'elle se situe à IOBSgen=3,5 ; pour les résultats d'IOBSgen de la méthode SHDmél, les classes de qualité biologique ont été modifiées, selon : IOBSgen ≥ 3 : très bonne qualité, 2 - 2,9 : bonne qualité, 1,5 - 1,9 : qualité moyenne, 0,6 - 1,4 : qualité médiocre, ≤ 0,5 : mauvaise qualité

Site		Nb taxa	Naidinae	Enchytraeidae	Lumbriculidae	Haplotaixidae	Pristinae	Rhyacodrilinae (sans soies capillaires)	Lumbricidae	Tubificinae avec soies capillaires	Tubificinae avec soies capillaires sans E. velutinus	Tubificinae sans soies capillaires	Tubificinae totaux	IOBS	IOBSgen
TIN	Morpho	16	1,04%	60,42%	34,38%	0,00%	0,00%	0,00%	4,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	160	
	SHDspm	14	0,00%	54,17%	39,58%	0,00%	0,00%	2,08%	4,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	67	
	SHDéth	17	0,00%	3,12%	93,71%	0,00%	0,00%	0,00%	2,28%	0,01%	0,01%	0,00%	0,01%	170	170
	SHDmél1	13	0,00%	11,32%	88,49%	0,00%	0,00%	0,00%	0,19%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	130	130
Spez17	Morpho	11	0,00%	7,92%	7,92%	0,00%	0,00%	5,94%	0,00%	40,59%	40,59%	37,62%	78,22%	2,53	
	SHDspm	13	0,00%	4,26%	6,38%	0,00%	0,00%	8,51%	0,00%	46,81%	46,81%	34,04%	80,85%	2,78	
	SHDéth	18	0,00%	0,00%	0,67%	0,00%	0,09%	0,14%	0,01%	75,89%	75,89%	23,19%	99,08%	2,37	1,81
	SHDmél1	13	0,00%	0,21%	4,04%	0,00%	1,50%	0,28%	0,00%	91,74%	91,74%	2,23%	93,97%	1,42	1,38
	SHDmél2	12	0,00%	0,01%	0,87%	0,00%	0,00%	0,09%	0,00%	79,55%	79,55%	19,48%	99,03%	1,51	1,21
Grab	Morpho	11	0,00%	10,31%	74,23%	4,12%	0,00%	4,12%	2,06%	5,15%	0,00%	0,00%	5,15%	26,7	
	SHDspm	6	0,00%	22,92%	64,58%	2,08%	0,00%	0,00%	0,00%	10,42%	0,00%	0,00%	10,42%	60	
	SHDéth	10	0,00%	0,39%	99,29%	0,27%	0,00%	0,03%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%	100	100
	SHDmél1	10	0,00%	5,11%	94,35%	0,13%	0,00%	0,05%	0,00%	0,36%	0,00%	0,00%	0,36%	100	100
	SHDmél2	8	0,01%	20,54%	78,41%	1,03%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	80	80
Fle	Morpho	14	6,60%	22,64%	27,36%	0,94%	0,00%	0,00%	0,94%	11,32%	0,94%	30,19%	41,51%	4,64	
	SHDspm	9	2,08%	14,58%	37,50%	0,00%	0,00%	0,00%	2,08%	12,50%	0,00%	31,25%	43,75%	2,88	
	SHDéth	14	0,05%	1,09%	91,86%	2,03%	0,00%	0,00%	0,22%	0,76%	0,00%	3,98%	4,74%	35,2	35,2
	SHDmél1	13	0,34%	2,40%	35,24%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,42%	0,00%	57,59%	62,02%	2,26	2,26

Site		Nb taxa	Naidinae	Enchytraeidae	Lumbricidae	Haplotaenidae	Pristinae	Rhyacodrilinae (sans soies capillaires)	Lumbricidae	Tubificinae avec soies capillaires	Tubificinae avec soies capillaires sans E. velutinus	Tubificinae sans soies capillaires	Tubificinae totaux	IOBS	IOBSgen
	SHDmél2	11	0,07%	20,59%	19,13%	3,71%	0,00%	0,00%	0,30%	0,18%	0,00%	56,01%	56,20%	1,96	1,96
Chrum	Morpho	11	0,00%	0,00%	0,95%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	57,14%	57,14%	41,90%	99,05%	1,93	
	SHDspm	8	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	2,13%	0,00%	61,70%	61,70%	36,17%	97,87%	1,30	
	SHDéth	15	0,00%	0,00%	0,19%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	78,58%	78,58%	21,22%	99,81%	1,91	1,50
	SHDmél1	11	0,00%	0,00%	0,22%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	74,44%	74,44%	25,34%	99,78%	1,48	1,10
	SHDmél2	9	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	79,81%	79,81%	20,16%	99,97%	1,13	0,90
Land	Morpho	13	34,41%	3,23%	4,30%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,30%	4,30%	53,76%	58,06%	2,42	
	SHDspm	14	34,04%	2,13%	2,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	17,02%	17,02%	44,68%	61,70%	3,13	
	SHDéth	45	6,83%	0,16%	16,22%	0,00%	0,12%	0,40%	1,61%	49,77%	49,77%	24,89%	74,66%	9,04	5,99
	SHDmél1	12	3,29%	2,23%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	80,23%	80,23%	14,25%	94,48%	1,50	1,27
	SHDmél2	14	24,50%	0,02%	0,05%	0,00%	0,00%	0,10%	0,00%	38,57%	38,57%	36,76%	75,33%	3,63	1,86
Urt	Morpho	10	26,26%	0,00%	7,07%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	42,42%	42,42%	24,24%	66,67%	2,36	
	SHDspm	12	23,91%	0,00%	4,35%	0,00%	0,00%	2,17%	0,00%	39,13%	39,13%	30,43%	69,57%	3,07	
	SHDéth	18	1,59%	0,00%	28,45%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	64,52%	64,52%	5,43%	69,95%	2,79	2,57
	SHDmél1	10	0,25%	0,00%	2,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	53,84%	53,84%	43,47%	97,31%	1,86	1,03
	SHDmél2	6	0,08%	0,00%	0,95%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	72,68%	72,68%	26,29%	98,97%	0,83	0,61
UNIL	Morpho	9	72,00%	2,00%	2,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,00%	4,00%	20,00%	24,00%	4,50	
	SHDspm	3	81,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	6,25%	6,25%	12,50%	18,75%	2,40	
	SHDéth	16	1,74%	0,00%	1,68%	0,00%	0,04%	0,00%	0,00%	86,92%	86,92%	9,62%	96,54%	1,84	1,66
	SHDmél1	8	2,14%	0,07%	2,49%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	95,29%	95,30%	0,84	0,84
	SHDmél2	9	0,27%	0,00%	1,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	46,79%	46,79%	51,76%	98,55%	1,74	0,91
MOH	Morpho	8	5,94%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	21,78%	21,78%	72,28%	94,06%	1,11	



Site		Nb taxa	Naidinae	Enchytraeidae	Lumbricidae	Haplotaenidae	Pristinae	Rhyacodrilinae (sans soies capillaires)	Lumbricidae	Tubificinae avec soies capillaires	Tubificinae avec soies capillaires sans E. velutinus	Tubificinae sans soies capillaires	Tubificinae totaux	IOBS	IOBSgen
	SHDspm	8	6,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	20,83%	20,83%	72,92%	93,75%	1,10	
	SHDéth	20	0,20%	0,00%	0,20%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	67,24%	67,24%	32,32%	99,56%	2,97	2,01
	SHDmél1	6	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,54%	0,54%	99,43%	99,97%	0,60	0,60
	SHDmél2	7	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,13%	0,13%	99,86%	99,99%	0,70	0,70
Dou	Morpho	11	5,71%	15,24%	6,67%	0,00%	0,00%	9,52%	2,86%	52,38%	1,90%	7,62%	60,00%	6,42	
	SHDspm	15	2,08%	16,67%	12,50%	0,00%	0,00%	10,42%	2,08%	52,08%	0,00%	4,17%	56,25%	10,3	
	SHDéth	9	0,00%	2,06%	7,51%	0,00%	0,00%	10,49%	1,44%	75,62%	0,00%	2,88%	78,50%	6,73	6,73
BOI	Morpho	9	12,24%	1,02%	5,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,06%	3,06%	78,57%	81,63%	1,15	
	SHDspm	7	7,32%	0,00%	2,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,88%	4,88%	85,37%	90,24%	0,82	
	SHDéth	12	0,19%	0,00%	4,85%	0,00%	1,59%	0,00%	0,00%	0,84%	0,84%	92,54%	93,38%	1,30	1,29
BEN	Morpho	12	6,25%	89,58%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	120	
	SHDspm	22	12,77%	61,70%	6,38%	0,00%	6,38%	0,00%	8,51%	4,26%	4,26%	0,00%	4,26%	51,7	
	SHDéth	13	0,13%	6,42%	76,05%	0,00%	1,49%	0,00%	15,88%	0,02%	0,02%	0,00%	0,02%	130	130
SEY	Morpho	11	0,00%	3,88%	29,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	20,39%	20,39%	46,60%	66,99%	2,36	
	SHDspm	12	4,26%	0,00%	40,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	21,28%	21,28%	34,04%	55,32%	3,53	
	SHDéth	28	3,35%	0,04%	3,69%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	75,34%	75,34%	17,56%	92,90%	3,72	3,01
Spez18	Morpho	10	0,00%	0,94%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	42,45%	42,45%	56,60%	99,06%	1,77	
	SHDspm	11	0,00%	0,00%	2,22%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	51,11%	51,11%	46,67%	97,78%	2,15	
	SHDéth	20	0,08%	0,00%	0,01%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	14,75%	14,75%	85,16%	99,90%	2,35	2,00
Spez19	Morpho	14	4,21%	27,37%	50,53%	0,00%	0,00%	0,00%	2,11%	1,05%	1,05%	14,74%	15,79%	9,50	
	SHDspm	11	8,89%	22,22%	62,22%	0,00%	0,00%	0,00%	2,22%	0,00%	0,00%	4,44%	4,44%	24,8	
	SHDéth	11	3,50%	0,97%	81,76%	0,00%	0,00%	0,00%	12,73%	0,04%	0,04%	1,00%	1,05%	109,9	105

Site		Nb taxa	Naidinae	Enchytraeidae	Lumbricidae	Haplotaenidae	Pristinae	Rhyacodrilinae (sans soies capillaires)	Lumbricidae	Tubificinae avec soies capillaires	Tubificinae avec soies capillaires sans E. velutinus	Tubificinae sans soies capillaires	Tubificinae totaux	IOBS	IOBSgen
SP027	Morpho	8	0,00%	13,00%	2,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	36,00%	36,00%	49,00%	85,00%	1,63	
	SHDspm	17	2,27%	20,45%	0,00%	0,00%	4,55%	2,27%	2,27%	31,82%	31,82%	36,36%	68,18%	4,40	
	SHDéth	15	0,03%	0,00%	0,29%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	82,97%	82,97%	16,70%	99,67%	1,81	1,5
SOL	Morpho	6	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	77,00%	77,00%	23,00%	100,00%	0,78	
	SHDspm	6	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	91,49%	91,49%	8,51%	100,00%	0,66	
	SHDéth	9	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	54,78%	54,78%	45,22%	100,00%	1,64	0,9
ECH	Morpho	16	1,15%	55,17%	29,89%	0,00%	1,15%	6,90%	0,00%	5,75%	5,75%	0,00%	5,75%	23,20	
	SHDspm	9	0,00%	66,67%	8,33%	0,00%	0,00%	14,58%	0,00%	10,42%	10,42%	0,00%	10,42%	6,17	
	SHDéth	11	0,00%	25,27%	66,57%	0,00%	2,09%	0,94%	0,00%	5,13%	5,13%	0,00%	5,13%	21,45	18,12
EPF1	Morpho	8	8,57%	40,95%	0,95%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	6,67%	6,67%	42,86%	49,52%	1,87	
	SHDspm	10	8,51%	44,68%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	6,38%	6,38%	40,43%	46,81%	2,47	
TAUL	Morpho	8	0,95%	0,95%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,90%	40,95%	40,00%	55,24%	96,19%	1,45	
	SHDspm	11	0,00%	4,35%	2,17%	0,00%	2,17%	0,00%	0,00%	32,61%	32,61%	58,70%	91,30%	1,87	
DORI	Morpho	11	12,75%	0,00%	0,98%	0,00%	0,98%	0,00%	0,00%	16,67%	16,67%	68,63%	85,29%	1,60	
	SHDspm	10	14,58%	0,00%	0,00%	0,00%	2,08%	0,00%	0,00%	10,42%	10,42%	70,83%	81,25%	1,41	
EPF2	Morpho	3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	33,00%	33,00%	67,00%	100,00%	0,45	
	SHDspm	10	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	2,13%	0,00%	29,79%	29,79%	68,09%	97,87%	1,42	
LAV	Morpho	7	0,00%	0,00%	6,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	91,00%	91,00%	3,00%	94,00%	0,77	
	SHDspm	4	0,00%	0,00%	8,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	91,67%	91,67%	0,00%	91,67%	0,44	
MPA	Morpho	7	0,00%	52,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	15,31%	15,31%	32,65%	47,96%	2,14	
	SHDspm	8	0,00%	51,06%	2,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,77%	12,77%	34,04%	46,81%	2,35	
Cugy	Morpho	10	5,97%	64,18%	20,90%	0,00%	1,49%	0,00%	4,48%	0,00%	0,00%	2,99%	2,99%	33,5	



Site		Nb taxa	Naidinae	Enchytraeidae	Lumbricidae	Haplotaenidae	Pristinae	Rhyacodrilinae (sans soies capillaires)	Lumbricidae	Tubificinae avec soies capillaires	Tubificinae avec soies capillaires sans E. velutinus	Tubificinae sans soies capillaires	Tubificinae totaux	IOBS	IOBSgen
	SHDspm	17	12,50%	72,92%	10,42%	0,00%	2,08%	0,00%	2,08%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	170	
S2	Morpho	5	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	75,25%	75,25%	24,75%	100,00%	0,66	
	SHDspm	5	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	82,98%	82,98%	17,02%	100,00%	0,60	
S6	Morpho	9	0,00%	0,00%	0,99%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	56,44%	56,44%	42,57%	99,01%	1,59	
	SHDspm	9	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	51,06%	51,06%	48,94%	100,00%	1,76	
S1	Morpho	5	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	86,00%	86,00%	14,00%	100,00%	0,58	
	SHDspm	5	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	91,49%	91,49%	8,51%	100,00%	0,55	
S9	Morpho	6	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	40,59%	40,59%	59,41%	100,00%	1,01	
	SHDspm	4	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	27,66%	27,66%	72,34%	100,00%	0,55	
VEN	Morpho	10	0,00%	0,97%	2,91%	0,00%	0,00%	0,97%	0,00%	4,85%	4,85%	90,29%	95,15%	1,10	
	SHDéth	10	0,01%	0,00%	69,75%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,92%	4,92%	25,32%	30,24%	3,95	3,31
Sor	Morpho	11	24,51%	1,96%	3,92%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,90%	4,90%	64,71%	69,61%	1,70	
	SHDéth	20	10,81%	0,00%	16,47%	0,00%	0,51%	0,00%	0,00%	31,22%	31,22%	40,99%	72,21%	4,88	2,77



Tab. 5: Coefficient de détermination R^2 et valeur de p (test de Pearson) des relations entre les nombres de taxons, pourcentages des familles, sous familles et groupes de Tubificinae avec et sans soies capillaires et des valeurs d'IOBS obtenus avec les analyses morphologique et génétiques (SHDspm, $n=29$; SHDéth, $n=20$; SHDmél1 et 2, $n=9-8$), et entre les valeurs d'IOBS obtenues avec l'analyse Morpho et d'IOBSgen obtenues avec les données de metabarcoding (SHDéth et SHDmél)

	SHDspm		SHDéth		SHDmél1		SHDmél2	
	R^2	p	R^2	p	R^2	p	R^2	p
Nombre de taxons	0,187	0,019	0,014	0,62	0,709	0,0044	0,484	0,055
% Naidinae	0,968	$1,03 \times 10^{-21}$	0,177	0,064	0,578	0,017	0,072	0,519
% Enchytraeidae	0,92	$2,31 \times 10^{-16}$	0,367	0,0046	0,849	0,0004	0,712	0,0084
% Lumbriculidae	0,879	$6,39 \times 10^{-14}$	0,49	0,0006	0,85	0,0004	0,981	$2,24 \times 10^{-6}$
% Tubificinae avec soies capillaires	0,959	$2,61 \times 10^{-20}$	0,35	0,0061	0,414	0,062	0,534	0,040
% Tubificinae sans soies capillaires	0,942	$3,07 \times 10^{-18}$	0,463	0,001	0,196	0,232	0,481	0,056
% Tubificinae totaux	0,979	$2,81 \times 10^{-24}$	0,633	$2,74 \times 10^{-5}$	0,676	0,0065	0,545	0,037
Indice IOBS	0,866	$2,66 \times 10^{-13}$	0,694	$5,07 \times 10^{-6}$	0,903	$8,61 \times 10^{-5}$	0,814	0,0022
Indice IOBS - IOBSgen			0,809	$7,00 \times 10^{-8}$	0,919	$4,64 \times 10^{-5}$	0,854	0,001

3.4 Méthode Morpho vs méthodes de metabarcoding ADN(e)

3.4.1 Méthode SHDéth

D'importantes différences entre les pourcentages des espèces, familles, sous-familles et groupes de Tubificinae avec et sans soies capillaires obtenus morphologiquement et génétiquement ont été observées (Tab. 4). On observe une nette sous-estimation des abondances des Naidinae et des Enchytraeidae obtenues génétiquement. Parmi les Naidinae, les abondances des espèces du genre *Nais* (*Nais* spp.) sont toutes fortement sous-estimées, en particulier *Nais elinguis* dont l'abondance sur 5 sites est 45 à 963 fois plus élevée morphologiquement. L'analyse génétique a permis de détecter un nombre significatif d'espèces d'Enchytraeidae mais le plus souvent en très faible abondance ($<1\%$). Les abondances des Lumbriculidae sont nettement surestimées au niveau de plusieurs sites (TIN, BEN, Grab, Fle, Urt, ECH, VEN et Sor). Par ex. l'échantillon VEN contient 3% de Lumbriculidae (selon l'analyse morphologique), alors que l'analyse génétique a détecté dans cet échantillon 70% de Lumbriculidae avec une large majorité des reads correspondant à l'espèce *Stygodrilus lemani*, non trouvée morphologiquement. L'abondance des Tubificinae avec soies capillaires est nettement surestimée génétiquement sur 10 sites, alors que celle des Tubificinae sans soies capillaires est nettement sous-estimée génétiquement sur 10 sites.

Les nombre de taxons par site détectés génétiquement sont plutôt élevés à très élevés. On observe sur huit sites un nombre de taxons identifiés génétiquement nettement plus élevé que celui des taxons identifiés morphologiquement (2 à 3 fois plus élevé) (Tab. 4:).

Les corrélations entre les nombres de taxons et pourcentages de Naidinae obtenus morphologiquement et génétiquement ne sont pas significatives (Tab. 5:). Les corrélations entre les pourcentages d'Enchytraeidae, Lumbriculidae et Tubificinae avec/sans soies capillaires et de Tubificinae totaux obtenus sur la base de données morphologiques et génétiques sont significatives à très significatives mais les coefficients de détermination sont plutôt bas, excepté celui de la corrélation des pourcentages de Tubificinae totaux.

Les diagnostics écologiques établis sur la base des notes d'IOBS obtenues à partir des données morphologiques et génétiques sont pour la plupart concordants (70% des cas). Les corrélations entre les valeurs d'IOBS obtenues génétiquement et morphologiquement sont très significatives. On observe six discordances de type objectif de bonne qualité atteint/non atteint, dont cinq importantes, entre les valeurs d'IOBS obtenues sur la base des données morphologiques et génétiques.



Les explications de ces discordances sont : le nombre de taxons très élevé pour les sites Sey, Land et MOH, un biais du pourcentage de tubificidés avec soies capillaires pour le site UNIL, un biais du pourcentage de tubificidés sans soies capillaires pour le site Ven et à la fois le nombre élevé de taxons et un biais du pourcentage de tubificidés sans soies capillaires pour le site Sor obtenus avec les données génétiques. Pour certains sites (par ex. Spez18, Spez17 et SP027), une concordance entre valeurs d'IOBS a été obtenue grâce à des biais des pourcentages de tubificidés sans ou avec soies capillaires obtenus avec les données génétiques.

L'application du calcul de l'indice IOBSgen permet sur le présent jeu de données de supprimer deux discordances de type objectif de bonne qualité atteint/non atteint et d'améliorer la corrélation entre les valeurs d'indice calculé avec les données morphologiques et génétiques (Tab. 4; Tab. 5). La plus grande valeur du dénominateur qui résulte de cette modification de calcul permet de rendre, pour certains sites avec un nombre de taxons très élevé, la valeur de l'IOBS plus proche de celle obtenue avec l'analyse morphologique. De plus, en modifiant la limite supérieure de la classe de qualité moyenne de sorte qu'elle se situe à IOBSgen = 3,5, on supprime deux discordances de type objectif de bonne qualité atteint/non atteint supplémentaires.

3.4.2 Méthode SHDmél

On observe quelques variations des résultats entre les réplicats d'un même site, en termes d'abondances d'espèces et de familles/sous-familles/groupes de Tubificinae avec/sans soies capillaires et de valeurs de l'IOBS. Par exemple, dans chacun des deux échantillons LAND, un seul spécimen de *Chaetogaster diaphanus* (Naidinae) a été introduit (Annexe 2 Tab. 8), alors que cette espèce a été détectée avec un pourcentage de 3,2% dans un des échantillons et de 24,3% dans l'autre échantillon.

Les nombres de taxons obtenus par l'analyse morphologique et génétiques sont globalement assez proches (Tab. 4). La corrélation entre nombre de taxons obtenus morphologiquement et génétiquement s'avère très significative pour les mélanges 1 (Tab. 5).

Des différences significatives des pourcentages d'espèces, familles/sous-familles et groupes de Tubificinae avec/sans soies capillaires sont observées entre la morphologie et la génétique. Les abondances des Enchytraeidae et Naidinae sont nettement sous-estimées par l'analyse génétique, sauf dans le mélange 2 de Fle et le mélange 2 de Grab concernant les Enchytraeidae et dans le mélange 2 de LAND concernant les Naidinae. Dans ce dernier échantillon, le % élevé (24,5%) de Naidinae est expliqué par une nette surestimation de l'abondance de *Chaetogaster diaphanus*, présent dans l'échantillon à raison d'un seul exemplaire. Dans les échantillons UNIL, l'abondance de *Nais* spp. est très nettement sous-estimée (0,27% et 2,14%), puisque 35 spécimens de ce genre ont été introduits dans le mélange 1 (soit 70%) et 24 dans le mélange 2 (soit 48%). Idem pour les mélanges du site Urt, dans lesquels 13 et 12 spécimens de *Nais* spp. ont été introduits et où les espèces de ce genre ont à peine été détectées génétiquement (<0,3%). Les pourcentages de Tubificinae avec et sans soies capillaires obtenus morphologiquement et génétiquement diffèrent également de manière significative sur tous les sites, sauf Grab et TIN. Par ex., pour le site Fle, le pourcentage de Tubificinae sans soies capillaires est d'env. 57% dans les deux mélanges, alors qu'il n'est que de 30% pour la morphologie et que 11 spécimens de Tubificinae sans soies capillaires ont été introduits dans le mélange 1 (soit 22%) et 13 dans le mélange 2 (soit 26%).

Les corrélations les plus significatives entre pourcentages des familles, sous-familles et groupes de Tubificinae avec/sans soies capillaires dérivées à partir des données morphologiques et génétiques ont été obtenues pour les Enchytraeidae, malgré la sous-estimation avec l'analyse génétique de l'abondance de cette famille dans plusieurs échantillons, les Lumbriculidae et les Tubificinae totaux (Tab. 5). Les corrélations entre les abondances de Naidinae, Tubificinae avec soies capillaires et Tubificinae sans soies capillaires obtenues morphologiquement et génétiquement sont non significatives pour les deux mélanges (Tubificinae sans soies capillaires) ou un des deux mélanges (Naidinae et Tubificinae avec soies capillaires).



Les diagnostics écologiques établis sur la base des notes d'IOBS obtenues à partir des données morphologiques et génétiques sont en majorité concordants (78% des cas pour les mélanges 1 et 63% pour les mélanges 2). Les corrélations entre valeurs d'IOBS obtenues morphologiquement et génétiquement sont très significatives. On observe trois discordances de type objectif de bonne qualité biologique atteint/non atteint entre les valeurs d'IOBS obtenues avec la morphologie et la génétique (site Fle, LAND et UNIL). Pour le site de Fle, la sous-estimation de la qualité biologique obtenue avec l'analyse génétique est expliquée par une surestimation des abondances de tubificidés sans soies capillaires. La surestimation de la qualité biologique dans le mélange 2 de LAND est expliquée par une sous-estimation du % de tubificidés sans soies capillaires, mais le % de spécimens de tubificidés sans soies capillaires introduits dans ce mélange n'a pas été noté. Pour le site UNIL, la sous-estimation de la qualité biologique est expliquée par une très nette sous-estimation des abondances des Naidinae et une nette surestimation des abondances des tubificidés sans soies capillaires.

L'application du calcul de l'indice IOBSgen et l'adaptation des limites des classes de qualité proposée par Vivien et al. (2019) permet sur le présent jeu de données de supprimer deux discordances de type objectif de bonne qualité atteint/non atteint (sites Fle et LAND) et d'améliorer légèrement la corrélation entre les valeurs d'indice calculé avec les données morphologiques et génétiques (Tab. 4.; Tab. 5.).

3.5 Méthode SHDspm vs méthodes de metabarcoding ADN(e)

Les résultats de ces comparaisons sont décrits en annexe (Annexe 2 Tab. 9; Annexe 2 Tab. 10). Seule une analyse des lignées systématiquement sur- ou sous-estimées par les méthodes de metabarcoding est reportée (cf. § 2.12).

Vingt lignées ont été détectées à la fois par la méthode SHDspm et la méthode SHDéth sur au moins 3 sites différents. L'abondance de seulement 7 de ces 20 lignées a été systématiquement sous ou surestimée par la méthode SHDéth. Les degrés de sous ou surestimation des abondances de ces 7 lignées sont toutes très variables suivant les sites : l'abondance de la lignée *Henlea perpusilla* E16 a été sous-estimée (par la méthode SHDéth) de 2,3 à 57,4 fois, celle de la lignée *Buchholzia appendiculata* E37 de 6,5 à 32,8 fois, celle de la lignée *Nais communis* N3 de 49,2 à 412,2 fois, celle de la lignée *Nais elinguis* N4 de 39,5 à 883 fois, celle de la lignée *Tubifex tubifex* T11 de 60,2 à 477,7 fois et celle de la lignée Lumbriculidae sp. LL5 de 78,2 à 226,2 fois; l'abondance de la lignée *Tubifex tubifex* T10 a été surestimée (par la méthode SHDéth) de 2,6 à 14,9 fois.

Seules huit lignées ont été détectées à la fois par la méthode SHDspm et la méthode SHDmél sur au moins 3 sites différents. L'abondance de seulement 5 de ces 8 lignées a été systématiquement sous ou surestimée par la méthode SHDmél. Les niveaux de sous-estimation ou de surestimation des abondances de ces 5 lignées sont très variables suivant les sites : l'abondance de *Nais elinguis* N4 a été sous-estimée (par la méthode SHDmél) de 55 à 636 fois, celle de *Psammoryctides barbatus* T8 de 1,8 à 64,8 fois, celle de *Tubifex tubifex* T11 de 110 à 9539 fois et celle de *Limnodrilus udekemianus* T23 de 2,8 à 330 fois ; l'abondance de *Potamothenix bavaricus* T7 a été surestimée (par la méthode SHDmél) de 1,1 à 6,3 fois.

3.6 Base de données COI de référence

Un total de 78 nouvelles lignées a été obtenu, 11 par le séquençage Sanger de spécimens sélectionnés (barcoding), 44 par le SHDspm, 17 par le SHDéth et 6 par le SHDmél (Annexe 2 Tab. 11 et Annexe 3). 42 nouvelles lignées d'Enchytraeidae, 8 de Naidinae, 1 de Pristininae, 11 de Tubificinae, 6 de Lumbriculidae, 2 de Lumbricidae, 2 de Rhyacodrilinae, 5 d'Haplotaxidae et 1 Oligochaeta sp. ont été obtenues.

Plusieurs nouvelles espèces cryptiques pour la Suisse ont été identifiées : une 2ème espèce de *Lumbriculus variegatus* (LL10), une 7ème espèce de *Limnodrilus hoffmeisteri* (T43), une 2ème



espèce de *Potamothenrix heuscheri* (T41), une 2ème espèce d'*Aulodrilus pluriset*a (T42), 2 espèces supplémentaires de *Chaetogaster diastrophus* (N19, N23) (3 espèces de *C. diastrophus* détectées en Suisse), une 2ème espèce de *Chaetogaster diaphanus* (N18), une 4ème espèce de *Globulidrilus riparius* (E76), une 2ème espèce d'*Enchytraeus buchholzi* (E50) et 5 espèces d'*Haplotaxis gordioides* supplémentaires (6 espèces d'*H. gordioides* détectées en Suisse) (Martin et al., 2023).

La lignée N20 a été obtenue par séquençage Sanger (barcoding) mais la partie antérieure du spécimen séquencé n'a pas été conservée, en raison de sa très petite taille. Il s'agit probablement d'une espèce appartenant au genre *Chaetogaster*. A noter que l'espèce T4 reportée comme étant un *Aulodrilus pluriset*a (Vivien et al., 2017) pourrait être en fait un *Aulodrilus japonicus* (communication de Christer Erséus), mais ceci doit être confirmé. Si c'est le cas, ce serait la première mention de l'espèce *A. japonicus* en Suisse et la lignée T42 serait la première mention d'une séquence d'*Aulodrilus pluriset*a en Suisse. Ces deux espèces ne peuvent être distinguées que par dissection (Timm, 2009), donc nous avons pu jusqu'à présent identifier (faussement) les spécimens d'*A. japonicus* comme appartenant à l'espèce *A. pluriset*a dans nos inventaires morphologiques.



4 Discussion

4.1 Méthode SHDspm

Des corrélations très significatives entre les valeurs de l'indice IOBS dérivées à partir des données morphologiques et de séquençage à haut débit de spécimens marqués ont été observées. La valeur du coefficient de détermination R^2 est particulièrement élevée compte tenu du jeu de données important ($n=29$). Relevons toutefois que la valeur élevée du coefficient de détermination est en partie expliquée par le fait que le jeu de données comprend un nombre élevé de sites préservés et fortement impactés.

Les résultats ont montré de bonnes concordances entre les abondances des espèces, familles, sous-familles et groupes de Tubificinae avec et sans soies capillaires obtenues morphologiquement et génétiquement. Les discordances observées entre les nombres de taxons obtenus avec la morphologie et la génétique peuvent être expliquées par les facteurs suivants:

- les analyses génétiques permettent de détecter des espèces non ou difficilement identifiables morphologiquement- un plus grand nombre de spécimens a été identifié par site morphologiquement (100 spécimens) que génétiquement (48 spécimens)
- dans le calcul de l'indice, les taxons Tubificinae avec/sans soies capillaires, Lumbriculidae et Lumbricidae non reconnaissables à l'état immature comptent comme des taxons, car théoriquement ces taxons peuvent appartenir à des espèces différentes de celles identifiées dans l'échantillon.

Les trois discordances importantes de type « objectif de bonne qualité biologique atteint/non atteint » entre résultats de la morphologie et de la génétique ont toutes été expliquées par des différences des nombres de taxons obtenus entre les deux méthodes.

Etant donné que pour ce type d'analyse génétique les spécimens sont sortis et séquencés individuellement, les abondances des espèces, sous-familles, familles et groupes de Tubificinae avec et sans soies capillaires sont correctes et fiables. Dans les cas de discordance entre les valeurs d'IOBS calculées avec les données morphologiques et celles calculées avec les données génétiques, nous ne pouvons pas trancher sur la méthode qui fournit le diagnostic écologique le plus correct. Nous proposons pour l'instant de conserver le même calcul d'IOBS entre l'approche morphologique et l'approche génétique en attendant de compléter le jeu de données incluant à la fois les résultats de chimie, morphologie et génétique pour permettre de lever cette incertitude.

Cette approche génétique permettant d'évaluer avec précision l'abondance de chaque espèce (li-gnée) présente dans un échantillon représente un réel intérêt en écologie. Elle peut permettre de fournir des diagnostics écologiques plus fiables, plus précis et plus complets que ceux établis sur la base de l'étude morphologique, de mieux connaître l'écologie des espèces, en particulier leur degré de sensibilité aux différents polluants, et de déterminer de manière optimale des seuils d'effets des polluants présents dans les sédiments sur les communautés d'oligochètes (Vivien et al., 2020a).

Cependant, dans le cadre de ce projet, nous n'avons pas pu rendre la méthode SHDspm applicable en routine. Notre objectif initial était de ne pas vérifier les amplifications d'ADN sur gel et de ne pas quantifier les produits de PCR. Or, nous avons obtenu un taux de succès d'amplification de l'ADN des spécimens plus faible que prévu. Nous avons donc décidé, afin d'assurer d'obtenir des résultats positifs, d'ajouter des étapes de vérification des amplifications d'ADN sur gel et de répétitions des PCR (en testant plusieurs dilutions de la guanidine) n'ayant pas donné de bande visible sur gel. De plus, nous avons ajouté dans les mélanges la même quantité d'ADN entre spécimens. Les causes du taux de succès d'amplification insuffisant n'ont jusqu'à présent pas pu être déterminées de manière certaine et pourraient être multifactorielles. Mais le fait que pour un nombre important de spécimens, l'ADN n'a pas été amplifié lors de la première PCR, puis amplifié lors de la seconde PCR sans modification de la dilution laisse penser que le problème pourrait venir des conditions des PCR, par ex. un nombre de spécimens amplifiés par série de PCR trop important.



Cette méthode a donc été validée dans le cadre de ce projet et peut déjà être appliquée pour l'évaluation de la qualité biologique des sédiments. Toutefois, le coût de l'analyse en suivant le protocole de la présente étude est élevé. La méthode SHDspm demande donc encore du développement technique afin de pouvoir être utilisée dans les analyses de routine. Nous projetons de tenter d'optimiser les conditions des PCR pour améliorer le taux de succès d'amplification et de tester sur les échantillons d'OligoGen (prêts pour être analysés à nouveau) la méthodologie avec guanidine raccourcie sans vérification des amplifications d'ADN sur gel et sans quantification de l'ADN dans les produits de PCR. Des tests de méthodes automatisables d'extraction d'ADN avec des kits commerciaux sont également envisagés.

4.2 Méthodes de metabarcoding ADN(e)

4.2.1 Méthode SHDéth

Des corrélations très significatives entre les valeurs de l'indice IOBS dérivées à partir des données morphologiques et de séquençage à haut débit des échantillons d'éthanol (sans et avec modification du calcul de l'IOBS) ont été observées. La valeur plutôt élevée du coefficient de détermination R^2 obtenue est expliquée par le fait que le jeu de données comprend un nombre élevé de sites préservés (sans ou avec un très faible % de taxons résistants aux pollutions, 6 sites) et fortement impactés (présence unique ou large prédominance de taxons résistants aux pollutions, 7 sites).

Les différences importantes entre les abondances des espèces, familles, sous-familles et groupes de Tubificinae avec et sans soies capillaires obtenues morphologiquement et génétiquement peuvent être expliquées par les facteurs suivants :

- biomasse variable entre espèces et entre spécimens d'une même espèce
- variation du nombre de copies du gène COI entre spécimens
- degré d'affinité pour la liaison des primers et de l'ADN polymérase pouvant être variable entre les espèces
- compétition entre espèces pour la liaison des primers et de l'ADN polymérase (Vivien et al., 2016).

La nette sous-estimation des abondances des Enchytraeidae et Naidinae par l'analyse génétique est probablement expliquée par la faible biomasse qui caractérise la plupart des espèces de ces deux taxons, et donc par un relâchement moindre de leur ADN dans l'éthanol par rapport à des espèces de plus grande taille. Par ex., Derycke et al. (2021) et Erdozain et al., (2019) ont montré que le metabarcoding basé sur l'extraction d'ADN à partir de l'éthanol ne permettait pas la détection d'espèces de macroinvertébrés présentant une faible biomasse.

Un facteur qui pourrait aussi influencer sur les pourcentages de taxons obtenus est la méthode d'extraction de l'ADN utilisée (kit Qiagen). Le kit Qiagen s'est en effet révélé non adéquat pour amplifier l'ADN de spécimens d'oligochètes isolés (résultats observés, non publiés). Même si l'amplification de COI dans les échantillons d'éthanol au moyen de ce kit a donné sur gel des bandes très nettes, seule une partie de l'ADN présent dans chaque échantillon pourrait avoir été amplifiée.

La méthode SHDéth s'est révélée très performante pour la détection d'espèces présentes dans un échantillon, le nombre de taxons par site obtenu génétiquement ayant été sur plusieurs sites nettement plus élevé que celui des taxons identifiés morphologiquement. Comme les sédiments ont été tamisés avant ajout de l'éthanol, on peut exclure que les nombre de taxons élevés sur ces sites soient expliqués par une surestimation du nombre d'espèces réellement présentes dans les sédiments échantillonnés.

Etant donné que les diagnostics écologiques sont basés en grande partie sur le pourcentage de chaque espèce présente dans un échantillon, il serait nécessaire de corriger les nombres de reads des espèces dont l'abondance est systématiquement sur ou sous-estimée dans les échantillons au moyen de l'application de facteurs de correction. La comparaison directe des résultats entre les



méthodes SHDspm et SHDéth a cependant montré que la sous-estimation ou surestimation de l'abondance par l'analyse génétique n'était constante que pour un petit nombre de lignées et que le degré de sur ou de sous-estimation de l'abondance de ces lignées pouvait être très variable entre les sites.

La division du nombre de taxons par le pourcentage de tubificidés totaux (IOBSgen) et l'adaptation de la limite supérieure de la classe de qualité moyenne de l'indice génétique ont permis de supprimer quatre discordances importantes entre la morphologie et la génétique. Il reste deux discordances importantes entre la morphologie et la génétique, dont celle du site UNIL où l'abondance des Naidinae a été très fortement sous-estimée par la génétique, qui ne pourrait pas être supprimée par le biais d'une modification du calcul de l'indice ou des limites de classes de qualité. Seule une correction des nombres de reads obtenus pourrait permettre de rendre pour le site UNIL les résultats des indices calculés avec les données morphologies et génétiques concordants.

Même si la modification de calcul de l'indice et l'adaptation des limites des classes de qualité ont permis de rendre les diagnostics écologiques établis avec les analyses morphologique et génétique plutôt concordants, la méthode SHDéth ne peut actuellement pas être validée. Le nombre de données est encore peu élevé et la modification de calcul et l'adaptation des limites des classes de qualité proposées ici pourraient ne pas convenir à d'autres jeux de données. De plus, la nette sous-estimation des abondances des Naidinae et Enchytraeidae par l'analyse de l'éthanol est problématique, en particulier lorsque les taxons sensibles ne sont représentés que par ces deux taxons ou que par l'un ou l'autre de ces deux taxons (par ex. site UNIL).

Les perspectives sont tout d'abord de tester la méthode SHDéth en utilisant d'autres méthodes d'extraction de l'ADN (par ex. guanidine, kits commerciaux) que le kit Qiagen. Si les pourcentages de taxons obtenus en utilisant d'autres méthodes d'extraction restent biaisés, nous pourrions alors tester si l'utilisation de primers spécifiques des oligochètes (à développer) et l'application de facteurs de correction des nombres de reads pourraient permettre d'estimer les abondances des espèces et en particulier celles des Enchytraeidae et Naidinae de manière plus juste.

4.2.2 Méthode SHDmél

Des corrélations très significatives entre les valeurs de l'indice IOBS dérivées à partir des données morphologiques et de séquençage à haut débit de mélanges de spécimens (sans et avec modification du calcul de l'IOBS) ont été observées. Toutefois, relevons que le nombre de données est faible et le choix des sites explique la valeur élevée du coefficient de détermination R^2 obtenue, deux sites étant préservés (sans ou avec un très faible % de taxons résistants aux pollutions) et deux sites fortement impactés (présence unique ou large prédominance de taxons résistants aux pollutions).

Les différences entre les abondances des espèces, familles, sous-familles et groupes de Tubificinae avec et sans soies capillaires obtenues génétiquement d'une part et par l'analyse morphologique et les relevés des taxons introduits dans chaque mélange d'autre part peuvent être expliquées par les facteurs suivants :

- biomasse variable entre tissus des spécimens introduits (il est en effet très difficile de découper des quantités de fragment de tissus identiques (biomasse similaire) entre spécimens, la taille et l'épaisseur des spécimens variant de manière importante)
- variation du nombre de copies du gène COI entre spécimens
- degré d'affinité pour la liaison des primers et de l'ADN polymérase variable entre les espèces
- compétition entre espèces pour la liaison des primers et de l'ADN polymérase (Vivien et al., 2016).

La sous-estimation de l'abondance de la plupart des espèces d'Enchytraeidae et de Naidinae pourrait être expliquée en partie par une quantité de tissu moindre des spécimens de ces espèces



introduits dans les mélanges. Par ex., l'espèce *Marionina argentea* (Enchytraeidae), dont l'abondance a été sous-estimée génétiquement, est de très petite taille et a un corps très fin. Même si les spécimens de cette espèce ont été introduits dans les mélanges en entier, leur biomasse reste sans doute très faible.

Comme pour la méthode SHDéth, la méthode d'extraction de l'ADN utilisée (kit Qiagen) pourrait avoir influé sur les pourcentages de taxons obtenus (voir § 4.2.1.).

Les résultats de la structure des communautés et des notes d'indice IOBS obtenus dans les réplicats d'un même site sont en général plutôt concordants. Les différences entre réplicats peuvent être expliquées par des abondances différentes de taxons introduits dans chaque mélange et par des degrés d'amplifications de certaines espèces différents entre réplicats, par ex. l'espèce *Chaetogaster diaphanus* pour les échantillons du site LAND (cause indéterminée).

Bien que la diversité générale obtenue génétiquement sur les 9 sites soit nettement plus importante que celle obtenue morphologiquement, les nombre de taxons par site obtenus génétiquement sont globalement proches de ceux obtenus avec l'analyse morphologique.

Comme pour la méthode SHDéth, il serait nécessaire d'essayer de corriger les nombres de reads des lignées dont l'abondance est systématiquement sur ou sous-estimée dans les échantillons au moyen de l'application de facteurs de correction. La comparaison directe des résultats entre les méthodes SHDspm et SHDmél a cependant montré que la sous-estimation ou surestimation de l'abondance par l'analyse génétique n'était constante que pour un nombre restreint de lignées et que le degré de sur ou de sous-estimation de l'abondance de ces lignées pouvait être très variable entre les sites.

De plus, soulignons que les facteurs de correction établis sur la base d'un jeu de données peuvent ne pas être applicables à d'autres jeu de données. Par ex., Vivien et al. (2016) ont analysé des mélanges de spécimens d'oligochètes (metabarcoding) et séquencé en parallèle chaque spécimen des mélanges avec la méthode Sanger. Cette approche est idéale pour la détermination de facteurs de corrections, comme l'abondance réelle de chaque lignée dans un mélange est connue. Les facteurs de correction de plusieurs lignées proposées dans cette étude ne seraient pas adaptés au présent jeu de données. Par ex., l'abondance de la lignée *Nais elinguis* N4 est sous-estimée d'env. 5 fois par l'analyse de mélange de spécimens dans Vivien et al. (2016), alors qu'elle l'est de plus de 50 fois dans la présente étude.

Dans le présent jeu de données, la double modification du calcul de l'indice et des limites des classes de qualité a permis de supprimer deux discordances importantes entre la morphologie et la génétique. Il reste une discordance importante expliquée par une abondance de Naidinae nettement sous-estimée (site UNIL) par l'analyse génétique. Seule une correction des nombres de reads obtenus pourrait permettre de rendre sur ce site les résultats des indices calculés avec les données morphologies et de la génétiques concordants.

Nos résultats montrent que la modification du calcul de l'indice et l'adaptation des limites des classes de qualité pourrait être adaptées pour l'analyse de mélanges de spécimens. Cette méthode génétique ne peut toutefois pas être validée à ce stade, le nombre de données disponibles étant encore faible, et comme pour la méthode SHDeth, il serait nécessaire de poursuivre des recherches pour tenter de résoudre le problème de l'estimation incorrecte des abondances des espèces, notamment de la sous-estimation des abondances des Naidinae et Enchytraeidae.

Les perspectives sont identiques à celles proposées pour la méthode SHDeth, à savoir tout d'abord de tester la méthode SHDmél en appliquant d'autres méthodes d'extraction de l'ADN que le kit Qiagen, et en cas d'une absence d'amélioration des résultats, le développement et l'utilisation de primers spécifiques des oligochètes et le test de l'application de facteurs de correction des nombres de reads.



4.3 Base de données COI de référence

Un grand nombre de nouvelles lignées (78) a été obtenu, principalement grâce aux analyses de séquençage à haut débit. Le nombre total de lignées de la base de données COI suisse des oligochètes aquatiques est actuellement de 184 (79 Enchytraeidae, 6 Lumbricidae, 24 Naidinae, 2 Pristiniinae, 4 Rhyacodrilinae, 51 Tubificinae, 6 Haplotaxidae et 12 Lumbriculidae). Il est probable que la base de données actuelle couvre la grande majorité des espèces communes en Suisse. Toutefois, il reste encore certainement un grand nombre d'espèces présente en Suisse qui n'ont pas encore été séquencées, entre autres des espèces rares ou plutôt rares présentes dans des milieux préservés (par ex. les sources de cours d'eau).

Il est crucial de bénéficier de bases de données COI complètes lorsqu'on assigne taxonomiquement les séquences pour évaluer la qualité biologique des milieux. Dans le cas du SHDspm, cela permet d'assigner rapidement les séquences obtenues et d'éviter un travail chronophage de construction d'arbres et de calculs des pourcentages de variation génétiques. Pour les méthodes de metabarcoding, cela permet de ne pas passer à côté d'espèces (les séquences divergeant de plus de 10% des séquences des bases de données sont perdues). Dans cette étude, l'assignation des séquences obtenues par metabarcoding ADN(e) effectuée après la mise à jour de la base de données de référence suite au travail spécifique sur le barcoding et à l'application de la méthode de SHDspm a permis de détecter lors des analyses d'éthanol (SHDeth) et de mélanges de spécimens (SHDmel) certaines espèces (par ex. les lignées *Fridericia dura/ratzeli* E22, Enchytraeidae sp. E27 et *Enchytraeus buchholzi* E50).

L'enrichissement de notre base de données devra à l'avenir être poursuivi, par le biais de travaux spécifiques sur le barcoding (séquençage Sanger de spécimens sélectionnés), mais également en appliquant des méthodes de séquençage à haut débit (spécimens marqués, metabarcoding ADN(e)) permettant une détection rapide de nouvelles lignées.

4.4 Synthèse de l'état d'avancement de la recherche sur les différentes méthodes génétiques et les perspectives de développement

Le tableau 6 dresse un bilan de l'état d'avancement du développement des méthodes SHDspm, SHDeth et SHDmel. La méthode SHDspm est applicable pour l'évaluation de la qualité biologique des sédiments. Toutefois, du développement est nécessaire pour rendre le coût de cette analyse moins élevé. Pour les méthodes de metabarcoding ADN(e), il serait nécessaire de tenter de réduire significativement les biais des abondances des espèces, familles et sous-familles présentes dans un échantillon, avant de pouvoir proposer ces méthodes pour l'évaluation de la qualité des milieux.



Tab. 6: Avantages, limites, applicabilité et perspectives de développement des méthodes basées sur le séquençage à haut débit des spécimens marqués génétiquement (SHDspm), de l'éthanol (SHDéth) et des mélanges de spécimens (SHDmél) ; * valeurs obtenues après modification du calcul de l'indice (IOBSgen)

	Avantages	Limites	Applicabilité	Perspectives de développement
Méthode SHDspm	Corrélations très significatives entre valeurs d'IOBS obtenues à partir des données morphologiques et génétiques ($n=29$, $R^2=0,87$, $p=2,7 \times 10^{-13}$) Tri aléatoire des spécimens et identification individuelle permet une représentativité optimale des principales espèces présentes dans un échantillon Estimations correctes des abondances des espèces, familles et sous-familles → les pourcentages des différentes espèces sont utilisables pour compléter/corriger les diagnostics écologiques établis sur la base de la seule note de l'indice IOBS Par rapport à la morphologie, chaque individu est identifié à l'espèce (li-gnée) et identifications très fiables	Coût de l'analyse nettement plus élevé que le coût de l'indice IOBS classique. Le coût estimé par site avec la méthode génétique est d'environ CHF 2000-2400, alors que celui de l'analyse morphologique est estimé à environ CHF 1200	Méthode validée, mais du développement est nécessaire pour diminuer le coût de l'analyse	- Tester la méthode avec guanidine en optimisant les conditions des PCR et sans les étapes de vérification des amplifications sur gel et de quantification d'ADN - Tester d'autres méthodes d'extraction d'ADN avec des kits commerciaux (si possible automatisables)
Méthode SHDéth	Corrélations très significatives entre valeurs d'IOBS obtenues à partir des données morphologiques et génétiques ($n=20$, $R^2=0,81$, $p=7 \times 10^{-8}$)* Forte capacité de détection des espèces, y compris des espèces très peu abondantes dans un échantillon Pas de tri manuel des spécimens après tamisage du sédiment → coût de l'analyse avantageux en mode screening (biodiversité) (estimé à CHF 800)	Biais dans l'estimation des abondances des espèces, familles et sous-familles → pas de possibilité d'utiliser les pourcentages des espèces pour compléter/corriger les diagnostics écologiques établis sur la base de la seule note de l'indice IOBS L'absence de tri des spécimens peut entraîner une représentativité insuffisante d'un certain nombre d'espèces présentes dans un échantillon, par ex. celles de petite taille	Méthode non validée, nécessite du développement pour réduire les biais des abondances des espèces, familles et sous-familles.	- Prioritaire: tester la méthode SHDéth en appliquant d'autres méthodes d'extraction que le kit Qiagen - Développer et utiliser des primers spécifiques des oligochètes - Application de facteurs de correction des nombres de reads
Méthode SHDmél	Corrélations très significatives entre valeurs d'IOBS obtenues à partir des données morphologiques et génétiques ($n=9$, $R^2=0,92$, $p=4,6 \times 10^{-5}$; $n=8$, $R^2=0,85$, $p=0,001$)* Tri aléatoire des spécimens et découpe des spécimens (quantité de tissu similaire entre spécimens) permet de favoriser une représentativité des principales espèces présentes dans un échantillon	Biais dans l'estimation des abondances des espèces, familles et sous-familles → pas de possibilité d'utiliser les pourcentages des espèces pour compléter/corriger les diagnostics écologiques établis sur la base de la seule note de l'indice IOBS Coût par site équivalent à celui de l'analyse morphologique (CHF 1200)	Méthode non validée, nécessite du développement pour réduire les biais des abondances des espèces, familles et sous-familles.	- Prioritaire: tester la méthode SHDmél en appliquant d'autres méthodes d'extraction que le kit Qiagen - Développer et utiliser des primers spécifiques des oligochètes - Application de facteurs de correction des nombres de reads



4.5 Synergies avec le développement de méthodes génétiques pour évaluer la qualité biologique des sédiments des lacs

La qualité biologique des sédiments des lacs peut être évaluée en étudiant la composition des communautés d'oligochètes (AFNOR, 2016; Lafont et al., 2012) et à la fois celle des communautés d'oligochètes et de chironomes (indice IQB-AL, Lods-Crozet & Chevalley, 2016).

Il a été démontré que la méthode de SHDspm convenait pour évaluer la qualité des sédiments des lacs à l'aide des communautés d'oligochètes (Vivien et al., 2020b). La résolution du problème technique pour rendre la méthode oligochètes génétique utilisable en routine permettrait aussi son application pour évaluer la qualité des sédiments dans les lacs.

Il est actuellement testé si la méthode SHDspm pourrait être transférable à l'étude de la composition des communautés de chironomes. Il est prévu d'une part d'établir une base de données de référence des séquences COI des chironomes présents dans les lacs suisses et d'autre part de comparer les résultats des diagnostics écologiques (indice IQB-AL) établis à partir de données morphologiques et génétiques (sites du Léman, du lac de Joux et du lac Duzillet).



5 Références

- AFNOR. 2016. Qualité de l'eau – échantillonnage, traitement et analyse des oligochètes dans les sédiments des eaux de surface continentales. Association française de normalisation (AFNOR), NF T 90-393. France: 14pp. + annexes
- Apothélos-Perret-Gentil L., Bouchez A., Cordier T., Cordonier A., Guéguen J., Rimet F., Vasselon V., Pawlowski J. 2021. Monitoring the ecological status of rivers with diatom eDNA metabarcoding: A comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Molecular Ecology* 30:2959-2968. doi: 10.1111/mec.15646
- Beauvais R., Vivien R., Ferrari B.J.D., Casado-Martinez C. 2020. Etat des sédiments de canaux artificiels : Des pollutions de source urbaine, industrielle et agricole affectent les organismes benthiques. *Aqua & Gas* 100: 73-81.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J., Holmes S.P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13(7): 581-3. doi: 10.1038/nmeth.3869
- 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 Zoology* 10, 45. doi: 10.1186/1742-9994-10-45
- Carew M.E., Kellar C.R., Pettigrove V.J., Hoffmann A.A. 2018. Can high-throughput sequencing detect macroinvertebrate diversity for routine monitoring of an urban river? *Ecological Indicators* 85: 440-450.
- Casado C., Wildi M., Ferrari B. J. D., Werner I. 2021. Stratégie d'évaluation de la qualité des sédiments en Suisse. Étude élaborée sur mandat de l'Office fédéral de l'environnement. Centre suisse d'écotoxicologie appliquée
- Cermakova K., Mondino A., Pawlowski J., Inventaire de la biodiversité des cours d'eau du canton de Genève à l'aide de l'ADN environnemental, ID-Gene, en préparation
- Chapman P.M. 1990. The sediment quality triad approach to determine pollution-induced degradation. *Science of The Total Environment* 97: 815–825.
- Cordier T., Alonso-Sáez L., Apothélos-Perret-Gentil L., Aylagas E., Bohan D.A., Bouchez A., Chariton A., Creer S., Frühe L., Keck F., Keeley N., Laroche O., Leese F., Pochon X., Stoeck T., Pawlowski J., Lanzén A. 2021. Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: A review of current strategies with an implementation roadmap. *Molecular Ecology* 30(13): 2937-2958. doi: 10.1111/mec.15472
- Derycke S., Maes S., Van Den Bulcke L., Vanhollebeke J., Wittoeck J., Hillewaert H., Ampe B., Haegeman A., Hoste K., De Backer A. 2021. Detection of macrobenthos species with metabarcoding is consistent in bulk DNA but dependent on body size and sclerotization in eDNA from the ethanol preservative. *Frontiers in Marine Science* 8: 637858. doi: 10.3389/fmars.2021.637858
- Dufresne Y., Lejzerowicz F., Perret-Gentil L.A., Pawlowski J., Cordier T. 2019. SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. *BMC Bioinformatics* 20, 88.
- 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: 1265–1275. doi: 10.1111/2041-210X.12789
- Erdozain M., Thompson D.G., Porter T.M., Kidd K.A., Kreutzweiser D.P., Sibley P.K., Swystun T., Chartrand D., Hajibabaei M. 2019. Metabarcoding of storage ethanol vs. conventional morphometric identification in relation to the use of stream macroinvertebrates as ecological indicators in forest management. *Ecological Indicators* 101: 173–184. doi: 10.1016/j.ecolind.2019.01.014



- Esling P., Lejzerowicz F. & Pawlowski J. 2015. Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing. *Nucleic Acids Research* 243: 2513-2524.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vriegenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221-4.
- Gurung B., Race M., Fabbicino M., Komínková D., Libralato G., Siciliano A., Guida M. 2018. Assessment of metal pollution in the Lambro Creek (Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 754–762.
- 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.
- Hebert P.D.N., Braukmann T.W.A., Prosser S.W.J. et al. 2018. A Sequel to Sanger: amplicon sequencing that scales. *BMC Genomics* 19, 219. doi: 10.1186/s12864-018-4611-3
- Höss S., Claus E., Von der Ohe P., Brinke M., Güde H., Heininger P., Traunsperger W. 2011. Nematode species at risk—A metric to assess pollution in soft sediments of freshwaters. *Environment International* 37: 940–949.
- Keck F., Blackman R.C., Bossart R., Brantschen J., Couton M., Hürlemann S., Kirschner D., Locher N., Zhang H., Altermatt F. 2022. Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment. *Molecular Ecology* 31(6): 1820-1835. doi: 10.1111/mec.16364
- Lafont M. 1989. Contribution à la gestion des eaux continentales : utilisation des Oligochètes comme descripteurs de l'état biologique et du degré de pollution des eaux et des sédiments. PhD Thesis, Université Claude Bernard Lyon I
- Lafont M., Jézéquel C., Vivier A., Breil P., Schmitt L., Bernoud S. 2010. Refinement of biomonitoring of urban water courses by combining descriptive and ecohydrological approaches. *Ecohydrology & Hydrobiology* 10: 3-11.
- Lafont M., Tixier G., Marsalek J., Jézéquel C., Breil P., Schmitt L. 2012. From research to operational biomonitoring of freshwaters: A suggested conceptual framework and practical solutions. *Ecohydrology & Hydrobiology* 12: 9-20.
- Lefrançois E., Apothéoz-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., Perno 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. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 33858-33866.
- 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.
- Lods-Crozet B., Chevalley P.-A. 2016. Evolution du zoobenthos profond du Léman. Campagne 2015. Rapp. Comm. int. prot. eaux Léman contre pollut. 2016 : 132-141.
- Martin P., Knüsel M., Alther R., Altermatt F., Ferrari B., Vivien R. 2023. *Haplotaxis gordioides* (Hartmann in Oken, 1819) (Annelida, Clitellata) as a sub-cosmopolitan species: a commonly view challenged by DNA barcoding. *Zoosymposia* 23: 78-93.
- Pawlowski J., Kelly-Quinn M., Altermatt F., Apothéoz-Perret-Gentil L., Beja P., Boggero A., Borja A., Bouchez A., Cordier T., Domaizon I., Feio M.J., Filipe A.F., Fornaroli R., Graf W., Herder J., van der Hoorn B., Iwan Jones J., Sagova-Mareckova M., Moritz C., Barquín J., Piggott J.J., Pinna M., Rimet F., Rinkevich B., Sousa-Santos 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: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment* 637-638: 1295-1310. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.002
- Prantoni A.L., Belmonte-Lopes R., Lana P.C., Erséus C. 2018. Genetic diversity of marine oligochaetous clitellates in selected areas of the South Atlantic as revealed by DNA barcoding. *Invertebrate Systematics* 32, 524-532.
- Reymond O. 1994. Préparations microscopiques permanentes d'oligochètes: une méthode simple. *Bulletin de la société vaudoise de sciences naturelles* 83, 1-3.
- Rodriguez, P., Reynoldson, T.B. 2011. *The Pollution Biology of Aquatic Oligochaetes*. Ed. Springer Science+Business Media: 224 pp. + annexes
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584
- Salter I., Joensen M., Kristiansen R., Steingrund P., Vestergaard P. 2019. Environmental DNA concentrations are correlated with regional biomass of Atlantic cod in oceanic waters. *Communications Biology* 10;2:461. doi: 10.1038/s42003-019-0696-8
- 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.
- Shokralla S., Gibson J.F., Nikbakht H., Janzen D.H., Hallwachs W., Hajibabaei M. 2014. Next-generation DNA barcoding: using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources* 14: 892-901. doi: 10.1111/1755-0998.12236
- Shokralla S., Porter T.M., Gibson J.F., Dobosz R., Janzen D.H., Hallwachs W., Golding G.B., Hajibabaei M. 2015. Massively parallel multiplex DNA sequencing for specimen identification using an Illumina MiSeq platform. *Scientific Reports* 5: 9687. doi: 10.1038/srep09687
- Taberlet P., Bonin A., Zinger L., Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press, 272 pp.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-39.
- Timm T. 2009. A guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe. *Lauterbornia* 66: 1-235.
- Tkach V., Pawlowski J. 1999. A new method of DNA extraction from the ethanol-fixed parasitic worms. *Acta Parasitologica* 44: 147-48.
- Tsuji S., Inui R., Nakao R., Miyazono S., Saito M., Kono T., Akamatsu Y. 2022. Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community. *Scientific Reports* 12(1):21524. doi: 10.1038/s41598-022-25274-3
- Vasselon V., Bouchez A., Rimet F., Jacquet S., Trobajo R., Corniquel M., Tapolczai K., Domaizon I. 2018. Avoiding quantification bias in metabarcoding: Application of a cell biovolume correction factor in diatom molecular biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 9: 1060-1069.
- Vivien R., Lafont M., Ferrari B.J.D. 2015. 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: 105-113.
- Vivien R., Lejzerowicz F., Pawlowski J. 2016. Next-generation sequencing of aquatic oligochaetes : comparison of experimental communities. *PLoS ONE* 11:e0148644.
- Vivien R., Holzmann M., Werner I., Pawlowski J., Lafont M., Ferrari B.J.D. 2017. Cytochrome c oxidase barcodes for aquatic oligochaete identification: development of a Swiss reference database. *PeerJ* 5:e4122.



- Vivien R., Werner I., Ferrari B.J.D. 2018. Simultaneous preservation of the DNA quality, the community composition and the density of aquatic oligochaetes for the development of genetically based biological indices. *PeerJ* 6:e6050.
- Vivien R., Apothéloz-Perret-Gentil L., Pawlowski J., Werner I., Ferrari B.J.D. 2019. Testing different metabarcoding approaches to assess aquatic oligochaete diversity and the biological quality of sediments. *Ecological Indicators* 106:105453.
- Vivien R., Casado-Martinez C., Lafont M., Ferrari B.J.D. 2020a. Effect thresholds of metals in stream sediments based on in situ oligochaete communities. *Environments* 7, 31.
- Vivien R., Apothéloz-Perret-Gentil L., Pawlowski J., Werner I., Ferrari B.J.D. 2020b. High-throughput DNA barcoding of oligochaetes for abundance-based indices to assess the biological quality of sediments in streams and lakes. *Scientific Reports* 10, 2041.
- Wang W. 1987. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms—Overview. *Environment International* 13, 437–457.
- Wessa P. 2023. Pearson Correlation (v1.0.13) in Free Statistical Software (v1.2.1). Office for Research Development and Education, URL. https://www.wessa.net/rwasp_correlation.wasp/
- Wolfram G., Höss S., Orendt C., Schmitt C., Adamek Z., Bandow N., Großschartner M., Kukkonen J.V.K., Leloup V., Lopez Doval J.C., et al. 2012. Assessing the impact of chemical pollution on benthic invertebrates from three different European rivers using a weight-of-evidence approach. *Science of The Total Environment* 438: 498–509.
- Zhou H., Fend S.V., Gustafson D.L., De Wit P., Erséus C. 2010. Molecular phylogeny of Nearctic species of *Rhynchelmis* (Annelida). *Zoologica Scripta* 39: 378-393.



Annexes

Annexe 1

Expérience en laboratoire sur l'ADN extrait de l'eau porale (méthodes, résultats et discussion)

Nous avons effectué l'expérience en laboratoire décrite ci-dessous pour déterminer si l'ADN extrait de l'eau interstitielle (présente dans les sédiments) pourrait être utilisée pour évaluer la diversité des espèces d'oligochètes présentes dans les sédiments.

Méthodes

Quatre grands béciers de 5 litres contenant du sable lavé (2 cm de hauteur) ont été préparés. Des oligochètes provenant d'une culture (SARL Grebil, France) ont été introduits dans 3 béciers tandis que le 4ème bécier a servi de contrôle négatif. Dans un des trois béciers, 110 oligochètes (densité = 521/0,1m²), dans le second 392 oligochètes (densité = 1858/0,1m²) et dans le troisième, 750 oligochètes (densité = 3555/0,1m²) ont été ajoutés. Ces trois densités correspondent à des densités faibles, moyennes et fortes d'oligochètes observées dans les cours d'eau (Vivien et al., 2020a). Les béciers ont été conservés pendant 3 semaines à une température de 21°C, avec l'eau aérée au moyen d'une pompe à air et les oligochètes ont été nourris 2 fois par semaine avec 0,1-0,3 g de Tetramin.

Après les 3 semaines, l'eau interstitielle a été récoltée dans chacun des 4 béciers. Une grande partie de l'eau surnageante a tout d'abord été retirée par siphonage, jusqu'à laisser env. 1 cm de hauteur d'eau surnageante, ce qui correspond à env. 100 ml d'eau par bécier. Puis les sédiments ont été mélangés énergiquement quelques secondes, et toute l'eau (env. 100ml) a été transvasée dans un récipient de 5L (préalablement lavé) en la faisant passer à travers un tamis de vide de maille de 0,2 mm pour retenir les oligochètes. L'eau a ensuite été transférée dans 2-3 tubes Falcon de 50 ml par échantillon, puis les tubes ont été conservés à -20°C.

Les méthodes d'extraction de l'ADN, d'amplification par PCR, de préparation des librairies, de séquençage, d'analyse des séquences et d'assignation taxonomique sont les mêmes que celles décrites pour la méthode de séquençage à haut débit des échantillons d'éthanol (SHDéth).

Résultats et discussion

Les nombres de reads (séquences) d'oligochètes obtenus par séquençage à haut débit de l'eau interstitielle sont globalement très faibles (entre 80 et 336 reads au total par échantillon) et les séquences obtenues ont toutes été assignées à des espèces de Tubificinae (4 lignées de Tubificinae avec soies capillaires et 4 lignées de Tubificinae sans soies capillaires) (Annexe 2 Tab. 1). Le contrôle négatif ne montre aucune séquence d'oligochètes, ce qui valide l'expérience. La diversité des oligochètes obtenue est conforme à celle attendue, comme les oligochètes provenaient de cultures ne contenant que des Tubificinae. La diversité la plus élevée des oligochètes et le plus grand nombre total de reads ont logiquement été obtenus dans l'échantillon avec une densité d'oligochètes élevée. Le nombre élevé de spécimens d'oligochètes dans cet échantillon a permis d'augmenter les chances de détection de lignées possiblement en très faible abondance dans les échantillons (*Psammoryctides barbatus* T8, *Tubifex tubifex* T9, *Tubifex tubifex* T10, *Limnodrilus hoffmeisteri* T16, *Limnodrilus hoffmeisteri* T17 et *Limnodrilus cervix* T35).

D'après les résultats de cette expérience, l'extraction de l'ADN de l'eau interstitielle ne semble pas optimale pour estimer la diversité des oligochètes dans un échantillon de sédiments, les nombres de reads correspondant aux oligochètes étant très faibles.



A titre de comparaison, dans le cadre d'un projet sur l'étude de la diversité de la faune benthique de cours d'eau genevois à l'aide de l'application de méthodes de metabarcoding ADN(e), une des analyses a consisté à séquencer l'ADN extrait de l'éthanol conservant les sédiments non tamisés (Cermakova et al., en préparation). Des nombres de reads correspondant aux oligochètes élevés ont été obtenus dans ces échantillons, entre 1413 et 109530 reads au total par site (moyenne de 19404 reads). L'étude de l'éthanol ajouté aux sédiments semble donc plus adaptée que celle de l'eau interstitielle pour évaluer la diversité des oligochètes dans un échantillon de sédiment.



Annexe 2 Tab. 1 à 11

Annexe Tab. 1: Nombres de reads (séquences) obtenus dans l'eau interstitielle par espèce (lignée) dans le contrôle négatif et les échantillons avec densité faible, moyenne et élevée d'oligochètes ; pourcentages des différentes lignées dans ces 4 échantillons (contrôle négatif, faible densité, densité moyenne et densité élevée)

	Nombre de reads				Pourcentages			
	contrôle	faible	moyenne	élevée	contrôle	faible	moyenne	élevée
<i>Psammoryctides barbatus</i> T8	0	0	0	3	0,0%	0,0%	0,0%	0,9%
<i>Tubifex tubifex</i> T9	0	2	0	3	0,0%	2,5%	0,0%	0,9%
<i>Tubifex tubifex</i> T10	0	0	0	6	0,0%	0,0%	0,0%	1,8%
<i>Tubifex tubifex</i> T12	0	28	102	201	0,0%	35,0%	43,8%	59,8%
<i>Tubificinae</i> sp. T15	0	38	125	111	0,0%	47,5%	53,6%	33,0%
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T16	0	0	0	2	0,0%	0,0%	0,0%	0,6%
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T17	0	3	0	1	0,0%	3,8%	0,0%	0,3%
<i>Limnodrilus cervix</i> T35	0	9	6	9	0,0%	11,3%	2,6%	2,7%

Annexe Tab. 2: Données de l'analyse morphologique de 15 sites : nombre de spécimens de chaque taxon obtenu par site

		Dou	TIN	BOI	BEN	SEY	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	EPF1	TAUL	DORI	EPF2	LAV
Tubificinae	Tubificinae avec soies capillaires (non re- connaissable à l'état immature)	2		1		14	18	1	19	24	71	7	36	13	33	63
	<i>Tubifex tubifex</i>			2		2			3	12			6			2
	<i>Lophochaeta ignota</i>										2					
	<i>Aulodrilus pluriseta</i>					5	22									
	<i>Psammoryctides barbatus</i>								19					4		1
	<i>Potamotheix bavaricus</i>															24
	<i>Potamotheix hammoniensis</i>						3				4					1
	<i>Potamotheix heuscheri</i>						1									
	<i>Tasserkidrilus kessleri</i>						1									
	<i>Emboloccephalus velutinus</i>	53											1			
	Tubificinae sans soies capillaires (non re- connaissable à l'état immature)	8		22		40	42	12	19	29	15	37	39	46	65	3
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>			44		8	9	1	12	20	6	7	19	22	2	
	<i>Limnodrilus claparedianus</i>			11			7		1			1				
	<i>Limnodrilus profundicola</i>							1						1		
	<i>Limnodrilus udekemianus</i>								6		2			1		
	<i>Aulodrilus limnobius</i>						2									
Rhyacodrilinae	<i>Botrioneurum vej dovskyanum</i>								6							
	<i>Rhyacodrilus falciformis</i>	10														
Lumbriculidae	Lumbriculidae (non reconnaissable à l'état immature)	7	33	2		18		45	8	2		1		1		
	Lumbriculidae (non reconnaissable à l'état immature) avec pointes simples					11										
	<i>Stylodrilus heringianus</i>			3				3								
	<i>Lumbriculus variegatus</i>					1										6
Pristiniinae	<i>Pristina jenkinae</i>													1		



		Dou	TIN	BOI	BEN	SEY	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	EPF1	TAUL	DORI	EPF2	LAV
Naidinae	<i>Nais communis / variabilis</i>	4	1		3								1	1		
	<i>Nais elinguis</i>			12								9		11		
	<i>Nais christinae</i>													1		
	<i>Nais alpina</i>	2						4								
Enchytraeidae	<i>Lumbricillus</i> sp.		2									42				
	<i>Enchytraeus buchholzi</i>	1	6		2	1	1	6								
	<i>Cernosvitoviella</i> sp.		2	1				2				1				
	Enchytraeidae sp. type <i>Cernosvitoviella</i>				2											
	<i>Achaeta</i> sp.							5		11						
	<i>Fridericia</i> sp.		7		2								1			
	<i>Henlea</i> sp.		3							1						
	<i>Cognettia</i> sp.		1		4											
	<i>Marionina argentea</i>	14	12		1	2		11								
	<i>Marionina</i> sp.		1		1			1	3							
	<i>Globulidrilus riparius</i>		5			1		1	5							
	<i>Mesenchytraeus armatus</i>	1	2		6											
	Enchytraeidae sp. 1 crochet par faisceau dorsal, <i>M. armatus</i> juvénile ?		10		10											
	Enchytraeidae sp.		7		15					1						
Lumbricidae	Lumbricidae sp.	3	2		1											
	<i>Eiseniella tetraedra</i>		2		1			2					2			

Annexe Tab. 3: Données de l'analyse morphologique de 16 sites : nombre de spécimens de chaque taxon obtenu par site

		MPA	Cugy	Grab	Fle	Chrum	LAND	URT	ECH	UNIL	MOH	S2	S6	S1	S9	VE	Sor
Tubificinae	Tubificinae avec soies capillaires (non re- connaissable à l'état immature)	7			1	19	4	24	3	3	16	60	54	79	35		3
	<i>Tubifex tubifex</i>	3				1		1			1	1		2			
	<i>Lophochaeta ignota</i>					25			1	1							
	<i>Aulodrilus pluriseta</i>					1		2	1		1		1	5		1	2
	<i>Psammoryctides barbatus</i>					13		11			4		1		6	1	
	<i>Potamotheix bavaricus</i>	4				1		3				15	1				
	<i>Potamotheix hammoniensis</i>	1															
	<i>Potamotheix vejdoskyi</i>															3	
	<i>Potamotheix bedoti</i>							1									
	<i>Emblocephalus velutinus</i>			5	11												
	Tubificinae sans soies capillaires (non re- connaissable à l'état immature)	30	1		29	28	44	20		8	62	18	33	12	45	84	58
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	2	1		3	10	4	4		11	10	7	6	2	8	1	8
	<i>Limnodrilus claparedianus</i>					1					1		2		1		
	<i>Limnodrilus profundicola</i>									1			2		6		
	<i>Limnodrilus udekemianus</i>					5	1										
	<i>Aulodrilus limnobius</i>						1										
	<i>Potamotheix moldaviensis</i>															8	
Rhyacodrilinae	<i>Botrioneurum vejdoskyanum</i>															1	
	<i>Rhyacodrilus falciformis</i>			3					4								
	<i>Rhyacodrilus</i> sp.			1					2								
Lumbriculidae	Lumbriculidae (non reconnaissable à l'état immature)		12	49	27	1	4	7		2			1			1	3
	Lumbriculidae (non reconnaissable à l'état immature) avec pointes simples								25								
	<i>Stylodrilus heringianus</i>		2	23	2											2	1



		MPA	Cugy	Grab	Fle	Chrum	LAND	URT	ECH	UNIL	MOH	S2	S6	S1	S9	VE	Sor
	<i>Bichaeta sanguinea</i>								1								
Pristininae	<i>Pristina jenkiniae</i>		1						1								
Naidinae	<i>Nais communis / variabilis</i>		4		7				1	2							2
	<i>Nais elinguis</i>						26	26		70	6						22
	<i>Nais christinae</i>						4										
	<i>Chaetogaster diastrophus</i>						1										
	<i>Chaetogaster diaphanus</i>						1										1
Enchytraeidae	<i>Lumbricillus</i> sp.	51								2						1	
	<i>Enchytraeus buchholzi</i>		1	1	1		1										
	<i>Cernosvitoviella</i> sp.		5		5				4								1
	<i>Achaeta</i> sp.								2								
	<i>Fridericia</i> sp.						1										
	<i>Henlea</i> sp.			2					34								
	<i>Cognettia</i> sp.								1								
	<i>Marionina argentea</i>		37	5	14				3								
	<i>Marionina</i> sp.				2				2								
	<i>Globulidrilus riparius</i>				2												1
	Enchytraeidae sp.			2			1		2								
Lumbricidae	Lumbricidae sp.			2													
	<i>Eiseniella tetraedra</i>		3		1												
Haplotaxidae	<i>Haplotaxis gordioides</i>			4	1												

Annexe Tab. 4: Données du séquençage à haut débit de spécimens marqués génétiquement de 15 sites : nombre de spécimens de chaque taxon obtenu par site ; les noms des taxons sont suivis par les noms des lignées, E=Enchytraeidae, LC=Lumbricidae, N=Naidinae, P=Pristininae, R=Rhyacodrilinae, T=Tubificinae, LL=Lumbriculidae; les lignées en gras correspondent à des nouvelles lignées pour la base de données COI de référence suisse

Espèce/lignée	Dou	TIN	BOI	BEN	SEY	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	EPF1	TAUL	DORI	EPF2	LAV
<i>Lumbricillus</i> sp. E3											21				
<i>Marionina argentea</i> E5	1	2													
<i>Globulidrilus riparius</i> E9								2							
<i>Globulidrilus riparius</i> E11									1						
<i>Lumbricillus</i> sp. E13		1													
<i>Henlea perpusilla</i> E16		4													
<i>Enchytraeus buchholzi</i> E17							4								
Enchytraeidae sp. E18							1								
Enchytraeidae sp. E21				1											
<i>Fridericia dura - ratzeli</i> E22		1													
Enchytraeidae sp. E24	1														
Enchytraeidae sp. E25							1								
Enchytraeidae sp. E27	2														
Enchytraeidae sp. E28							1								
<i>Fridericia striata</i> E30				1											
Enchytraeidae sp. E31		2													
Enchytraeidae sp. E33		1													
<i>Fridericia perrieri</i> E34									1						
Enchytraeidae sp. E35				1											
<i>Buchholzia appendiculata</i> E37		1		2			2								
Enchytraeidae sp. E38				1											
Enchytraeidae sp. E40	1						1								
Enchytraeidae sp. E41	1														
Enchytraeidae sp. E42	1														



Espèce/lignée	Dou	TIN	BOI	BEN	SEY	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	EPF1	TAUL	DORI	EPF2	LAV
<i>Henlea perpusilla</i> E43	1	1													
Enchytraeidae sp. E46												2			
<i>Enchytraeus buchholzi</i> E50		1													
<i>Achaeta unibulba</i> E51				1											
Enchytraeidae sp. E53				1											
Enchytraeidae sp. E55		2		1											
<i>Achaeta</i> sp. E56									2						
Enchytraeidae sp. E58				6											
<i>Enchytronia christenseni</i> E60									1						
<i>Cognettia chalupskyi</i> E61				1											
<i>Cognettia chlorophila</i> E62				2											
<i>Cognettia varisetosa</i> E63				1											
<i>Stercutus niveus</i> E65				3											
Enchytraeidae sp. E67				1											
<i>Mesenchytraeus armatus</i> E68		10		6											
<i>Achaeta danica</i> E69									3						
<i>Achaeta iberica</i> E70									1						
<i>Eiseniella tetraedra</i> LC2				3			1								
<i>Eiseniella tertraedra</i> LC3		2		1											
<i>Aporrectodea rosea</i> LC5	1														
<i>Aporrectodea icterica</i> LC6									1						
<i>Chaetogaster diaphanus</i> N1							1								
<i>Nais communis</i> N3	1			3											
<i>Nais elinguis</i> N4			3	3	1						4		5		
<i>Ophidonais serpentina</i> N5									1						
<i>Nais alpina</i> N8							3								

Espèce/lignée	Dou	TIN	BOI	BEN	SEY	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	EPF1	TAUL	DORI	EPF2	LAV
<i>Nais communis</i> N9					1								2		
<i>Pristina jenkinsae</i> P1				3					2			1	1		
<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i> R1								4						1	
<i>Rhyacodrilus falciformis</i> R2	5	1													
<i>Rhyacodrilus</i> sp. R3									1						
Tubificinae sp. T2										35				5	
Tubificinae sp. T3												1			
<i>Aulodrilus pluriset</i> a T4					2				2			1			
<i>Lophochaeta ignota</i> T6								2		1					
<i>Potamo</i> thrix bavaricus T7			1												40
<i>Psammoryctides barbatus</i> T8								9					1		
<i>Tubifex tubifex</i> T9					2				1		1	10		1	2
<i>Tubifex tubifex</i> T10					3			7	2		1	1			
<i>Tubifex tubifex</i> T11			1	2				1	9		1	2	4	8	2
<i>Tubifex tubifex</i> T12						2									
<i>Tubifex montanus</i> T13						2									
Tubificinae sp. T15											1			4	
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T17	1		25		9	4	2	9	7	3	14	15	30	16	
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T18	1		4			12		2	5		2	8	1	7	
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T19											1			1	
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T20					7									1	
<i>Limnodrilus claparedianus</i> T22			6			4			4			4	2	3	
<i>Limnodrilus udekemianus</i> T23								5		1			1		
<i>Embol</i> ocephalus velutinus T25	25														
<i>Tubifex tubifex</i> T27								1							
<i>Potamo</i> thrix hammoniensis T28						8				6					



Espèce/lignée	Dou	TIN	BOI	BEN	SEY	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	EPF1	TAUL	DORI	EPF2	LAV
<i>Tasserkidrilus kessleri</i> T33					1	1									
<i>Aulodrilus limnobius</i> T36						1									
<i>Potamothrix heuscheri</i> T41						1									
<i>Aulodrilus pluriseta</i> T42						9									
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T43											1				
Tubificinae sp. (avec ou sans soies capillaires ?) T44													1		
Tubificinae sp. (avec soies capillaires) T46					2			2		1					
<i>Lumbriculus variegatus</i> LL2					2										4
<i>Stylodrilus heringianus</i> LL3	2	19	1	3	7	1	28								
Lumbriculidae sp. LL5					10			2				1			
<i>Stylodrilus sanguineus</i> LL8	4							1							

Annexe Tab. 5: Données du séquençage à haut débit de spécimens marqués génétiquement de 14 sites : nombre de spécimens de chaque taxon obtenu par site ; les noms des taxons sont suivis par les noms des lignées, E=Enchytraeidae, LC=Lumbricidae, N=Naidinae, P=Pristininae, R=Rhyacodrilinae, T=Tubificinae, H=Haplotaxidae, LL=Lumbriculidae ; les lignées en gras correspondent à des nouvelles lignées pour la base de données COI de référence suisse

Espèce/lignée	MPA	Cugy	Grab	Fle	Chrum	Land	Urt	ECH	UNIL	MOH	S2	S6	S1	S9
<i>Lumbricillus</i> sp. E3	21													
<i>Marionina argentea</i> E5		8	7	2				1						
<i>Cernosvitoviella minor</i> E8		1												
<i>Globulidrilus riparius</i> E11	2	1		1										
<i>Henlea perpusilla</i> E16			3					27						
<i>Enchytraeus buchholzi</i> E17	1													
Enchytraeidae sp. E18		3												
<i>Cernosvitoviella</i> sp. E19		1		1										
Enchytraeidae sp. E25		4												
Enchytraeidae sp. E26		4												
Enchytraeidae sp. E27		2		3										
Enchytraeidae sp. E28		8						1						
<i>Fridericia isseli</i> E32		1												
<i>Fridericia perrieri</i> E34		1												
<i>Henlea montana</i> E39			1											
Enchytraeidae sp. E47		1												
<i>Henlea ventriculosa</i> E48						1								
Enchytraeidae sp. E54								1						
<i>Cognettia chalupskyi</i> E61								2						
<i>Eiseniella tertraedra</i> LC3		1		1										
<i>Chaetogaster diaphanus</i> N1						1								
<i>Nais communis</i> N3		5		1		1								
<i>Nais elinguis</i> N4						11	11		39	3				
<i>Nais communis</i> N9		1												



Espèce/lignée	MPA	Cugy	Grab	Fle	Chrum	Land	Urt	ECH	UNIL	MOH	S2	S6	S1	S9
<i>Nais christinae</i> N11						1								
<i>Nais barbata</i> N17						2								
<i>Pristina foreli</i> / <i>aequiseta</i> P2		1												
<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i> R1							1							
<i>Rhyacodrilus falciformis</i> R2					1			7						
Tubificinae sp. T2											6	9	36	10
<i>Aulodrilus pluriset</i> a T4							1					1	3	1
<i>Lophochaeta ignota</i> T6					14									
<i>Potamo</i> thrix bavaricus T7					7	6	10			1	32	7	2	
<i>Psammoryctides barbatus</i> T8					8	2	2			4		3		2
<i>Tubifex tubifex</i> T9	2							5						
<i>Tubifex tubifex</i> T10												3	2	
<i>Tubifex tubifex</i> T11	4						2		3	5	1	1		
Tubificinae sp. T15							2							
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T17	13			15	2	10	10		6	30	7	15	4	34
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T18	3				9	2	1			3	1	7		
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T19										1				
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T20						6						1		
<i>Limnodrilus clapedianus</i> T22					3	2	1							
<i>Limnodrilus udekemianus</i> T23					3	1								
<i>Embol</i> ocephalus velutinus T25			5	6										
<i>Potamo</i> thrix moldaviensis T30										1				
Tubificinae sp. (avec soies capillaires) T40							3							
<i>Haplotaxis gordioides</i> H1			1											
<i>Stylodrilus heringianus</i> LL3		5	31	18			2							
<i>Stylodrilus lemani</i> LL4								3						

Espèce/lignée	MPA	Cugy	Grab	Fle	Chrum	Land	Urt	ECH	UNIL	MOH	S2	S6	S1	S9
Lumbriculidae sp. LL5	1					1								
Lumbriculidae sp. LL7								1						



Annexe Tab. 6: Données du séquençage à haut débit de l'éthanol : nombre de reads (séquences) de chaque taxon obtenu par site ; les noms des taxons sont suivis par les noms des lignées, E=Enchytraeidae, LC=Lumbricidae, N=Naidinae, P=Pristininae, R=Rhyacodrilinae, T=Tubificinae, H=Haplotaxidae, LL=Lumbriculidae, O=Oligochaeta ; les lignées en gras correspondent à des nouvelles lignées pour la base de données COI de référence suisse

Espèce/lignée	DOU	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	Sol	Grab	Fle	Chrum	LAND	URT	ECH	UNIL	MOH	VE	Sor
<i>Marionina argentea</i> E5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Globulidrilus riparius</i> E9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0
<i>Globulidrilus riparius</i> E11	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lumbricillus</i> sp. E13	0	741	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Henlea perpusilla</i> E16	0	1383	0	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	1057	0	0	0	0
<i>Cernovitoviella aggtelekiensis</i> E19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1001	0	0	0	7	0	0	0	0
<i>Fridericia dura_ratzeli</i> E22	0	0	0	4	10	0	27	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E23	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E33	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia perrieri</i> E34	0	0	0	123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Buchholzia appendiculata</i> E37	0	248	0	16	4	0	76	0	0	0	5	0	0	9	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E41	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	181	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Henlea perpusilla</i> E43	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Henlea ventriculosa</i> E48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E58	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cognettia chalupskyi</i> E61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E67	0	0	0	616	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mesenchytraeus armatus</i> E68	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Espèce/lignée	DOU	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	Sol	Grab	Fle	Chrum	LAND	URT	ECH	UNIL	MOH	VE	Sor
<i>Achaeta danica</i> E69	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E71	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E72	0	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E73	0	77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E75	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dendrodrilus rubidus</i> LC1	0	74	0	25	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eiseniella tertraedra</i> LC2	0	8	0	322	0	0	1424	0	0	0	5	100	0	23	6	0	0	0	0	0
<i>Eiseniella tertraedra</i> LC3	14	1766	0	1612	0	0	0	0	0	0	0	116	0	1219	5	0	0	0	0	0
<i>Helodrilus oculatus</i> LC4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetogaster diaphanus</i> N1	0	0	0	0	3247	0	272	0	0	0	0	0	0	4663	1262	0	285	0	0	4986
<i>Nais communis</i> N3	0	2	0	16	0	0	0	0	0	0	0	22	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Nais elinguis</i> N4	0	0	74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	22	0	79	101	0	185
<i>Ophidonais serpentina</i> N5	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Nais alpina</i> N8	0	0	0	0	0	0	70	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0
<i>Nais communis</i> N9	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	5	0	0	11
<i>Nais christinae</i> N11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>Nais stolci_pardalis</i> N12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	20	0	0	0	0	11	0
<i>Stylaria lacustris</i> N16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
<i>Nais barbata</i> N17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetogaster diastrophus</i> N19	0	0	0	0	49	100	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	27	0	0
<i>Chaetogaster</i> sp. N20	0	0	0	0	0	0	37	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
<i>Amphichaeta raptisae</i> N21	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetogaster limnaei</i> N22	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetogaster diastrophus</i> N23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	131	0	0	0	0	0	0



Espèce/lignée	DOU	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	Sol	Grab	Fle	Chrum	LAND	URT	ECH	UNIL	MOH	VE	Sor
Naidinae sp. N24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	374	0	0	0	0	0	0
<i>Pristina jenkinsae</i> P1	0	0	634	184	8	7	0	142	0	0	0	0	0	91	0	91	8	16	0	243
<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i> R1	0	0	0	0	2	0	0	220	0	0	0	0	0	290	0	0	0	0	0	0
<i>Rhyacodrilus falciformis</i> R2	102	0	0	0	3	0	0	0	0	0	20	0	0	23	0	41	0	0	0	0
<i>Rhyacodrilus</i> sp. R3	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhyacodrilus subterreanus</i> R4	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2519	0	0	0	0	0	0	4	0	0	79
Tubificinae sp. T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
<i>Aulodrilus pluriset</i> a T4	0	0	14	0	19542	363	5	0	203	0	0	0	885	106	3064	19	83	3120	766	14672
<i>Branchiura sowerbyi</i> T5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	185	0	0	0	0	0	0
<i>Lophochaeta ignota</i> T6	0	0	0	0	0	0	0	261	0	194	0	0	64502	0	0	0	0	29	0	0
<i>Potamothrix bavaricus</i> T7	0	0	222	0	17	764	0	28	100	0	0	0	28664	30697	44537	0	2600	10843	1774	5
<i>Psammoryctides barbatus</i> T8	0	0	0	0	0	0	0	51817	0	15	0	0	6072	1121	371	0	0	2008	0	0
<i>Tubifex tubifex</i> T9	0	6	18	0	2546	0	0	1756	13467	0	0	0	54	259	0	204	15102	0	0	166
<i>Tubifex tubifex</i> T10	0	0	0	0	51351	5912	0	60521	61755	19	0	0	143	3488	1096	0	0	34810	0	9
<i>Tubifex tubifex</i> T11	0	0	0	0	19	0	0	0	39	37	0	0	0	5	0	0	5	132	0	0
<i>Tubifex tubifex</i> T12	0	0	0	3	290	833	0	881	0	0	0	0	4	2680	16	0	662	387	0	28
<i>Tubifex montanus</i> T13	0	0	0	0	0	104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. T15	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2060	0	8	0	0	258
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T16	0	0	0	0	0	371	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T17	14	0	28003	0	16813	13824	112	31850	5508	41955	0	3856	991	16362	2230	0	1989	23613	1480	14216
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T18	14		5206	0	38	82727	0	3653	280	1448	0	0	10691	1859	13	0	44	326	0	279
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	4	25	14268	921
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T20	0	0	0	0	69	42	0	0	0	0	0	0	0	143	4	0	0	0	0	0
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T21	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

Espèce/lignée	DOU	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	Sol	Grab	Fle	Chrum	LAND	URT	ECH	UNIL	MOH	VE	Sor
<i>Limnodrilus claparedianus</i> T22	0	0	3716	0	7	12034	0	237	8593	0	0	0	1231	449	51	0	0	280	25	3891
<i>Limnodrilus udekemianus</i> T23	0	0	0	0	409	0	0	46	7	0	0	0	14165	375	0	0	0	79	0	0
<i>Emboloccephalus velutinus</i> T25	735	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	737	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Potamoithrix hammoniensis</i> T28	0	0	0	0	0	9553	0	0	0	46809	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Potamoithrix vej dovskyi</i> T29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2007	0
<i>Potamoithrix moldaviensis</i> T30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	57	0	0	348	7628	72
<i>Tasserkidrilus kessleri</i> T33	0	0	66	0	59	869	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0
<i>Aulodrilus limnobius</i> T36	0	0	0	0	0	81	0	0	0	0	0	0	0	89	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. (avec soies capillaires) T40	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	3326	0	0	0	0	0
<i>Potamoithrix heuscheri</i> T41	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aulodrilus pluriseta</i> T42	0	0	0	0	0	406	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. (avec soies capillaires) T46	0	0	0	0	669	0	0	1860	0	2987	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Limnodrilus</i> sp. T47	0	0	0	0	0	0	0	0	818	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. (avec ou sans soies capillaires ?) T48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
Tubificinae sp. (avec soies capillaires) T49	0	0	0	0	0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Haplotaxis gordioides</i> H1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	186	1965	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lumbriculus variegatus</i> LL2	0	0	0	0	875	0	0	0	0	0	0	0	35	102	0	0	0	0	0	38
<i>Stylodrilus heringianus</i> LL3	59	75988	1934	9379	2670	0	9147	940	260	0	68352	88962	211	12353	23109	3	358	141	3172	7853
<i>Stylodrilus lemami</i> LL4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2888	0	0	61283	0
Lumbriculidae sp. LL5	0	0	0	0	93	0	0	84	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	3
Lumbriculidae sp. LL7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
<i>Stylodrilus sanguineus</i> LL8	14	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lumbriculus variegatus</i> LL10	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	106	0	0	0	0	0	0
Lumbriculidae sp. LL11	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0



Espèce/lignée	DOU	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	Sol	Grab	Fle	Chrum	LAND	URT	ECH	UNIL	MOH	VE	Sor
Lumbriculidae sp. LL12	0	4	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oligochaeta sp. O1	0	712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexe Tab. 7: Données du séquençage à haut débit de mélanges de spécimens: nombre de reads (séquences) de chaque taxon obtenu par site ; les noms des taxons sont suivis par les noms des lignées, E=Enchytraeidae, LC=Lumbricidae, N=Naidinae, P=Pristininae, R=Rhyacodrilinae, T=Tubificinae, H=Haplotaxidae, LL=Lumbriculidae ; les lignées en gras correspondent à des nouvelles lignées pour la base de données COI de référence suisse

	TIN	Spez17	Spez17	Grab	Grab	FLE	FLE	Chrum	Chrum	LAND	LAND	URT	URT	UNIL	UNIL	MOH	MOH
	mél. 1	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2
<i>Lumbricillus rutilus</i> E3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	111	0	0	0
<i>Marionina argentea</i> E4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
<i>Marionina argentea</i> E5	16	0	0	31	11	3	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Globulidrilus riparius</i> E9	0	184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Globulidrilus riparius</i> E11	0	0	0	0	0	1151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lumbricillus</i> sp. E13	1250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Henlea perpusilla</i> E16	4737	0	0	1365	2620	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cernosvitoviella aggtelekiensis</i> E19	0	0	0	9	37	14	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia dura_ratzeli</i> E22	196	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E23	0	0	0	0	0	719	551	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E27	0	0	0	0	0	1157	1671	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E28	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fridericia isseli</i> E32	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4212	0	0	0	0	0	0	0
<i>Buchholzia appendiculata</i> E37	348	0	0	568	23882	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E40	0	0	0	1972	0	0	23592	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Henlea ventriculosa</i> E48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	594	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enchytraeus buchholzi</i> E50	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mesenchytraeus armatus</i> E68	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E71	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E72	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



	TIN	Spez17	Spez17	Grab	Grab	FLE	FLE	Chrum	Chrum	LAND	LAND	URT	URT	UNIL	UNIL	MOH	MOH
	mél. 1	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2
Enchytraeidae sp. E78	0	0	0	804	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0
<i>Globulidrilus riparius</i> E76	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enchytraeidae sp. E77	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eiseniella tertraedra</i> LC2	0	0	0	0	0	0	377	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eiseniella tertraedra</i> LC3	114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetogaster diaphanus</i> N1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6878	33093	0	0	0	0	0	0
<i>Nais communis</i> N3	0	0	0	0	12	44	85	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
<i>Nais elinguis</i> N4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	222	187	87	95	2324	646	16	9
<i>Nais communis</i> N9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1046	0	0	0
<i>Nais christinae</i> N11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57	0	0	0	0	0	0
<i>Nais stolci_pardalis</i> N12	0	0	0	0	0	384	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pristina jenkinsae</i> P1	0	1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i> R1	0	247	93	0	0	0	0	0	0	0	133	0	0	0	0	0	0
<i>Rhyacodrilus falciformis</i> R2	0	0	0	51	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. T2	0	0	0	0	0	0	0	0	13	58	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lophochaeta ignota</i> T6	0	0	10720	0	0	0	0	20854	53945	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Potamothenrix bavaricus</i> T7	0	0	0	0	0	0	0	11142	14482	172991	52476	18282	89563	0	110579	0	0
<i>Psammoryctides barbatus</i> T8	0	9261	4343	0	0	0	0	174	226	0	0	462	129	0	0	296	122
<i>Tubifex tubifex</i> T10	0	69796	70557	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Tubifex tubifex</i> T11	0	0	21	0	0	3	0	3	0	0	1	6	0	13	8	29	1
<i>Tubifex tubifex</i> T12	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. T15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	913	851	0	0	0	0
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T17	0	1249	18537	0	0	73001	70279	316	1542	30607	49758	13051	31598	150106	118823	58764	91120

	TIN	Spez17	Spez17	Grab	Grab	FLE	FLE	Chrum	Chrum	LAND	LAND	URT	URT	UNIL	UNIL	MOH	MOH
	mél. 1	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T18	0	517	2561	0	0	0	0	8665	13424	0	78	1169	0	0	3467	597	157
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T19	0	0	0	0	0	0	0	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	126	167	6	0	0	0	0	0
<i>Limnodrilus claparedianus</i> T22	0	0	0	0	0	0	0	921	578	0	0	0	0	0	0	0	54
<i>Limnodrilus udekemianus</i> T23	0	170	35	0	0	0	0	993	1801	16	0	0	0	0	0	0	0
<i>Embolocephalus velutinus</i> T25	0	0	0	330	0	5605	230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Potamotheix moldaviensis</i> T30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	296	115
<i>Tasserkidrilus kessleri</i> T33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. (avec soies capillaires) T46	0	397	651	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. (avec soies capillaires) T50	0	229	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubificinae sp. (sans soies capillaires) T51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54	0	0
<i>Haplotaxis gordioides</i> H1	0	0	0	124	1330	0	4654	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lumbriculus variegatus</i> LL2	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	40	0	0	0	0	0	0
<i>Stylodrilus heringianus</i> LL3	52378	3482	900	87699	101333	44662	24004	90	28	5	3	847	1177	3893	2660	0	0
Lumbriculidae sp. LL5	0	23	48	0	0	0	0	0	0	10	23	3	0	23	111	0	0



Annexe Tab. 8: Relevé des nombres de spécimens des différentes familles/sous-familles/groupes de tubificidés sans et avec soies capillaires et des espèces *Embolocephalus velutinus* et *Chaetogaster diaphanus* introduits dans chaque mélange (identification avec loupe binoculaire)

	TIN mélange 1	Spez17 mélange 1	Spez17 mélange 2	Grab mélange 1	Grab mélange 2	Fle mélange 1	Fle mélange 2	Chrum mélange 1	Chrum mélange 2	LAND mélange 1	LAND mélange 2	URT mélange 1	URT mélange 2	UNIL mélange 1	UNIL mélange 2	MOH mélange 1	MOH mélange 2
Naidinae					1	2	2			12	13	13	12	35	24	4	2
Enchytraeidae	21	2	1	15	11	16	14			1	1						
Lumbriculidae	26	6	10	31	37	16	18										
Haplotaxidae	2			1	1		1										
Pristininae						1											
Lumbricidae							1										
tubificidés avec soies capillaires		29	27	1		2			20							9	6
tubificidés sans soies capillaires		13	15		1	11	13		29							37	44
tubificidés totaux								50		35	36	37	39	16	26		
<i>Embolocephalus velutinus</i>				3		3	1										
<i>Chaetogaster diaphanus</i>										1	1						

Annexe Tab. 9: Comparaison de la détection des espèces (lignées) entre le séquençage à haut débit de l'éthanol et le séquençage à haut débit de spécimens marqués ; les espèces détectées que par le séquençage à haut débit de l'éthanol sont indiqués en rouge, celles détectés que par le séquençage à haut débit de spécimens marqués sont en vert et celles détectées à la fois par le séquençage à haut débit de spécimens marqués et le séquençage à haut débit de l'éthanol sont en bleu. Les valeurs dans les cases bleues correspondent au rapport entre proportion de la lignée obtenue par le séquençage à haut débit de l'éthanol et proportion de la lignée obtenue par le séquençage à haut débit de spécimens marqués ; les noms des taxons sont suivis par les noms des lignées, E=Enchytraeidae, LC=Lumbricidae, N=Naidinae, P=Pristininae, R=Rhyacodrilinae, T=Tubificinae, H=Haplotaxidae, LL=Lumbriculidae, O=Oligochaeta

taxon	Dou	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	Grab	Fle	Chrum	Land	URT	ECH	UNIL	MOH
<i>Marionina argentea</i> E5		0,0009																
<i>Globulidrilus riparius</i> E9																		
<i>Globulidrilus riparius</i> E11																		
<i>Lumbricillus</i> sp. E13		0,4386																
<i>Henlea perpusilla</i> E16		0,2047																
<i>Enchytraeus buchholzi</i> E17																		
Enchytraeidae sp. E18																		
<i>Cernovitoviella</i> sp. E19																		
Enchytraeidae sp. E21																		
<i>Fridericia dura - ratzeli</i> E22																		
Enchytraeidae sp. E23																		
Enchytraeidae sp. E24																		
Enchytraeidae sp. E25																		
Enchytraeidae sp. E27																		
Enchytraeidae sp. E28																		
<i>Fridericia striata</i> E30																		
Enchytraeidae E31																		
Enchytraeidae sp. E33																		
<i>Fridericia perrieri</i> E34																		
Enchytraeidae sp. E35																		
<i>Buchholzia appendiculata</i> E37		0,1468																
Enchytraeidae sp. E38																		



taxon	Dou	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	Grab	Fle	Chrum	Land	URT	ECH	UNIL	MOH
<i>Henlea montana</i> E39																		
Enchytraeidae sp. E40																		
Enchytraeidae sp. E41	0,6420																	
Enchytraeidae sp. E42																		
<i>Henlea perpusilla</i> E43		0,0154																
Enchytraeidae sp. E47																		
<i>Henlea ventriculosa</i> E48																		
<i>Enchytraeus buchholzi</i> E50																		
<i>Achaeta unibulba</i> E51																		
Enchytraeidae sp. E53																		
Enchytraeidae sp. E54																		
Enchytraeidae sp. E55																		
<i>Achaeta</i> sp. E56																		
Enchytraeidae sp. E58																		
<i>Enchytronia christenseni</i> E60																		
<i>Cognettia chalupskyi</i> E61																		
<i>Cognettia chlorophila</i> E62																		
<i>Cognettia varisetosa</i> E63																		
<i>Stercutus niveus</i> E65																		
Enchytraeidae sp. E67																		
<i>Mesenchytraeus armatus</i> E68																		
<i>Achaeta danica</i> E69																		
<i>Achaeta iberica</i> E70																		
Enchytraeidae sp. E71																		
Enchytraeidae sp. E72																		
Enchytraeidae sp. E73																		

taxon	Dou	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	Grab	Fle	Chrum	Land	URT	ECH	UNIL	MOH
Enchytraeidae sp. E74																		
Enchytraeidae sp. E75																		
<i>Dendrodrilus rubidus</i> LC1																		
<i>Eiseniella tetraedra</i> LC2																		
<i>Eiseniella tertraedra</i> LC3																		
<i>Helodrilus oculatus</i> LC4																		
<i>Aporrectodea rosea</i> LC5																		
<i>Aporrectodea icterica</i> LC6																		
<i>Chaetogaster diaphanus</i> N1																		
<i>Nais communis</i> N3																		
<i>Nais elinguis</i> N4																		
<i>Ophidonais serpentina</i> N5																		
<i>Nais alpina</i> N8																		
<i>Nais communis</i> N9																		
<i>Nais christinae</i> N11																		
<i>Nais stolci_pardalis</i> N12																		
<i>Stylaria lacustris</i> N16																		
<i>Nais barbata</i> N17																		
<i>Chaetogaster diastrophus</i> N19																		
<i>Chaetogaster</i> sp. N20																		
<i>Amphichaeta raptisae</i> N21																		
<i>Chaetogaster limnaei</i> N22																		
<i>Chaetogaster diastrophus</i> N23																		
Naidinae sp. N24																		
<i>Pristina jenkinae</i> P1																		
<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i> R1																		



taxon	Dou	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	Grab	Fle	Chrum	Land	URT	ECH	UNIL	MOH
<i>Rhyacodrilus falciformis</i> R2	1,0074															0,0646		
<i>Rhyacodrilus</i> sp. R3									0,0039									
<i>Rhyacodrilus subterreanus</i> R4																		
Tubificinae sp. T2										0,0352								
Tubificinae sp. T3																		
<i>Aulodrilus pluriseta</i> T4					4,6442				0,0490						1,7351			
<i>Branchiura sowerbyi</i> T5																		
<i>Lophochaeta ignota</i> T6								0,0397		0,0950			1,6962					
<i>Potamothrix bavaricus</i> T7			0,2281										1,5075	3,1030	2,5220			6,8181
<i>Psammoryctides barbatus</i> T8								1,7535					0,2794	0,3399	0,1050			0,3157
<i>Tubifex tubifex</i> T9					0,6051				6,5064							0,4503		
<i>Tubifex tubifex</i> T10					8,1358			2,6331	14,9180									
<i>Tubifex tubifex</i> T11									0,0021								0,0038	0,0166
<i>Tubifex tubifex</i> T12						0,1463												
<i>Tubifex montanus</i> T13						0,0183												
Tubificinae sp. T15															0,5833			
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T16																		
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T17	0,6914		1,1507		0,8879	1,2141	0,2253	1,0778	0,3802	6,8480		0,1274	0,1824	0,9924	0,1263		0,7486	0,4949
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T18	0,6914		1,3370			2,4219		0,5563	0,0271				0,4373	0,5637	0,0074			0,0683
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T19																		0,0157
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T20					0,0047									0,0145				
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T21																		
<i>Limnodrilus claparedianus</i> T22			0,6362			1,0569			1,0379				0,1511	0,1362	0,0289			
<i>Limnodrilus udekemianus</i> T23								0,0028					1,7383	0,2274				
<i>Embolocephalus velutinus</i> T25	1,4519										0,0014	0,0609						
<i>Tubifex tubifex</i> T27																		

taxon	Dou	TIN	BOI	BEN	SEY-Sp52	Spez18	Spez19	Spez17	SP027	SOL	Grab	Fle	Chrum	Land	URT	ECH	UNIL	MOH
<i>Potamothrix hammoniensis</i> T28						0,4195				3,8202								
<i>Potamothrix moldaviensis</i> T30																		0,2188
<i>Tasserkidrilus kessleri</i> T33					0,0280	0,3053												
<i>Aulodrilus limnobius</i> T36						0,0285												
Tubificinae sp. (avec sc) T40															0,6278			
<i>Potamothrix heuscheri</i> T41						0,0098												
<i>Aulodrilus pluriseta</i> T42						0,0158												
Tubificinae sp. (avec sc) T46					0,1590			0,2832		1,4626								
<i>Limnodrilus</i> sp. T47																		
Tubificinae sp. (indet. sc) T48																		
Tubificinae sp. (avec sc) T49																		
<i>Haplotaxis gordioides</i> H1											0,1297							
<i>Lumbriculus variegatus</i> LL2					0,2079													
<i>Stylodrilus heringianus</i> LL3	1,4568	2,3674	1,9868	11,9142	0,1813		1,3141				1,5373	2,4497			6,5430			
<i>Stylodrilus lemani</i> LL4																10,6250		
Lumbriculidae sp. LL5					0,0044			0,0128						0,0073				
Lumbriculidae sp. LL7																0,0441		
<i>Stylodrilus sanguineus</i> LL8	0,1728							0,0018										
<i>Lumbriculus variegatus</i> LL10																		
Lumbriculidae sp. LL11																		
Lumbriculidae sp. LL12																		
Oligochaeta sp. O1																		



Annexe Tab. 10: Comparaison de la détection des espèces (lignées) entre le séquençage à haut débit de mélanges de spécimens (mélanges 1 et 2) et le séquençage à haut débit de spécimens marqués ; les espèces détectées que par le séquençage à haut débit de mélanges de spécimens sont indiqués en rouge, celles détectés que par le séquençage à haut débit de spécimens marqués sont en vert et celles détectées à la fois par le séquençage à haut débit de spécimens marqués et le séquençage à haut débit de mélanges de spécimens sont en bleu. Les valeurs dans les cases bleues correspondent au rapport entre proportion de la lignée obtenue par le séquençage à haut débit de mélanges de spécimens et proportion de la lignée obtenue par le séquençage à haut débit de spécimens marqués ; les noms des taxons sont suivis par les noms des lignées, E=Enchytraeidae, LC=Lumbricidae, N=Naidinae, P=Pristininae, R=Rhyacodrilinae, T=Tubificinae, H=Haplotaxidae, LL=Lumbriculidae

taxon	TIN	Spez17	Spez17	Grab	Grab	Fle	Fle	Chrum	Chrum	Land	Land	URT	URT	UNIL	UNIL	MOH	MOH
	mél. 1	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2
<i>Lumbricillus</i> sp. E3																	
<i>Marionina argentea</i> E4																	
<i>Marionina argentea</i> E5	0,0065			0,0023	0,0006	0,0006	0,0023										
<i>Globulidrilus riparius</i> E9		0,0498															
<i>Globulidrilus riparius</i> E11						0,4359											
<i>Lumbricillus</i> sp. E13	1,0137																
<i>Henlea perpusilla</i> E16	0,9603			0,2350	0,3244												
<i>Cernosvitoviella</i> sp. E19						0,0053	0,0042										
<i>Fridericia dura - ratzeli</i> E22	0,1589																
Enchytraeidae sp. E23																	
Enchytraeidae sp. E27						0,1461	0,2131										
Enchytraeidae sp. E28																	
Enchytraeidae sp. E31																	
<i>Fridericia isseli</i> E32																	
Enchytraeidae sp. E33																	
<i>Buchholzia appendiculata</i> E37	0,2822																
<i>Henlea montana</i> E39																	
Enchytraeidae sp. E40																	
<i>Henlea perpusilla</i> E43																	
<i>Henlea ventriculosa</i> E48										0,1294							
<i>Enchytraeus buchholzi</i> E50	0,0097																

taxon	TIN	Spez17	Spez17	Grab	Grab	Fle	Fle	Chrum	Chrum	Land	Land	URT	URT	UNIL	UNIL	MOH	MOH
	mél. 1	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2
Enchytraeidae sp. E55																	
<i>Mesenchytraeus armatus</i> E68	0,0039																
Enchytraeidae sp. E71																	
Enchytraeidae sp. E72																	
Enchytraeidae sp. E76																	
Enchytraeidae sp. E77																	
<i>Globulidrilus riparius</i> E78																	
Enchytraeidae sp. E79																	
<i>Eiseniella tetraedra</i> LC2																	
<i>Eiseniella tertraedra</i> LC3	0,0462																
<i>Chaetogaster diaphanus</i> N1										1,4980	11,4329						
<i>Nais communis</i> N3																	
<i>Nais elinguis</i> N4										0,0044	0,0059	0,0104	0,0032	0,0182	0,0034	0,0043	0,0016
<i>Nais communis</i> N9																	
<i>Nais christinae</i> N11																	
<i>Nais stolci_pardalis</i> N12																	
<i>Nais barbata</i> N17																	
<i>Pristina jenkinsae</i> P1																	
<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i> R1																	
<i>Rhyacodrilus falciformis</i> R2																	
Tubificinae sp. T2																	
<i>Aulodrilus pluriseta</i> T4																	
<i>Lophochaeta ignota</i> T6																	
<i>Potamothrix bavaricus</i> T7																	



taxon	TIN	Spez17	Spez17	Grab	Grab	Fle	Fle	Chrum	Chrum	Land	Land	URT	URT	UNIL	UNIL	MOH	MOH
	mél. 1	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2	mél. 1	mél. 2
<i>Psammoryctides barbatus</i> T8		0,5568	0,2091					0,0237	0,0154			0,3051	0,0240			0,0592	0,0160
<i>Tubifex tubifex</i> T10		5,3954	4,3671														
<i>Tubifex tubifex</i> T11			0,0091									0,0040		0,0013	0,0005	0,0046	0,0001
<i>Tubifex tubifex</i> T12																	
<i>Tubificinae</i> sp. T15												0,6030	0,1586				
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T17		0,0751	0,8924			1,8430	1,7925	0,1718	0,4212	0,6666	1,7190	1,7238	1,1778	7,6234	4,0220	1,5671	1,5920
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T18		0,1399	0,5548					1,0470	0,8148		0,0135	1,5441				0,1592	0,0274
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T19																	
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> T20										0,0046	0,0096						
<i>Limnodrilus claparedianus</i> T22								0,3338	0,1052								
<i>Limnodrilus udekemianus</i> T23		0,0184	0,0030					0,3599	0,3279	0,0035							
<i>Embolocephalus velutinus</i> T25				0,0341		0,3538	0,0147										
<i>Tubifex tubifex</i> T27																	
<i>Potamothrix moldaviensis</i> T30																0,2368	0,0603
<i>Tasserkidrilus kessleri</i> T33																	
<i>Tubificinae</i> sp. (avec sc) T40																	
<i>Tubificinae</i> sp. (avec sc) T46		0,1074	0,1410														
<i>Tubificinae</i> sp. (avec sc) T50																	
<i>Tubificinae</i> sp. (sans sc) T51																	
<i>Haplotaxis gordioides</i> H1				0,0640	0,4940												
<i>Lumbriculus variegatus</i> LL2																	
<i>Stylodrilus heringianus</i> LL3	2,2355			1,4609	1,2141	0,9396	0,5102					0,5594	0,2194				
<i>Lumbriculidae</i> sp. LL5		0,0062	0,0104							0,0022	0,0079						
<i>Stylodrilus sanguineus</i> LL8																	



Annexe Tab. 11: Description des nouvelles lignées obtenues pour la base de données de référence suisse des séquences COI des oligochètes aquatiques. Pour chaque nouvelle lignée, sont indiqués le No de lignée (interne), la méthode de séquençage et la(les) méthode(s) d'identification ; SHD=séquençage à haut débit

Famille/sous-famille	Espèce	No lignée	Séquençage d'analyse (type)	Méthode d'identification
Enchytraeidae	Enchytraeidae sp.	E18	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E21	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Fridericia dura - ratzeli</i>	E22	SHD spécimens marqués	Données GenBank MN395701
	Enchytraeidae sp.	E24	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E25	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E26	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E27	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Fridericia striata</i>	E30	SHD spécimens marqués	Données GenBank GU902073
	Enchytraeidae sp.	E31	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Fridericia isseli</i>	E32	SHD spécimens marqués	Données GenBank GU902065 10.2%
	Enchytraeidae sp.	E33	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E36	Barcoding (Sanger)	Microscope/Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E38	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Henlea montana</i>	E39	SHD spécimens marqués	Données GenBank MH382731
	Enchytraeidae sp.	E41	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E42	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Henlea perpusilla</i>	E43	SHD spécimens marqués	Données GenBank KR872332
	Enchytraeidae sp.	E46	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Enchytraeus buchholzi</i>	E50	Barcoding (Sanger)	Microscope/Construction d'arbre
	<i>Achaeta unibulba</i>	E51	SHD spécimens marqués	Données GenBank GU902037
	Enchytraeidae sp.	E53	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E54	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E55	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Achaeta</i> sp.	E56	SHD spécimens marqués	Données GenBank MF544303
	Enchytraeidae sp.	E58	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Enchytronia christenseni</i>	E60	SHD spécimens marqués	Données GenBank MG252147
	<i>Cognettia chlorophila</i>	E62	SHD spécimens marqués	Données GenBank KM874822
	<i>Cognettia varisetosa</i>	E63	SHD spécimens marqués	Données GenBank KP878469
	<i>Stercutus niveus</i>	E65	SHD spécimens marqués	Données GenBank MF802044
	Enchytraeidae sp.	E67	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Mesenchytraeus armatus</i>	E68	SHD spécimens marqués	Données GenBank KF672423
	<i>Achaeta danica</i>	E69	SHD spécimens marqués	Données GenBank KY583142
	<i>Achaeta iberica</i>	E70	SHD spécimens marqués	Données GenBank GU902036
	Enchytraeidae sp.	E71	SHD éthanol	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E72	SHD éthanol	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E73	SHD éthanol	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E74	SHD éthanol	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E75	SHD éthanol	Construction d'arbre
	<i>Globulidrilus riparius</i>	E76	SHD mélange spécimens	Données GenBank MF801967
	Enchytraeidae sp.	E77	SHD mélange spécimens	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E78	SHD mélange spécimens	Construction d'arbre
	Enchytraeidae sp.	E79	SHD mélange spécimens	Construction d'arbre
Lumbricidae	<i>Aporrectodea rosea</i>	LC5	SHD spécimens marqués	Données GenBank HE611697
	<i>Aporrectodea icterica</i>	LC6	SHD spécimens marqués	Données GenBank MF121715
Naidinae	<i>Nais barbata</i>	N17	SHD spécimens marqués	Données GenBank JQ519861
	<i>Chaetogaster diaphanus</i>	N18	Barcoding (Sanger)	Microscope/Construction d'arbre
	<i>Chaetogaster diastrophus</i>	N19	Barcoding (Sanger)	Microscope/Construction d'arbre
	<i>Chaetogaster</i> sp.	N20	Barcoding (Sanger)	Loupe binoculaire/Construction d'arbre
	<i>Amphichaeta raptisae</i>	N21	SHD éthanol	Données GenBank GQ355365
	<i>Chaetogaster limnaei</i>	N22	SHD éthanol	Données GenBank KF952322
	<i>Chaetogaster diastrophus</i>	N23	SHD éthanol	Données GenBank GQ355367
	Naidinae sp.	N24	SHD éthanol	Construction d'arbre
Pristininae	<i>Pristina foreli / aequiseta</i>	P2	SHD spécimens marqués	Loupe binoculaire → P. foreli-aequiseta + Données GenBank AF534851 MK249366 10.7-10.5%
Rhyacodri-linae	<i>Rhyacodrilus</i> sp.	R3	SHD spécimens marqués	Données GenBank KF267911
	<i>Rhyacodrilus subterreanus</i>	R4	SHD éthanol	Données GenBank KF267934
Tubificinae	Tubificinae sp. (avec soies capillaires)	T40	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Potamotheix heuscheri</i>	T41	SHD spécimens marqués	Données GenBank KF366637
	<i>Aulodrilus pluriseta</i>	T42	SHD spécimens marqués	Données GenBank HM460268
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	T43	SHD spécimens marqués	Données GenBank KY369595



Famille/sous-famille	Espèce	No lignée	Séquençage d'analyse (type)	Méthode d'identification
	Tubificinae sp. (avec ou sans soies capillaires ?)	T44	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	Tubificinae sp. (avec soies capillaires)	T46	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Limnodrilus</i> sp.	T47	SHD éthanol	Construction d'arbre
	Tubificinae sp. (avec ou sans soies capillaires)	T48	SHD éthanol	Construction d'arbre
	Tubificinae sp. (avec soies capillaires)	T49	SHD éthanol	Construction d'arbre
	Tubificinae sp. (avec soies capillaires)	T50	SHD mélange spécimens	Construction d'arbre
	Tubificinae sp. (sans soies capillaires)	T51	SHD mélange spécimens	Construction d'arbre
Haplotaxidae	<i>Haplotaxis gordioides</i>	H2	Barcoding (Sanger)	Loupe binoculaire/Construction d'arbre
	<i>Haplotaxis gordioides</i>	H3	Barcoding (Sanger)	Loupe binoculaire/Construction d'arbre
	<i>Haplotaxis gordioides</i>	H4	Barcoding (Sanger)	Loupe binoculaire/Construction d'arbre
	<i>Haplotaxis gordioides</i>	H5	Barcoding (Sanger)	Loupe binoculaire/Construction d'arbre
	<i>Haplotaxis gordioides</i>	H6	Barcoding (Sanger)	Loupe binoculaire/Construction d'arbre
Lumbriculidae	Lumbriculidae sp.	LL7	SHD spécimens marqués	Construction d'arbre
	<i>Stylodrilus sanguineus</i>	LL8	SHD spécimens marqués	Données GenBank KR296752
	<i>Guestphalinus</i> sp.	LL9	Barcoding (Sanger)	Microscope/Construction d'arbre
	<i>Lumbriculus variegatus</i>	LL10	SHD éthanol	Données GenBank FJ639300, MT186517, HQ961536
	Lumbriculidae sp.	LL11	SHD éthanol	Construction d'arbre
	Lumbriculidae sp. ?	LL12	SHD éthanol	Construction d'arbre
	Oligochaeta sp. ?	O1	SHD éthanol	Construction d'arbre



Annexe 3

Séquences des fragments de 313 pb et 658 pb (Sanger) du gène cytochrome c oxydase (COI) des nouvelles lignées pour la base de données de référence suisse (SHD=séquençage à haut débit)

Enchytraeidae sp. E18 SHD spécimens marqués

>Oligo226_E18_Spe19z_11_ASV45 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E18;Enchytraei-
dae;sp;E18_Spe19z_11_ASV45
GTTGGCTAGAAATTTAGCACATGCTGGCCCTTCCGTTGATTTAGCTATTTTTCTTTGCA
TTTGGCTGGGGCGTCTTCAATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACGACTGTTATTAATAT
GCGTTGACAGGGTTTACGGTTAGAGCGCATTCCGTTGTTTGTGTGGGCTGTTGTCATTAC
TGTAAGTACTATTACTGTTATCTTTACCTGTTTTAGCAGGGGCTATTACGATGTTGTTGAC
AGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTTTGATCCGGCGGGTGGGGGCGACCCTATTTTATA
TCAACACTTGTTT-

Enchytraeidae sp. E21 SHD spécimens marqués

>Oligo203_E21_BENENTE7_ASV69 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E21;Enchytraei-
dae;sp;E21_BENENTE7_ASV69
ACTAGCAAGAAATATAGCTCATGCGGGACCATCAGTAGATCTAGCTATTTTTGCTTGCCA
TCTTGACAGGTGCGTCATCTATTTTGGGTGCAGTAAATTTTATCTCTACAGTTATTAATAT
GCGTTGACAGGGCCTTCAGTTAGAACGAATTCCATTATTTGTTGAGCTGTTACAATTAC
TGTTGTTCTTTTATTATTATCATTACCTGTACTAGACGGGGCAATTACAATGTTATTAAC
TGATCGTAATCTTAATACGTCATTTTTCGATCCTGCTGGTGGGGTGATCCAATTTTATA
TCAACACTTATTT-

Fridericia dura-ratzeli E22 SHD spécimens marqués

>Oligo192_E22_TIN20_ASV92 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E22;Fridericia;dura_rat-
zeli;E22_TIN20_ASV92
ACTATCTAGAAATATAGCTCATGCTGGACCATCTGTAGATCTAGCAATCTTTTCTTTACA
TTTAGCAGGTGCATCATCAATTCTTGGTGCTGTAAATTTTATCTCTACTGTTATTAATAT
ACGATGACAAGGTCTTCAACTAGAACGCATTCCATTATTTGTCTGAGCAGTTACAATTAC
TGTTGTTCTATTACTACTTTCACTCCCTGTATTAGCTGGTGCTATTACAATACTACTAAC
AGACCGAAATCTAAATACATCATTCTTTGACCCAGCGGGTGGAGGAGATCCTATTTTATA
TCAACATTTATTT-

Enchytraeidae sp. E24 SHD spécimens marqués

>Oligo189_E24_DOU29_ASV182 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E24;Enchytraei-
dae;sp;E24_DOU29_ASV182
ATTGGCATCTAATATTGCTCATTCTGGGCCTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTCTCTTCA
TCTAGCTGGGGCATCTTCTATTTTAGGGGCCATTAATTTTATTACAACAGTTATTAATAT
ACGATGACAGGGGTTACGATTAGAACGTATTCCACTATTTGTATGGGCTGTGACTATTAC
TGTAAGTTTTACTACTTTTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATATTACTTAC
CGATCGTAATTTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATA
TCAACACTTATTT-

Enchytraeidae sp. E25 SHD spécimens marqués

>Oligo225_E25_Spe19z_10_ASV96 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E25;Enchytraei-
dae;sp;E25_Spe19z_10_ASV96
ATTAGCATCAAATATTGCACATGCTGGTCCTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTCTTTACA
TTTAGCTGGGGCTTCTTCTATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACTACTGTTATTAATAT
ACGATCTCACGGAATTCAAATAGAACGAATTCCTCTATTTGTATGAGCTGTTACAATTAC
AGTAGTTTTATTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCTGGAGCTATTACAATATTATTAAC
AGATCGTAATTTAAATACCTCTTTTTTCGATCCTGCTGGAGGAGGTGATCCAATTTTATA
TCAACACTTGTTT-



Enchytraeidae sp. E26 SHD spécimens marqués

>Oligo253_E26_Cugy_12_13_ASV128 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E26;Enchytraei-
dae;sp;E26_Cugy_12_13_ASV128
--TAGCCTCTAATATTGCACATGCCGGACCTTCAGTAGACCTAGCTATTTTTCTCTACA
TTTAGCAGGAGCTTCTTCTATTTAGGGGCCATTAATTTCACTACTGTTGTTAATAT
GCGTTCACATGGTATTCAAATAGAGCGAATCCCATTTTGTATGAGCTGTAACAATCAC
AGTGGTCCTATTACTTCTATCTTTGCCAGTTTTAGCCGGAGCTATTACTATACTATTAAC
AGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCAGGGGGAGGAGATCCTATTCTTTA
TCAACACTTATTT-

Enchytraeidae sp. E27 SHD spécimens marqués

>Oligo146_E27_FLE35_ASV21 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E27;Enchytraei-
dae;sp;E27_FLE35_ASV21
TCTGGCCTCTAATATTGCACATGCTGGGCCCTCAGTGGACTTAGCTATTTTTCTTTACA
TTTAGCGGGAGCTTCTTCTATTCTAGGAGCTATTAATTTTATTACTACTGTTATTAATAT
ACGCTCACATGGTATTCAAATAGAACGAATTCCTTTATTTGTATGAGCTGTAACAATTAC
AGTAGTCTTATTACTTTTATCTTTACCAGTTTTAGCTGGAGCCATTACCATGTTATTAAC
AGACCGAAATTTAAATACTTCTTTCTTTGACCCTGCCGGGGGTGGAGATCCCATTCTCTA
TCAACATTTGTTT-
>Oligo147_E27_FLE38_ASV55 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E27;Enchytraei-
dae;sp;E27_FLE38_ASV55
TCTGGCCTCTAATATTGCACATGCTGGACCCTCAGTGGATTTAGCTATTTTTCTTTACA
CTTAGCAGGAGCTTCTTCCATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACTACTGTCATTAATAT
ACGCTCACATGGTATTCAAATAGAACGAATTCCTTTATTTGTGTGAGCTGTAACAATTAC
AGTAGTCTTATTACTTTTATCTCTACCAGTTTTAGCTGGAGCCATTACCATGTTATTAAC
AGACCGAAATTTAAATACTTCTTTCTTTGACCCTGCCGGGGGTGGAGACCCCATTCTTTA
TCAACACTTGT-
>Oligo254_E27_Cugy_21_ASV185 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E27;Enchytraei-
dae;sp;E27_Cugy_21_ASV185
CTTAGCCTCTAATATTGCACATGCCGGGCCCTCAGTGGATTTAGCTATTTTTCTTTACA
TTTAGCAGGAGCTTCTTCTATTCTAGGAGCCATTAATTTTATTACTACTGTTATTAATAT
ACGTTTCACATGGCATTCAAATAGAACGAATTCATTATTTGTGTGAGCTGTAACAATTAC
AGTAGTCTTATTACTTTTATCTCTACCAGTTTTAGCCGGAGCCATTACCATATTATTAAC
CGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCCGGGGGTGGAGATCCTATTCTCTA
TCAACACTTGT-
>Oligo255_E27_Cugy_27_ASV143 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E27;Enchytraei-
dae;sp;E27_Cugy_27_ASV143
TCTGGCCTCTAATATTGCACATGCTGGACCCTCAGTTGACTTAGCTATTTTTCTTTACA
TTTAGCAGGAGCTTCTTCTATTCTAGGAGCTATTAATTTTATTACTACTGTTATTAACAT
ACGCTCACATGGTATTCAAATAGAACGAATTCCTTTATTTGTATGGGCTGTAACAATTAC
AGTAGTCTTATTACTTCTATCTCTACCAGTTTTAGCTGGAGCCATTACCATGTTATTAAC
AGACCGAAATTTAAATACTTCTTTCTTTGACCCTGCCGGGGGTGGAGACCCCATTCTTTA
TCAACATTTGTTT-

Fridericia striata E30 SHD spécimens marqués

>Oligo201_E30_BENENTE6_ASV53
Enchytraeidae;Enchytraedinae;E30;Fridericia;striata;E30_BENENTE6_ASV53
ACTGGCAAGAAATATTGCCCATGCTGGCCCATCTGTAGACTTAGCAATTTTTCTCTACA
TCTGGCAGGTGCATCCTCAATTCTAGGTGCAGTTAACTTTATTTCCACCGTTATTAATAT
ACGCTGACAAGGTCTTCAACTAGAACGAATCCCCCTTTTTGTTTGAGCAGTGACAATTAC
AGTGGTACTATTACTCCTCTCACTACCTGTTCTAGCAGGTGCAATTACAATATTATTAAC
AGACCGAAACCTTAACACATCGTTCTTTGACCCTGCAGGTGGTGGAGATCCAATCTTATA
TCAACACCTATTC-



Enchytraeidae sp. E31 SHD spécimens marqués

>Oligo197_E31_TIN33_ASV46 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E31;Enchytraei-
dae;sp;E31_TIN33_ASV46
TTTATCAAGAAACATAGCTCATGCTGGCCCATCAGTAGACTTAGCAATCTTCTCTTTCA
CCTAGCCGGGGCTTCTTCCATTCTAGGAGCTGTAAATTTTATTTCAACCGTTATTAATAT
ACGGTGACAAGGAATTCAACTAGAACGAATTCCTCTATTTGTATGAGCCGTAACAATTAC
AGTTGTACTCCTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCCATTACAATACTACTAAC
AGATCGAAATCTCAATACCTCATTCTTCGACCCTGCCGGTGGTGGAGATCCTATCCTATA
CCAACACTTATTT-

Fridericia isseli E32 SHD spécimens marqués

>Oligo260_E32_Cugy_38_ASV38 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E32;Fridericia;is-
seli;E32_Cugy_38_ASV38
TCTAGCAAGAAATATTGCTCATGCTGGCCCATCAGTAGACTTAGCTATTTTCTCTTTCA
TCTAGCCGGTGCCTCTTCAATTCTAGGCGCAGTAAATTTTATCTCTACAGTTATTAATAT
ACGTTGACAAGGTCTTCAATTAGAACGAATTCATTATTTGTATGAGCTGTTACAATTAC
AGTTGTTCTCCTTTTACTATCACTCCCAGTACTCGCAGGTGCAATTACAATATTACTAAC
AGATCGAAATCTAAATACCTCATTCTTCGATCCTGCAGGTGGAGGAGATCCAATCCTCTA
TCAACATCTATTC-

Enchytraeidae sp. E33 SHD spécimens marqués

>Oligo198_E33_TIN37_ASV73 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E33;Enchytraei-
dae;sp;E33_TIN37_ASV73
TCTATCAAGAAACATAGCACACGCTGGACCATCTGTAGACTTAGCAATTTTTTCCCTTCA
CTTAGCAGGAGCGTCATCTATTCTAGGTGCAGTTAACTTCATTTCCACAGTAATCAACAT
ACGATGACAAGGTATCCAGTTAGAACGAATCCCCCTATTTGTTTGAGCTGTAACATTAC
TGTCGTACTTCTACTTCTATCTCTACCAGTTTTAGCAGGAGCCATCACCATATTACTAAC
AGATCGAAACCTTAATACATCATTCTTTGACCCAGCAGGAGGTGGAGACCCTATTCTATA
TCAACACTTATTC-

Enchytraeidae sp. E36 Barcoding (Sanger)

>Oligo172_E36_BD_Glatt11 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E36;Enchy-
traeidae;sp;E36_BD_Glatt11
TCTTGCTAGTAATATAGCCACGCTGGCCCATCAGTAGATCTAGCAATTTTTTCACTTCA
CCTTGCAAGGAGCCTCATCAATTTTAGGAGCAGTAACTTTATTTCAACCGTAATCAATAT
GCGATGACAAGGAATTCAATTAGAACGAATTCATTATTCGTTTGAGCTGTAACAATTAC
AGTAGTTCTACTATTACTATCTCTTCCAGTTCTTGCTGGAGCAATTACTATATTATTAAC
AGATCGAAATTTAAACACATCTTTCTTTGACCCAGCTGGCGGTGGAGACCCTATTTTATA
TCAACATCTATTT-
>Sanger_Glatt11_E36
--AACCTTATATTTTATCTTAGGAGTATGAGCAGGCATAATAGGTGCCGCAATAAGTTTA
ATTATCCGTACAGAACTTAGACAGCCTGGATCATTTCTAGGCAGAGACCAACTATATAAT
ACAGTAGTAACAGCTCATGCATTTCTAATAATCTTTTTTTTAGTAATGCCTGTATTCATC
GGAGGGTTTGGAAGTACTTCTACCACTAATATTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCCA
CGTCTAAATAATATAAGATTTTGACTTCTACCACCCTCATTAATTCTCCTTCTATCTTCA
GCAGCAGTAGAAAAAGGAGCAGGTACAGGATGAACAGTGTACCCACCTCTTGCTAGTAAT
ATAGCCACGCTGGCCCATCAGTAGATCTAGCAATTTTTTCACTTCACCTTGCAAGGAGCC
TCATCAATTTTAGGAGCAGTAACTTTATTTCAACCGTAATCAATATGCGATGACAAGGA
ATTCAATTAGAACGAATTCATTATTCGTTTGAGCTGTAACAATTACAGTAGTTCTACTA
TACTATCTCTTCCAGTTCTTGCTGGAGCAATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTA
AACACATCTTTCTTTGACCCAGCTGGCGGTGGAGACCCTAT-TTTATATCAACATCTATT
T-



Enchytraeidae sp. E38 SHD spécimens marqués

>Oligo209_E38_BENENTE15_ASV39 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E38;Enchytraeidae;sp;E38_BENENTE15_ASV39

ACTAGCAAGGAATATCGCCACGCTGGACCCTCAGTAGACCTTGCTATTTTTCTTTACA
CCTTGCAAGGTGCCTCATCTATTCTAGGCGCAGTAAATTTTATCTCTACTGTAATCAACAT
ACGATGACAAGGCCTACAACCTAGAGCGAATCCCTCTATTCGTTTGAGCTGTTACAATTAC
TGAGTTCTTTTATTACTATCCCTCCCAGTTCTAGCTGGAGCAATTACTATACTATTAAC
CGACCGAAACCTCAACACATCATTTTTTGACCCGGCTGGTGGTGGAGATCCTATCCTTTA
CCAACACTTATTT-

Henlea montana E39 SHD spécimens marqués

>Oligo145_E39_Grab38_ASV70 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E39;Henlea;montana;E39_Grab38_ASV70

--TATCTAGTAATATTGCTCATGCTGGACCCTCAGTAGATTTAGCCATCTTCTCACTACA
TCTAGCAGGTGCTTCCTCCATCCTAGGAGCAGTAACTTTTACTACTGTCATTAACAT
ACGATGACAAGGACTTCACCTAGAACGAATCCCTTTTTGTATGAGCAGTAACAATCAC
AGTTGTTCTTCTTCTACTATCCCTTCCAGTATTAGCAGGAGCTATCACCATATTACTAAC
AGACCGTAACTTAAATACATCTTTCTTTGACCCAGCTGGCGGAGGTGATCCAATTCTATA
TCAACATCTATTT-

Enchytraeidae sp. E41 SHD spécimens marqués

>Oligo188_E41_DOUE25_ASV231 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E41;Enchytraeidae;sp;E41_DOUE25_ASV231

CCTAGCATCTAATATTGCCATTCTGGGCCATCAGTAGACTTAGCTATTTTTCTCTCTTCA
CCTAGCAGGTGCTTCCTCTATTCTAGGTGCCATCAACTTTATCACAACCTGTAATTAACAT
ACGCTGACAAGGATTGCAGTTAGAACGCATCCCCCTATTTGTCTGAGCTGTGACAATTAC
TGAGTTCTTCTCCTTCTTTCTCTTCCAGTTTTAGCTGGGGCTATCACCATGCTACTCAC
TGATCGAAATCTTAATACATCATTTTTTGATCCAGCAGGAGGTGGAGACCCCATTTCTTA
TCAACATCTCTTC-

Enchytraeidae sp. E42 SHD spécimens marqués

>Oligo187_E42_DOUE14_ASV212 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E42;Enchytraeidae;sp;E42_DOUE14_ASV212

CTTATCAAGAAATATTGCTCACGCAGGACCATCCGTAGATCTGGCTATTTTTCTCCCTTCA
CTTAGCAGGTGCATCTTCCATTTTAGGCGCAGTTAACTTTATCACTACAGTAATCAATAT
ACGTTGACAAGGACTTCAATTAGAACGTATTCCTTTATTTGTATGAGCTGTAACAATTAC
AGTTGTTCTTCTCCTTCTGTCTCTTCTGTACTTGCAGGAGCAATTACAATACTTTTAAC
AGATCGTAACCTCAATACTTCATTCTTCGACCCAGCTGGAGGAGGAGATCCAATTCTATA
TCAACACTTATTC-

Henlea perpusilla E43 SHD spécimens marqués

>Oligo184_E43_DOUE10_ASV142 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E43;Henlea;perpusilla;E43_DOUE10_ASV142

TCTATCAAGAAACATTGCTCATGCCGGACCATCGGTAGACTTAGCTATTTTTTCCCTTCA
TTTAGCAGGGGCATCATCTATTCTTGGAGCAGTAACTTTATCACTACTGTAATTAACAT
ACGATGACAAGGTTTACAATTAGAACGAATTCCTTTATTCGTTTGAGCAGTAACAATTAC
AGTTGTCCTACTTCTTCTATCACTTCCAGTATTAGCAGGAGCAATCACTATACTTCTTAC
CGACCGTAACTTAAATACATCATTTTACCCGGCGGGAGGAGGAGATCCTATCCTTTA
TCAACATTTATTC-

>Oligo194_E43_TIN28_ASV114 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E43;Henlea;perpusilla;E43_TIN28_ASV114

TCTATCAAGAAACATTGCTCATGCCGGACCATCGGTAGACTTAGCTATTTTTTCCCTTCA
TTTAGCAGGGGCATCATCTATTCTTGGAGCAGTAACTTTATCACTACTGTAATTAACAT



ACGATGACAAGGTTTACAATTAGAACGAATTCCTTTATTCGTTTGAGCAGTAACAATTAC
AGTTGTCCTACTTCTTCTATCACTTCCAGTATTAGCAGGAGCAATTACTATACTTCTTAC
CGACCGTAACTTAAATACATCATTCTTTGACCCAGCGGGAGGAGGAGATCCTATCCTTTA
TCAACATTTATTC-

Enchytraeidae sp. E46 SHD spécimens marqués

>Oligo251_E46_Taul_19_ASV251 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E46;Enchytraei-
dae;sp;E46_Taul_19_ASV251

ACTTGCAAGAAACATAGCTCATGCCGGACCATCTGTAGATCTGGCAATCTTCTCTCTTCA
TCTAGCCGGAGCCTCATCAATCCTAGGGGCAGTAACTTCATTTCCACAGTAATTAATAT
ACGATGACAAGGTTTACAACCTAGAACGTATTCCACTATTTGTCTGAGCTGTCACTATTAC
AGTAGTACTTCTCTTCTATCATTACCAGTACTTGCCGGAGCTATTACCATGTCTACTAAC
AGACCGAAACCTAAATACATCCTTCTTTGATCCAGCTGGAGGCGGAGACCCGATTCTATA
CCAACACTTATTT-

Enchytraeus buchholzi E50 Barcoding (Sanger)

>Oligo167_E50_BD_Taul2 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E50;Enchytraeus;buch-
holzi;E50_BD_Taul2

ACTAGCCAGAAATATTGCTCATGCTGGGCCGTCAGTAGATTTAGCTATCTTCTCACTACA
CTTAGCCGGTGCCTCATCAATTCTAGGAGCCGTAAATTTTCACTACTACAGTTATTAATAT
ACGCTGACAGGGCTTAACCCCTTGAAACGAATTCCATTATTTGTATGAGCAGTTACTATTAC
AGTAGTTCTTCTTCTCCTATCTCTACCAGTATTAGCTGGAGCAATCACAATACTATTAAC
AGACCGTAATCTAAACACCTCATTCTTTGACCCAGCCGGAGGAGGGGACCCAATTTTATA
CCAACACTTATTC-

>Sanger_E_buchholzi_Taul2_E50

--AACACTATATTTTATTCTAGGAGTCTGAGCCGGAATAATAGGAGCAGCTATAAGCCTA
TTAATTGCAATTGAGTTAAGACAACCAGGGTCTTTCTAGGAAGAGATCAATTGTATAAT
ACAATCGTAACTGCACATGCATTTTAAATGATTTTTTTTCTAGTAATACCAGTTTTTATT
GGGGGGTTTGAAACTGACTTTTACCACTAATACTTGGTGCTCCAGACATAGCTTTCCCT
CGACTAAACAACATAAGATTTTGACTACTGCCTCCGGCACTAATATTATTATTATCATCT
GCAGCAGTTGAAAAAGGTGCCGGAACAGGATGAACTGTGTATCCACCACTAGCCAGAAAT
ATTGCTCATGCTGGGCCGTCAGTAGATTTAGCTATCTTCTCACTACACTTAGCCGGTGCC
TCATCAATTCTAGGAGCCGTAAATTTTCACTACTACAGTTATTAATATACGCTGACAGGGC
TTAACCCCTTGAAACGAATTCCATTATTTGTATGAGCAGTTACTATTACAGTAGTTCTTCTT
CTCCTATCTCTACCAGTATTAGCTGGAGCAATCACAATACTATTAACAGACCGTAATCTA
AACACCTCATTCTTTGACCCAGCCGGAGGAGGGGACCCAAT-TTTATACCAACACTTATT
C-

Achaeta unibulba E51 SHD spécimens marqués

>Oligo212_E51_BENENTE34_ASV31 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E51;Achaeta;uni-
bulba;E51_BENENTE34_ASV31

ACTAGCTAGAAATATTGCTCATGCTGGACCATCAGTAGATTTAGCAATTTTCTCACTACA
TTTAGCTGGGGCCTCATCAATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATCACCACAGTAATTAATAT
ACGATGACAAGGAATACGTCTTGAAACGAATTCCTTTATTTGTATGAGCCGTAGTAATCAC
TGTTGTTCTTCTCCTTCTATCACTTCCAGTCTAGCAGGAGCAATTACAATACTTCTAAC
CGACCGTAATTTAAACACTTCATTTTTTGGACCCAGCTGGTGGTGGAGATCCTATTCTCTA
CCAACACTTATTT-

Enchytraeidae sp. E53 SHD spécimens marqués

>Oligo211_E53_BENENTE26_ASV41 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E53;Enchytraei-
dae;sp;E53_BENENTE26_ASV41

CCTAGCAAGAAATATTGCCCATGCTGGACCTTCTGTAGATTTAGCAATTTTCTCATTACA
TTTAGCTGGAGCTTCTCCATTTTGGGAGCAGTTAACTTTATTACAACTGTTATCAACAT
GCGTTGACAAGGATTAACCCCTTGAAACGAATTCCATTATTCGTATGAGCAGTAACAATTAC



TGTTGTTTTACTACTTTTATCACTTCCAGTTCTAGCAGGGGCTATTACCATGCTATTAAC
AGACCGAAACCTAAATACATCATTCTTTGATCCAGCTGGGGGAGGGGATCCAATTCTATA
TCAACACTTATTT-

Enchytraeidae sp. E54 SHD spécimens marqués

>Oligo154_E54_ECH25_ASV71 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E54;Enchytraei-

dae;sp;E54_ECH25_ASV71

TCTAGCAAGTAATATTGCACACGCAGGTCCATCTGTAGACTTAGCCATTTTTCTCTACA
TCTAGCAGGAGCCTCCTCAATCCTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACCTGTAATTAACAT
ACGTTGACAAGGATTAACCTCTTGAACGCATTCCACTATTTGTTTGAGCTGTTACAATTAC
AGTTGTATTACTTCTATTATCCCTTCCAGTTCTAGCTGGAGCCATTACTATGCTCTTAAC
GGATCGAAATCTAAATACATCATTCTTTGATCCTGCGGGAGGTGGAGATCCAATTTTATA
TCAACACTTATTC-

Enchytraeidae sp. E55 SHD spécimens marqués

>Oligo195_E55_TIN30_ASV93 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E55;Enchytraei-

dae;sp;E55_TIN30_ASV93

CCTAGCAAGTAACATTGCCCCAGCCGGCCCATCAGTAGATTTAGCTATTTTTCTACTTCA
TTTAGCAGGAGCATCCTCCATTCTAGGAGCAGTAACTTTATTACCACTGTAATCAACAT
ACGATGACAAGGACTAACTCTTGAACGCATTCCACTATTTGTGTGAGCAGTAACAATCAC
AGTTGTACTACTTCTACTATCCCTTCCAGTATTAGCTGGGGCAATTACCATATTACTAAC
AGATCGAAATCTTAATACATCGTTCTTCCAGCCTGCAGGTGGAGGGGACCCAATTCTATA
CCAACATTTATTT-

>Oligo196_E55_TIN31_ASV99 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E55;Enchytraei-

dae;sp;E55_TIN31_ASV99

ACTAGCAAGTAACATTGCCCCAGCCGGCCCATCAGTAGATTTAGCTATTTTTCTACTTCA
TCTAGCAGGAGCATCCTCCATTCTAGGAGCAGTAACTTTATTACCACTGTAATCAACAT
ACGATGACAAGGACTAACTCTTGAACGCATTCCACTATTTGTATGAGCAGTAACAATCAC
AGTTGTACTACTTCTACTATCCCTTCCAGTATTAGCTGGAGCAATTACCATATTACTAAC
AGATCGAAATCTTAATACATCGTTCTTCCAGCCTGCAGGTGGAGGTGACCCAATTCTATA
CCAACATTTATTT-

>Oligo216_E55_BENENTE44_ASV33 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E55;Enchytraei-

dae;sp;E55_BENENTE44_ASV33

ATTAGCAAGAAACATTGCCCCAGCCGGTCCATCAGTAGACCTAGCTATTTTTCTACTACA
CCTAGCAGGTGCATCCTCCATTCTAGGAGCAGTAACTTTATCACTACTGTAATCAACAT
GCGCTGACAAGGACTAACTCTTGAACGAATTCCATTATTTGTGTGAGCAGTAACAATCAC
AGTTGTACTACTCCTATTATCCCTTCCAGTATTAGCCGGAGCAATTACCATACTACTAAC
AGATCGAAATCTTAATACATCATTCTTCCAGCCTGCGGGAGGAGGAGACCCTATTCTATA
TCAACACTTATTT-

Achaeta sp. E56 SHD spécimens marqués

>Oligo233_E56_Spe027z_25_26_ASV195 Enchytraeidae;Enchytraedi-

nae;E56;Achaeta;sp;E56_Spe027z_25_26_ASV195

ACTAGCAAGAAACATTGCTCATGCTGGCCAGCTGTAGATATAACCATTTCTCATTACA
CTTAGCCGGAGCATCTTCAATTCTTAGTGCAATAAATTTTATTACTACTACAATTAATAT
ACGATGAAAAGGAATAACTATAAATCGAATTCCACTATTCGCATGAGCAATAACTATTAC
AGCAATACTTCTACTTTTAGCTCTTCTGTCTAGCTGGTGCAATTACTATATTACTAAC
AGATCGAAACCTCAATACCTCATTTTTTGACCCAGCAGGAGGGGAGACCCTATTTTATA
CCAACACCTATTC-

Enchytraeidae sp. E58 SHD spécimens marqués

>Oligo199_E58_BENENTE3_16_18_19_25_28_ASV5 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E58;En-

chytraeidae;sp;E58_BENENTE3_16_18_19_25_28_ASV5

TCTCTCCAGAACTTGGCCCATGCTGGCCCTTCAGTTGACTTAGCAATTTTTCTCTTCA



TTTAGCAGGGGCCTCTTCAATTCTTGGAGCCGTAACTTTATTACTACAGTAATTAACAT
ACGATGACAAGGACTAAGTTTAGAGCGAATTCCATTATTCGTATGAGCAGTATTAATTAC
AGTAGTTTTACTACTACTATCTCTACCAGTTCTTGCTGGGGCAATCACTATACTTCTTAC
TGATCGAAACCTAAACACATCATTCTTTGACCCAGCAGGAGGAGATCCAGTTCTATA
CCAACACTTATTT-

Enchytronia christenseni E60 SHD spécimens marqués

>Oligo239_E60_Spe027z_30_ASV125 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E60;Enchytronia;christenseni;E60_Spe027z_30_ASV125

CCTATCATCAAACATCGCACACGCTGGCCCATCCGTAGATTTAGCTATTTTCTCACTACA
TCTTGCTGGTGCATCTTCAATTCTAGGAGCCATTAACTTTATTACTACTGTAATTAATAT
ACGATGACAAGGAATACAACCTAGAACGAATTCCACTCTTTGTATGAGCAGTAATTAATTAC
AGTTGTATTACTACTACTATCACTACCTGTTCTAGCAGGTGCAATCACCATACTTCTAAC
AGACCGCAACTTAAATACTTCATTCTTCGACCCAGCAGGAGGAGGTGATCCAATTCTCTA
CCAACATCTATTC-

Cognettia chlorophila E62 SHD spécimens marqués

>Oligo205_E62_BENENTE11_13_ASV19 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E62;Cognettia;chlorophila;E62_BENENTE11_13_ASV19

TCTTTCATCAAACATAGCACATGCCGGCCCATCAGTCGATTTAGCCATTTTCTCCCTTCA
CTTAGCAGGTGCTTCATCTATTCTAGGAGCCGTTAATTTTATTACTACAGTAATCAATAT
ACGAATAAAAGGAATACAATTAGAACGAATCCCCCTATTCTGATGAGCAGTTGTTATTAC
AGTCGTCCTTCTTCTTATCCCTTCCCCTTCTAGCAGGAGCTATTACTATACTTCTAAC
AGACCGAAATCTTAACACATCTTTCTTTGATCCAGCTGGCGGAGGAGACCCTATTCTTTA
TCAACACTTATTC-

Cognettia varisetosa E63 SHD spécimens marqués

>Oligo214_E63_BENENTE43_ASV34 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E63;Cognettia;varisetosa;E63_BENENTE43_ASV34

GTTATCTTCTAACATAGCTCACGCTGGCCCATCAGTTGATTTAGCAATTTTTCTCTTCA
TCTAGCAGGTGCCTCATCAATTCTAGGAGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATTAATAT
ACGTATAAAAGGAATACAATTAGAACGAATTCCTTTTTGTATGAGCTGTAGTAATTAC
AGTTGTCCTTCTCTACTATCACTTCCAGTTCTAGCAGGGGCAATTACCATACTTCTTAC
AGACCGAAACCTAAATACTTCATTTTTTGACCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTATA
TCAACATCTCTTC-

Stercutus niveus E65 SHD spécimens marqués

>Oligo207_E65_BENENTE14_30_ASV17 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E65;Stercutus;niveus;E65_BENENTE14_30_ASV17

--TATCCAGAAACCTAGCACATGCAGGCCCATCTGTGACCTAGCAATTTTTTCCCTTCA
TCTAGCAGGAGCATCATCAATTCTAGGAGCAGTAACTTCATTACAACAGTAATCAATAT
ACGGCTCAAAGGTATACAATTAGAACGAATTCCTGTTTCGTATGAGCTGTAGTTATTAC
TGAGTTCTCCTTCTTCTATCCCTTCCAGTTCTTGCCGGAGCGATCACTATACTTCTAAC
AGATCGAAATCTCAACACATCGTTCTTTGACCCTGCTGGTGGAGGTGACCCAATCCTATA
CCAACATCTATTC-

Enchytraeidae sp. E67 SHD spécimens marqués

>Oligo200_E67_BENENTE5_ASV42 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E67;Enchytraeidae;sp;E67_BENENTE5_ASV42

TCTTTCTAGAAATTTAGCTCATGCAGGTCCATCTGTAGATCTAGCTATTTTCTCGCTACA
TTTAGCTGGAGCTTCATCTATTTTAGGGGCCGTTAACTTTATTACAACAGTAATTAATAT
ACGCTGACAAGGATTACGACTAGAACGAATTCCTTTATTGTATGAGCTGTTGTAATTAC
AGTAGTTTTATTACTACTATCTCTACCAGTATTAGCTGGAGCAATTACAATACTTTTAAC



TGACCGAACTTAAACACATCATTTTTTGACCCTGCAGGTGGAGGTGACCCTATTTTATA
TCAACATTTATTT-

Mesenchytraeus armatus E68 SHD spécimens marqués

>Oligo190_E68_TIN13_14_16_19_22_23_24_25_26_29_ASV11 Enchytraeidae;Enchytraedi-
nae;E68;Mesenchytraeus;armatus;E68_TIN13_14_16_19_22_23_24_25_26_29_ASV11
ACTATCTAGAAACCTGGCTCATGCCGGACCATCTGTAGACCTAGCAATTTTCTCATTACA
CTTAGCCGGTGCCTCATCAATTTTAGGAGCCGTAACTTCATTACAACAGTAGTAAACAT
ACGATGACAAGGACTTCGACTAGAACGAATTCCTTTATTTGTATGAGCAGTTGTAATTAC
AGTAGTCTTATTACTTCTATCTCTACCAGTGCTAGCAGGAGCAATTACTATACTTCTTAC
AGATCGAAATCTAAACACCTCATTCTTCGACCCAGCTGGAGGGGGAGACCCAATCCTATA
CCAACATTTATTT-

Achaeta danica E69 SHD spécimens marqués

>Oligo237_E69_Spe027z_28_29_ASV124 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E69;Achaeta;da-
nica;E69_Spe027z_28_29_ASV124
ATTAGCAAGTAATATTGCCACGCCGGACCATCAGTAGACCTAGCCATTTTCTCCCTCCA
TCTAGCAGGAGCTTCATCAATTTTAGGAGCTGTAACTTTATTACCACAGTGATTAACAT
ACGATGACAAGGAATACGACTAGAACGAATCCCACTATTTCGTATGAGCCGTAGTTATCAC
CGTAGTTCTTCTACTACTTGCTCTACCAGTACTAGCAGGGGCAATTACTATACTATTAAC
AGACCGAACTTAAATACGTCCTTCTTCGACCCAGCCGGGGGAGGTGACCCAATTCTATA
CCAACACTTATTC-

Achaeta iberica E70 SHD spécimens marqués

>Oligo235_E70_Spe027z_27_ASV141 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E70;Achaeta;ibe-
rica;E70_Spe027z_27_ASV141
CTTAGCAAGTAATATTGCTCACTCTGGCCCATCAGTAGATCTAGCAATTTTCTCTCTTCA
TTTAGCCGGAGCATCATCAATCTTAGGAGCCGTAACTTTATCACCAGTGTTATTAATAT
ACGATGACAAGGAATACGCCTCGAACGAATCCCACTATTTGTATGAGCAGTTGTAATCAC
CGTAGTCCTTCTATTACTATCCCTTCCAGTTCTAGCAGGAGCTATCACAATACTCCTAAC
AGATCGAAATCTCAATACATCATTTTTTGACCCTGCTGGAGGTGGAGACCCTATTCTATA
CCAACACTTATTC-

Enchytraeidae sp. E71 SHD éthanol

>Oligo309_E71_TIN_eth_ASV2671 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E71;Enchytraei-
dae;sp;E71_TIN_eth_ASV2671
TCTAGCTAGAAATATAGCTCACGCTGGTCCCTCTGTAGATCTTGCTATTTTCTCGTTACA
TTTAGCAGGTGCATCCTCAATTCTAGGTGCCGTAAATTTTATCTCTACAGTTATTAATAT
ACGGTGACAAGGTCTACAACCTAGAACGCATTCCTCTATTTCGTATGAGCTGTTACTATTAC
CGTTGTTCTATTACTTCTATCTCTACCTGTACTAGCAGGTGCTATTACTATACTTCTAAC
TGATCGAAACCTAAACACATCATTTTTTCGATCCTGCTGGTGGTGGAGATCCAATTTTATA
CCAACATCTATTT-

Enchytraeidae sp. E72 SHD éthanol

>Oligo300_E72_TIN_eth_ASV1443 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E72;Enchytraei-
dae;sp;E72_TIN_eth_ASV1443
TTTAGCCAGAAACATAGCACATGCAGGACCCTCAGTTGATCTAGCAATTTTCTCTCTCCA
TCTAGCAGGAGCATCTTCCATCCTTGGTGAGTAAATTTTCAATTTCAACCGTAATTAATAT
ACGATGACAAGGTCTTCAATTAGAACGAATCCCTTTATTTGTATGAGCAGTTACAATTAC
CGTAGTTCTTCTATTACTATCTCTACCAGTTTTAGCTGGTGCAATTACCATACTACTAAC
TGACCGAAATCTTAATACTTCAATTCTTCGACCCCGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTATA
TCAACATTTATTT-



Enchytraeidae sp. E73 SHD éthanol

>Oligo303_E73_TIN_eth_ASV905 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E73;Enchytraei-
dae;sp;E73_TIN_eth_ASV905

ACTTGCTAGAAATATGGCTCATGCTGGACCATCAGTTGATCTAGCAATCTTCTCCCTTCA
CTTAGCAGGAGCTTCATCAATCCTTGGTGCTGTAACTTTATCTCTACAGTAATCAATAT
GCGTTGACAAGGTATACAACCTCGAACGAATTCCACTCTTTGTGTGAGCGGTAACCATTAC
AGTAGTTCTACTACTCCTATCTTTACCAGTGTTAGCTGGCGCAATTACTATACTCCTAAC
AGATCGAAATTTAAATACCTCATTCTTTGACCCAGCTGGTGGTGGCGATCCAATTCTATA
TCAACACTTATTC-

Enchytraeidae sp. E74 SHD éthanol

>Oligo302_E74_LAND_eth_ASV1460 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E74;Enchytraei-
dae;sp;E74_LAND_eth_ASV1460

CCTAGCTAGAAATATTGCTCATGCTAGGGGCCCTCAGTAGATCTAGCAATCTTCTCCCTACA
CCTAGCAGGTGCTTCATCAATTTTAGGCGCCGTAAATTTTATTACTACTGTAATTAACAT
ACGGTGACAAGGACTAACCCTAGAACGAATTCCATTATTTGTATGGGCGGTAACAATTAC
TGTAGTACTTCTCCTACTATCATTACCAGTATTAGCTGGAGCAATTACCATATTATTAAC
AGATCGAACTTAAACACTTCATTTTTCGACCCTGCCGGAGGGGGGGATCCAATTCTGTA
TCAACACCTATTC-

Enchytraeidae sp. E75 SHD éthanol

>Oligo307_E75_TIN_eth_ASV3565 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E75;Enchytraei-
dae;sp;E75_TIN_eth_ASV3565

TTTAGCAAGAAATATTGCTCATGCTGGACCTTCTGTAGATTTAGCAATTTTTTCATTACA
TTTAGCAGGAGCTTCATCAATTTTAGGAGCAGTAACTTCATTACCACAGTTATTAATAT
ACGATGACAAGGATTAACCTCTAGAACGAATCCCATTGTTTGTGTGAGCAGTAACAATTAC
TGAGTATTACTTCTTCTATCTCTACCAGTACTAGCAGGTGCAATTACCATACTATTAAC
TGATCGAAACCTAAATACATCATTCTTCGACCCGTCTGGAGGAGGAGATCCAATCCTTTA
TCAACACTTATTC-

Globulidrilus riparius E76 SHD mélange spécimens

>Oligo316_E76_Spe17z2_Bulk_ASV250 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E76;Globulidrilus;ripa-
rius;E76_Spe17z2_Bulk_ASV250

ACTATCAAGAAACATAGCACATGCAGGCCCATCTGTAGATCTAGCAATTTTTCTCTACA
TTTAGCTGGTGCATCATCAATTCTTGGAGCAGTAAATTTTATTACTACTGTAATCAACAT
ACGATGACAAGGATTAAGACTTGAACGAATCCCTCTATTTGTATGAGCCGTAACAATTAC
TGAGTTCTACTACTTCTATCACTACCTGTATTAGCTGGTGCAATTACTATACTATTAAC
TGATCGAAATCTAAATACTTCATTCTTTGACCCAGCTGGAGGCGGAGACCCTGTATTATA
TCAACACCTATTC-

Enchytraeidae sp. E77 SHD mélange spécimens

>Oligo318_E77_TIN1_Bulk_ASV330 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E77;Enchytraei-
dae;sp;E77_TIN1_Bulk_ASV330

CCTATCAAGAAATATTGCCCATGCCGGCCCATCAGTAGACATC---CATTTTTCTCTACA
TTTAGCAGGTACATCATCTATTCTTGGTGAGTAACTTCATTACTATG--AATCAACAT
ACGTTGACAAGGGCTTCATCTTGAACGAATCCTTCTATTTGTGTGAGTCGTAACCATTAC
AGTAGTCCTTCTTCTATCCCTACCAGTCTTAGCTGGAACAATTGCTATACTTT-AAC
AGATCGTAATTTAAACATTTAATTTTTTGGTCCCGTGGGAGAAGGTGACCCAATTCTCTA
TCGACACCTTCTT-

Enchytraeidae sp. E78 SHD mélange spécimens

>Oligo312_E78_Graben1_Bulk_ASV78 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E78;Enchytraei-
dae;sp;E78_Graben1_Bulk_ASV78



TTTAGCAAGAAATATCGCACATGCAGGACCATCAGTTGACTTAGCAATTTTCTCATTACA
TTTAGCGGGGGCATCATCTATTTTAGGGGCTGTAACTTTATTACTACAGTAATTAATAT
ACGATGACAGGGATTAACCTCTGAACGAATTCCACTATTTGTTTGAGCAGTCACAATTAC
TGAGTTTTATTACTCCTATCTCTACCCGTATTAGCAGGTGCTATTACAATACTACTTAC
TGACCGAAATCTAAATACCTCATTTTTTTGACCCTGCTGGAGGAGGTGACCCAATTTTATA
TCAACATTTATTC-

Enchytraeidae sp. E79 SHD mélange spécimens

>Oligo315_E79_LAND2_Bulk_ASV220 Enchytraeidae;Enchytraedinae;E79;Enchytraei-
dae;sp;E79_LAND2_Bulk_ASV220

ATTAGCAAGAAATATTGCACATGCAGGCCCATCAGTTGACTTAGCAATTTTCTCATTACA
TTTAGCGGGGGCATCATCTATTTTAGGGGCGTAACTTCACTACTACAGTAATTAATAT
ACGATGACAAGGATTAACCTCTGAACGTATTCCATTATTTGTTTGAGCAGTTACAATCAC
TGAGTACTACTACTCTTATCTTTACCAGTATTGGCCGGTGCTATTACCATACTACTTAC
TGATCGAAATTTAAATACCTCATTTTTTTGACCAGCAGGTGGGGGAGATCCAATTTTATA
TCAACACTTATTT-

Aporrectodea rosea LC5 SHD spécimens marqués

>Oligo186_LC5_DOUI3_ASV144 Lumbricidae;Lumbricinae;LC5;Aporrectodea;ro-
sea;LC5_DOUI3_ASV144

TCTATCAAGAAATCTGGCCCATGCTGGACCCTCTGTTGACCTAGCCATTTTCTCACTACA
CTTGGCAGGAGCATCCTCAATTCTCGGAGCCATTAACCTTTATTACAACAGTTATTAATAT
ACGATGAAGAGGTTTACGACTAGAGCGAATCCCGCTATTTGTCTGAGCCGTAGTTATTAC
AGTAGTGTTACTTCTTCTATCCCTACCAGTGCTAGCCGGAGCTATTACTATACTCCTAAC
AGACCGAAATCTAAATACATCCTTCTTTGACCCTGCAGGGGGGGGAGATCCCATTTCTATA
TCAACACTTATTC-

Aporrectodea icterica LC6 SHD spécimens marqués

>Oligo231_LC6_Spe027z_14_ASV1091 Lumbricidae;Lumbricinae;LC6;Aporrectodea;icte-
rica;LC6_Spe027z_14_ASV1091

TCTAGCAAGAAATTTGGCCACGCAGGGCCCTCCGTAGACCTCGCTATTTTCTCTCTCCA
CTTAGCAGGTGCTTCATCAATTCTTGGGGCAATTAACCTTTATTACAACAGTCATCAATAT
ACGCTGAAGAGGCTTACGTCTTGAACGAATTCCACTATTTCGTATGAGCCGTAGTAATTAC
AGTAGTTCTACTCTTACTGTCTCTTCCAGTATTGGCAGGAGCTATTACCATACTTCTAAC
AGACCGTAATCTCAACACCTCATTCTTTGATCCGGCGGGAGGGGGAGACCCTATCTTATA
TCAACATTTATTC-

Nais barbata N17 SHD spécimens marqués

>Oligo150_N17_LAND19_ASV24 Naididae;Naidinae;N17;Nais;barbata;N17_LAND19_ASV24
CCTATCAAGAAATCTAGCTCATGCTGGACCATCTGTAGATATGGCTATTTTTTCACTCCA
TTTAGCGGGTGCCTCTTCTATTTTAGGGGCAGTAACTTTATTACTACAGTAATAAATAT
ACGTTGAAATGGAATACGATTAGAGCGACTTCCATTATTTGTATGAGCGGTATTTCTTAC
AGTAATCCTTCTACTACTATCTCTACCAGTTCTTGCAGGAGCAATTACTATATTACTAAC
AGATCGAAATCTTAATACATCATTTTTTTGATCCTGCTGGGGGTGGAGATCCTATTCTTTA
TCAACATTTATTT-

>Sanger_N_barbata_NBA1_N17

--TACACTATATCTAATTTTAGGAGTATGAGCAGGAATAGTAGGAAGTGAACAAGATTA
CTAATTCGTATTGAACTCTCACAACCAGGATCATTTCTTGGGAAGAGATCAATTATATAAT
ACTCTTGTAACAGCACATGCATTCTTAATAATTTTCTTTTGTAGTAATACCTGTATTTATT
GGGGGATTGCGAACTGACTTCTCCCATTAATATTAGGTGCTGCCGATATAGCATTCCCA
CGACTAAATAACCTTAGATTTTGATTACTTCCACCATCATTAATTTTATTAATCTCTTCT
GCAGCTGTAGAAAAAGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTATACCCGCCCTATCAAGAAAT
CTAGCTCATGCTGGACCATCTGTAGATATGGCTATTTTTTCACTCCATTTAGCGGGTGCC
TCTTCTATTTTAGGGGCAGTAACTTTATTACTACAGTAATAAATATACGTTGAAATGGA



ATACGATTAGAGCGACTTCCATTATTTGTATGAGCGGTATTTCTTACAGTAATCCTTCTA
CTACTATCTCTACCAGTTCTTGCTGAGGAGCAATTACTATATTACTAACAGATCGAAATCTT
AATACATCATTTTTTGTATCCTGCTGGGGGTGGAGATCCTAT-TCTTTATCAACATTTATT
T-

Chaetogaster diaphanus N18 Barcoding (Sanger)

>Oligo170_N18_BD_CDP2 Naididae;Naidinae;N18;Chaetogaster;diaphanus;N18_BD_CDP2
TCTATCAAGGAATCTTGCTCATGCTGGACCTTCAGTTGATATAGCAATTTTTCTCTACA
CTTAGCAGGGGCTTCATCTATTCTAGGAGCAGTTAATTTTATTACTACAACAATTAACAT
GCGATGAAATGGAATACGAATAGAACGTCTACCATTATTTGTATGAGCAGTACTATTAAC
AGTTATTCTTCTATTACTATCATTACCAGTTCTTGCTGGAGCTATTACTATACTATTAAC
AGATCGAAACCTAAACACCTCTTTCTTTGACCCGGCTGGTGGTGGAGACCCTATTTTATA
CCAACATTTATTC-

>Sanger_C_diaphanus_CDP2_N18

--CACTCTATATTTAATTTTAGGAGTATGAGCAGGAATAATTGGTACAGGAAGTAGAATA
CTAATTGGAATTGAACATCTCAACCTGGTTCATTCTTAGGAAGAGATCAACTATATAAC
ACTCTAGTTACCGCACATGCATTTCTAATAATTTCTTTTAGTAATACCTGTATTTATT
GGAGGATTTGGAAATTGACTTCTTCCACTAATATTAGGAGCACCAGATATAGCTTTCCCA
CGTTTAAACAATTTAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCACTAATTTTATTAATTTTCATCT
GCCGCTGTAGAAAAAGGTGCAGGTACAGGATGAACTGTTTACCCTCCTCTATCAAGGAAT
CTTGCTCATGCTGGACCTTCAGTTGATATAGCAATTTTTCTCTACACTTAGCAGGGGCT
TCATCTATTCTAGGAGCAGTTAATTTTATTACTACAACAATTAACATGCGATGAAATGGA
ATACGAATAGAACGTCTACCATTATTTGTATGAGCAGTACTATTAACAGTTATTCTTCTA
TTACTATCATTACCAGTTCTTGCTGGAGCTATTACTATACTATTAACAGATCGAAACCTA
AACACCTCTTTCTTTGACCCGGCTGGTGGTGGAGACCCTAT-TTTATACCAACATTTATT
C-

Chaetogaster diastrophus N19 Barcoding (Sanger)

>Oligo174_N19_BD_CDS1 Naididae;Naidinae;N19;Chaetogaster;diastrophus;N19_BD_CDS1
ACTATCAAGAAATCTTGCCCATGCAGGACCCTCAGTAGATATAGCAATTTTTCTCTCTACA
TTTAGCCGGTGCTTCATCTATCTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTCATTAACAT
ACGATGAAATGGCATACTTTAGAGCGACTCCCTTTATTTGTATGAGCGGTATTACTAAC
AGTAATTCTCTTACTTCTATCTCTTCCAGTACTAGCAGGTGCAATCACTATGCTATTAAC
AGACCGAAATCTAAACACTTCATTTTTCGATCCTGCTGGCGGCGGAGACCCTATTTTATA
TCAACATCTATGT-

>Oligo175_N19_BD_CDS2 Naididae;Naidinae;N19;Chaetogaster;diastrophus;N19_BD_CDS2
ACTATCAAGAAATCTTGCCCATGCAGGACCTTCGGTAGATATAGCAATTTTTCTCTCTGCA
TTTAGCCGGTGCTTCATCTATCTTAGGGGCAGTAAATTTTATTACAACAGTCATTAACAT
ACGATGAAATGGCATACTTTAGAGCGACTCCCTTTATTTGTATGGGCAGTATTACTAAC
AGTAATTCTTTTACTTCTATCTCTTCCAGTACTAGCAGGTGCAATCACTATACTATTAAC
AGACCGAAATCTAAACACTTCATTTTTCGATCCTGCTGGCGGCGGAGACCCTATTTTATA
TCAACATCTATTT-

>Sanger_C_diastrophus_CDS1_N19

--CACTTTATACCTAATTTTAGGTGTGTGAGCAGGTATAGTAGGTACAGGAAGTAGAATA
CTAATTGGAATTGAACATCCCAACCCGGATCATTCTAGGAAGTGACCAACTATATAAC
ACTTTAGTCACTGCACATGCATTTTTAATAATTTCTTTCTTGTAATACCAGTATTTATT
GGCGGATTTGGAAACTGACTTTTACCTCTTATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCCT
CGACTAAATAACTTAAGATTTTGACTTCTACCCCCATCCCTAATTTTACTTGTATCTTCA
GCTGCTGTAGAAAAAGGAGCAGGAACAGGATGAACTGTGTATCCCCACTATCAAGAAAT
CTTGCCCATGCAGGACCCTCAGTAGATATAGCAATTTTTCTCTCTACATTTAGCCGGTGCT
TCATCTATCTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTCATTAACATACGATGAAATGGC
ATACGTTTAGAGCGACTCCCTTTATTTGTATGAGCGGTATTACTAACAGTAATTCTCTTA
CTTCTATCTCTTCCAGTACTAGCAGGTGCAATCACTATGCTATTAACAGACCGAAATCTA
AACACTTCATTTTTCGATCCTGCTGGCGGCGGAGACCCTAT-TTTATATCAACATCTATG



T-

>Sanger_C_diastrophus_CDS2_N19

```
--CACTTTATACCTAATTTTAGGTGTATGAGCAGGTATAGTAGGCACAGGAACTAGAATA
CTAATTGCAATTGAACTATCTCAACCCGGATCATTCTAGGAAGTGACCAACTATATAAC
ACTTTAGTCACTGCACATGCATTTTAAATAATTTCTTTCTTGTAATGCCAGTATTTATT
GGCGGATTTGGAAACTGACTTTTACCTCTTATACTAGGAGCTCCTGATATGGCATTCCCT
CGACTAAATAACTTAAGATTTTGACTTCTACCCCATCCCTAATTTTACTTGTATCTTCA
GCTGCTGTAGAAAAAGGAGCAGGAACAGGATGAACTGTTTATCCCCCACTATCAAGAAAT
CTTGCCCATGCAGGACCTTCGGTAGATATAGCAATTTTCTCTCTGCATTTAGCCGGTGCT
TCATCTATCTTAGGGGAGTAAATTTTATTACAACAGTCATTAACATACGATGAAATGGC
ATACGTTTAGAGCGACTCCCTTTATTTGTATGGGAGTATTACTAACAGTAATTTCTTTTA
CTTCTATCTCTCCAGTACTAGCAGGTGCAATCACTATACTATTAACAGACCGAAATCTA
AACACTTCATTTTTCGATCCTGCTGGCGGCGGAGACCCTAT-TTTATATCAACATCTATT
```

T-

Chaetogaster sp. ou Amphichaeta sp. ? N20 Barcoding (Sanger)

>Oligo179_N20_BD_Glatt6 Naididae;Naidinae;N20;Chaetogaster;sp;Amphi-
chaeta;sp;N20_BD_Glatt6

```
ATTATCAAGAAACATTGCACATGCCGGACCTTCTGTAGATATGGCTATTTTCTCGCTACA
TTTAGCTGGTGCTTCATCTATTCTAGGTGCAGTTAATTTTATTACTACAGTAATTAACAT
ACGATGAAATGGAATACGATTAGAACGAATTCCTCTATTTGTATGAGCAGTATTACTAAC
GGTTATCCTACTTTTATTATCTCTTCCAGTACTAGCAGGAGCAATTACTATATTACTAAC
AGATCGAAATCTAAACACTTCTTTCTTTGATCCCGCTGGAGGTGGTGATCCTATTCTATA
TCAACATCTATTT-
```

>Sanger_Chaetogaster_sp_Amphichaeta_sp_Glatt6_N20

```
--CACTCTATACTTAATTTTAGGAATTTGAGCAGGAATAATTGGTACAGGAACCAGAATA
CTTATTGCAATTGAACTATCACAACCAGGATCATTCTAGGCAGAGATCAATTATATAAC
ACTCTAGTAACTGCCCATGCATTCTTAATAATTTTCTTTCTAGTTATACCAGTATTTATT
GGAGGATTCGGAAACTGATTACTTCCACTAATACTTGGTGCACCCGATATGGCATTCCCA
CGGTTAAATAACCTAAGATTTTGACTTCTTCCACCATCATTAATTTTATTAATTTTCATCT
GCTGCAGTAGAAAAAGGCGCAGGAACAGGATGAACAGTATATCCTCCATTATCAAGAAAC
ATTGCACATGCCGGACCTTCTGTAGATATGGCTATTTTCTCGCTACATTTAGCTGGTGCT
TCATCTATTCTAGGTGCAGTTAATTTTATTACTACAGTAATTAACATACGATGAAATGGA
ATACGATTAGAACGAATTCCTCTATTTGTATGAGCAGTATTACTAACGGTTATCCTACTT
TTATTATCTCTTCCAGTACTAGCAGGAGCAATTACTATATTACTAACAGATCGAAATCTA
AACACTTCTTTCTTTGATCCCGCTGGAGGTGGTGATCCTAT-TCTATATCAACATCTATT
```

T-

Amphichaeta raptisae N21 SHD éthanol

>Oligo279_N21_Spe18z_eth_ASV4506 Naididae;Naidinae;N21;Amphichaeta;rapti-
sae;N21_Spe18z_eth_ASV4506

```
CCTTTCTAGAAATATTGCCCATGCTGGACCATCAGTAGACATGGCTATTTTCTCATTACA
TTTAGCTGGGGCATCATCAATTCTTGAGCAGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAACAT
ACGATGAAATGGAATACGACTAGAACGAATCCCATTATTTGTATGAGCAGTATTTTAAAC
AGTTATTTTACTTTTATTATCCCTACCTGTACTAGCAGGAGCAATTACAATACTTTTAAAC
AGACCGTAATTTAAATACTTCATTTTTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCTATTTTATA
CCAACATTTATTT-
```

Chaetogaster limnaei N22 SHD éthanol

>Oligo284_N22_Spe19z_eth_ASV3751 Naididae;Naidinae;N22;Chaetogaster;lim-
naei;N22_Spe19z_eth_ASV3751

```
ATTATCAAGGAACCTTGCTCACGCGGGACCTTCGGTAGATATGGCTATTTTCTCTCTACA
CTTAGCCGGTGCTTCATCTATTTTAGGAGCCGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAATAT
ACGATGAAATGGAATACGATTAGAACGAGTCCCTCTATTTCGTATGAGCAGTTCTATTAAC
```



AGTAATTCTTCTATTACTATCTCTTCCAGTACTTGCCGGGGCAATTACTATACTACTAAC
AGATCGAAATCTTAACACTTCTTTCTTCGATCCAGCCGGTGGTGGAGATCCTATTCTATA
CCAACATTTATTC-

>Oligo285_N22_Spe19z_eth_ASV3218 Naididae;Naidinae;N22;Chaetogaster;lim-
naei;N22_Spe19z_eth_ASV3218

ATTATCAAGGAACCTTGCTCACGCGGGACCTTCCGTAGATATGGCTATTTTCTCTCTACA
CTTAGCCGGTGCCTCATCTATTTTAGGAGCCGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAATAT
ACGATGAAATGGAATACGATTAGAACGAGTCCCTCTATTTCGTATGAGCAGTCCTATTAAC
AGTAATTCTACTATTACTATCTCTTCCAGTACTTGCCGGGGCAATTACTATACTACTAAC
AGATCGAAATCTTAACACTTCTTTCTTCGATCCAGCCGGTGGTGGAGATCCTATTCTATA
CCAACATTTATTC-

Chaetogaster diastrophus N23 SHD éthanol

>Oligo280_N23_FLE LAND_eth_ASV759 Naididae;Naidinae;N23;Chaetogaster;di-
astrophus;N23_FLE LAND_eth_ASV759

TCTATCAAGAAATCTTGACACGCGAGGCCATCTGTTGACATGGCTATTTTTCTCTACA
CTTAGCAGGTGCTTCATCTATTTTAGGTGCAGTAACTTTATTACAACAGTTATTAATAT
ACGATGAAATGGAATACGACTAGAACGACTTCCACTATTTGTATGAGCTGTGCTACTAAC
TGTAATTCTTCTACTTCTATCACTTCCAGTTCTTGCTGGAGCTATTACAATACTATTAAC
AGATCGAAATCTAAATACTTCATTTTTCGATCCAGCTGGTGGTGGTATCCTATTTTATA
CCAACATCTATTC-

>Oligo283_N23 LAND_eth_ASV1237 Naididae;Naidinae;N23;Chaetogaster;di-
astrophus;N23 LAND_eth_ASV1237

TCTATCAAGAAATCTTGACACGCGAGGCCATCTGTTGACATGGCTATTTTTCTCTACA
CTTAGCAGGTGCTTCATCTATTTTAGGTGCAGTAACTTTATTACAACAGTTATTAATAT
ACGATGAAATGGAATACGACTAGAACGACTTCCACTATTTGTATGAGCTGTGCTGCTAAC
TGTAATTCTTCTCCTTCTATCACTTCCAGTTCTTGCTGGAGCTATTACAATACTACTAAC
AGATCGAAACTTAAATACTTCATTTTTTGATCCAGCTGGTGGTGGTATCCTATTTTATA
TCAACATCTATTC-

Naidinae sp. N24 SHD éthanol

>Oligo304_N24_FLE LAND_eth_ASV354 Naididae;Naidinae;N24;Naidi-
nae;sp;N24_FLE LAND_eth_ASV354

ACTCTCAAGAAATCTTGCTCATGCAGGACCTTCTGTAGATATGGCTATTTTTCTCCTTACA
TTTAGCAGGAGCCTCATCTATTCTAGGTGCAGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAACAT
ACGATGAAATGGAATACGGCTAGAACGACTCCCTCTATTTATCTGAGCAGTACTTCTAAC
TGTAATTCTACTTCTTCTATCACTACCAGTACTTGCTGGGGCAATTACAATACTATTAAC
TGACCGTAATCTAAACACTTCTTTCTTCGATCCCGCTGGAGGTGGAGACCCTATTTTATA
CCAACACTTATTT-

>Oligo305_N24 LAND_eth_ASV602 Naididae;Naidinae;N24;Naidi-
nae;sp;N24 LAND_eth_ASV602

ACTCTCAAGAAATCTTGCTCATGCAGGACCTTCTGTAGATATGGCTATTTTTCTCCTTACA
TTTAGCAGGAGCCTCATCTATCCTAGGTGCAGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAACAT
ACGATGAAATGGAATACGGCTAGAACGACTCCCTCTATTTATCTGAGCAGTACTTCTAAC
TGTAATTCTACTTCTTCTATCACTACCAGTACTTGCTGGGGCAATTACAATACTATTAAC
TGACCGTAATCTAAACACTTCTTTCTTCGATCCCGCTGGAGGTGGAGACCCTATTTTATA
CCAACACTTATTT-

Pristina foreli/aequiseta P2 SHD spécimens marqués

>Oligo256_P2_Cugy_34_ASV153 Naididae;Pristininae;P2;Pristina;foreli;aequi-
seta;P2_Cugy_34_ASV153

ACTAGCAAGAAACATTGCCCATGCCGGACCATCAGTAGACATGGCTATTTTCTCACTACA
TTTAGCAGGTGCTTCATCCATTTTAGGAGCCGTAACTTCATTTGTACAGTACTTAACAT
GCGAACAAAAGGTCTACGACTAGAACGAATTCCCCTATTTACATGAGCCGTATTCCTAAC



TGTAATTCTACTCCTTCTATCACTACCAGTTCTTGCCGGAGCAATCACAATACTTCTAAC
AGACCGAAACCTAAATACATCATTCTTCGACCCAGCAGGAGGGGAGACCCTGTTCTATA
TCAACACCTATTC-

Rhyacodrilus sp. R3 SHD spécimens marqués

>Oligo242_R3_Spe027z_34_ASV140 Naididae;Rhyacodrilinae;R3;Rhyacodri-
lus;sp;R3_Spe027z_34_ASV140

ATTAGCTAGAAATATAGCCCATGCCGGCCCATCTGTAGACATAGCAATTTTCTCATTACA
TTTAGCTGGTGCTTCATCAATTTTAGGTGCAGTTAATTTTATTACGACTGTAATAAATAT
ACGATGAAGTGGAATAAACTAGAACGAATTCCTCTATTTGTATGAGCTGTAACATTAAC
AGTTATTTTACTTTTACTTTTATTACCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACAATACTATTAAC
AGATCGTAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCTGCCGGTGGTGGAGACCCTATTTTATA
TCAACATCTATTT-

Rhyacodrilus subterreanus R4 SHD éthanol

>Oligo278_R4_52SEY_eth_ASV3252 Naididae;Rhyacodrilinae;R4;Rhyacodrilus;subter-
reanus;R4_52SEY_eth_ASV3252

CTTAGCTAGTAACATAGCCCATGCAGGGCCCTCAGTAGATATAGCAATTTTTCTCATTACA
CTTAGCTGGGGCTTCATCTATCCTCGGGGCCGTAAATTTTATTACAACAGTAATAAATAT
ACGATGAAAAGGTATAAAATTAGATCGAATTCCTTTATTTGTATGAGCCGTTACCCTTAC
AGTGATCTTACTTCTACTATCACTACCAGTGTTAGCAGGAGCAATCACAATATTACTAAC
AGACCGCAACTTAAATACATCATTTTTTTGACCCAGCAGGAGGGGGAGACCCCATTTTATA
TCAACATCTATTT-

Tubificinae sp. T40 SHD spécimens marqués

>Oligo152_T40_URT38_ASV30 Naididae;Tubificinae;T40;Tubificinae;sp;T40_URT38_ASV30
TCTAGCTAGTAATTTAGCACACTCTGGACCTTCTGTAGACTTAGCTATTTTCTCATTACA
TTTAGCTGGTGTAGCATCAATCTTAGGGGCTATCAATTTTATTACAACAATAATCAACAT
ACGATGAAAAGGTATACGTCTAGAACGAATTCCTTTATTCGTCTGATCAGTAATCATTAC
TGTAGTACTTCTACTACTGACACTCCAGTACTAGCAGGTGCAATCACTATGCTTCTTAC
AGATCGAAATCTAAATACATCATTCTTCGACCCAGCTGGTGGTGGGGACCCTGTCCTTTA
TCAACATCTATTC-

Potamotheirus heuscheri T41 SHD spécimens marqués

>Oligo223_T41_Spe18z_35_ASV227 Naididae;Tubificinae;T41;Potamo-
theirus;heuscheri;T41_Spe18z_35_ASV227

ATTAGCAAGAAATCTTGCTCATTCTGGACCTTCAGTAGATCTTGCTATTTTCTCTCTTCA
TTTAGCAGGAATTGCTTCTATTTTAGGGGCAATTAACCTTCACTACTACAATAATTAATAT
ACGATGAAAAGGGATGCGTTTAGAGCGAATTCCTTTATTTGTATGAGCTACAATCATTAC
AGTAGTCTTACTCCTTCTCACTCTTCCAGTTCTCGCTGGAGCTATTACTATACTACTAAC
AGATCGAAATCTAAATACCTCATTCTTCGACCCTGCTGGCGGAGGAGATCCTGTTCTATA
TCAACACTTATTC-

Aulodrilus plurisetus T42 SHD spécimens marqués

>Oligo220_T42_Spe18z_19_20_25_26_31_34_36_37_ASV62 Naididae;Tubificinae;T42;Aulo-
drilus;plurisetus;T42_Spe18z_19_20_25_26_31_34_36_37_ASV62

GCTAGCCAGAAATCTAGCCCACTCTGGGCCATCAGTAGATCTAGCAATCTTCTCCCTTCA
TCTTGCCGGGGCTGCCTCAATTCTAGGGGCCATTAACCTTTATTACCACAATAATCAATAT
ACGATGAAAAGGAATACGGCTAGAACGCATCCCACTGTTTCGTTTGAGCAGTAATCTTAAC
AGTAATCCTACTCCTACTAACTCTTCCAGTACTTGCCGGAGCTATTACTATGCTACTCAC
AGACCGAAATCTAAACACATCATTCTTCGATCCAGCAGGAGGGGGAGACCCAGTTCTATA
TCAACACCTATTC-



Limnodrilus hoffmeisteri T43 SHD spécimens marqués

>Oligo249_T43_EPFL1_13_ASV158 Naididae;Tubificinae;T43;Limnodrilus;hoffmeisteri;T43_EPFL1_13_ASV158

CTTAGCTAGAAACCTAGCCCATTCCGGACCTTCTGTAGACCTGGCTATTTTTTCACTACA
TTTAGCAGGAGCTGCATCAATTTTAGGGGCAATTAATTTTCATTACCACAATAATCAATAT
ACGATGAAAAGGAATACGCCTAGAACGTATCCCCTGTTTCGTGTGATCTGTTATTATTAC
AGTTATTCTCCTACTTCTAACCTACCGGTGCTAGCAGGAGCAATCACCATACTTTTAAC
AGATCGAAATCTAAATACATCGTTCTTCGATCCGGCAGGTGGTGGTGACCCGGTCTATA
TCAGCACTTATTT-

Tubificinae sp. T44 SHD spécimens marqués

>Oligo252_T44_Indet_DORI_39_ASV211 Naididae;Tubificinae;T44;Tubificinae;sp;T44_Indet_DORI_39_ASV211

ATTAGCAGGTAATCTCGCACACTCTGGCCCATCAGTAGATCTTGCAATTTTCTCACTACA
CCTAGCAGGTATTGCCTCAATTCTAGGGGCCATCACTTCATCACTACAATAATCAACAT
ACGATGAAAAGGAATACGACTTGAACGAATTCCACTATTTGTATGATCTGTAATTATCAC
AGTTCTCCTACTACTCCTTACGCTACCAGTACTTGCCGGTGCAATTACTATACTACTTAC
AGACCGAAATCTAAATACATCATTCTTGACCCTGCCGGGGGTGGTGACCCAGTATTATA
CCAACATCTATTC-

Tubificinae sp. T46 SHD spécimens marqués

>Oligo218_T46_SEY_30_31_ASV111 Naididae;Tubificinae;T46;Tubificinae;sp;T46_SEY_30_31_ASV111

TCTCTCTGGAAATCTTGCTCATTCTGGCCCTTCTGTAGATTTAGCAATCTTCTCCCTACA
TTTAGCAGGTGTAGCATCAATCCTAGGAGCTATTAATTTTCATTACAATAAGTAAATAT
ACGATGAAAAGGTATGCGACTTGAACGAATTCCATTATTTGTCTGATCTGTAATTATCAC
CGTGGTACTCCTACTTCTTACTCTTCTGTTCTAGCAGGTGCTATTACAATACTTCTAAC
AGATCGAAACCTAAACACCTCTTTCTTCGATCCTGCTGGTGGTGGAGATCCTGTACTATA
TCAACATCTATTC-

Limnodrilus sp. T47 SHD éthanol

>Oligo301_T47_SPE27z_eth_ASV165 Naididae;Tubificinae;T47;Limnodrilus;sp;T47_SPE27z_eth_ASV165

ACTAGCAAGAAATCTAGCACACTCCGGTCCATCTGTAGATTTAGCTATTTTCTCTCTCCA
TTTAGCTGGGGCAGCCTCCATTCTAGGAGCCATTAACCTTTATTACCACAATAATTAATAT
ACGATGAAAAGGAATACGATTAGAGCGAATCCCATTTATTCGTTTGATCTGTAATTATTAC
CGTAATTCTTCTTCTTCTAACCTTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACCATACTACTGAC
AGATCGAAATCTGAACACATCATTCTTCGATCCTGCAGGAGGCGGTGATCCAGTACTATA
TCAACACCTATTT-

Tubificinae sp. T48 SHD éthanol

>Oligo287_T48_MOH_eth_ASV1908 Naididae;Tubificinae;T48;Tubificinae;sp;T48_MOH_eth_ASV1908

ATTAGCTGGCAACTTAGCTCACTCAGGGCCGTCCGTAGACTTAGCTATTTTCTCTCTGCA
TTTAGCCGGAGCTGCCTCAATTTTAGGCGCAATTAACCTTTATTACAATAATTAACAT
ACGATGAAAAGGGATACGCCTAGAACGAATCCCTTATTTGTATGATCAGTTATTATTAC
TGTAATCCTTCTACTACTCACGCTCCCAGTACTAGCCGGTGCTATTACTATACTTCTCAC
AGATCGAAACCTAAATACCTCATTCTTCGACCCGGCCGGTGGTGGGGACCCTGTCCTTTA
CCAACACCTATTC-

Tubificinae sp. T49 SHD éthanol

>Oligo289_T49_eth_GenBank_HQ961546 Naididae;Tubificinae;T49;Tubificinae;sp;T49_eth_GenBank_HQ961546



CTTAGCTGGAAATCTAGCTCACTCAGGCCCTTCAGTAGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCA
TTTAGCAGGGGTCGCCTCAATTTTAGGGGCTATTAACCTTTATTACTACAATAATCAATAT
GCGATGAAAAGGAATACGCCTAGAACGAATTCCTTTATTTGTATGAGCTGTTATTTAAC
AGTAATCCTCCTTCTTCTAACACTACCTGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGTTACTGAC
TGATCGAAATTTAAATACATCATTCTTTGATCCTGCTGGTGGAGGGGACCCTGTTCTTTA
TCAACACTTATTC-

Tubificinae sp.T50 SHD mélange spécimens

>Oligo313_T50_Spe17z1_Bulk_ASV121 Naididae;Tubificinae;T50;Tubifici-
nae;sp;T50_Spe17z1_Bulk_ASV121

TCTTTCAGGTAATCTTGCCCATTCAGTAGACCTAGCAATTTTCTCTCTACA
CCTAGCTGGTGCCTCATCCATTCTAGGTGCAATCAATTTTATTACCACAGTCATTAATAT
ACGATGAAAAGGAATACGTCTAGAACGCATTCCATTATTTGTATGAGCTGTAATTATTAC
GGTAATCCTTCTATTATTAACCCTACCAGTACTGGCGGGAGCCATCACTATATTACTCAC
AGACCGAAATCTAAATACCTCCTTCTTCGACCCGGCGGGAGGGGGCGATCCTGTTCTATA
TCAACACCTATTC-

Tubificinae sp.T51 SHD mélange spécimens

>Oligo314_T51_UNIL2_Bulk_ASV181 Naididae;Tubificinae;T51;Tubifici-
nae;sp;T51_UNIL2_Bulk_ASV181

CCTAGCCGGGAACCTAGCTCATTACAGGGCCATCAGTTGACCTGGCCATTTTCTCACTACA
CCTGGCCGGTGCCTCATCTATTCTAGGCGCAATCAACTTCATTACCACAATAATTAATAT
ACGATGAAAAGGTATACGCCTAGAACGAATTCCTTTATTCTGTCTGATCAGTGATTATTAC
AGTTGTACTATTACTGCTAACACTTCCAGTACTAGCCGGGGCTATTACTATGCTTCTTAC
AGATCGAAACCTAAATACCTCATTCTTTGACCCTGCCGGGGGCGGAGACCCAGTCCTATA
TCAACACTTATTC-

Haplotaxis gordioides H2 Barcoding (Sanger)

>Oligo155_H2_BD_13 Haplotaxidae;Haplotaxinae;H2;Haplotaxis;gordioides;H2_BD_13
ATTAGCAAGTAATCTAGCCCATGCCGGCCCATCCGTAGATCTAGCTATTTTCTCTCTACA
TCTCGCAGGGGTCTCTTCTATCTTAGGAGCAGTAACTTCATTACAACAGTCGTCAACAT
ACGATGAAACGGACTACGCCTTGAACGAATTCCTTTATTCTGTGTGATCCGTAAACATTAC
TGTAATTCTTCTTCTCCTATCTCTACCAGTATTAGCGGGCGCCATTACTATACTATTAAC
AGACCGTAACCTAAATACATCATTCTTCGATCCTGCCGGGAGGTGGAGATCCAGTTCTATA
CCAACACCTATTC-

>Sanger_Haplotaxis_13_H2

CACACTATATTTTCATTCTGGGAATCTGAGGGGGACTCCTAGGTACAAGAATAAGAATAGT
TATCCGAATTGAACCTAAGACAGCCCGGTTTCATTCTTGGGAGAGACCAGCTATACAACAC
TATTGTTACTGCCCACGCTTTCCTGATAATTTTCTTCTAGTCATGCCAGTATTTATTGG
CGGATTTGGGAATTGACTCCTTCCGCTAATATTAGGTGCCCCAGATATGGCCTTTCCTCCG
CCTAAATAATATAAGATTCTGACTTCTGCCTCCAGCAACAATCCTACTAGTGTCCTCCGC
AGCTGTAGAAAAAGGAGCAGGAACAGGTTGAACAGTATACCCACCATTAGCAAGTAATCT
AGCCCATGCCGGCCCATCCGTAGATCTAGCTATTTTCTCTCTACATCTCGCAGGGGTCTC
TTCTATCTTAGGAGCAGTAACTTCATTACAACAGTCGTCAACATACGATGAAACGGACT
ACGCCTTGAACGAATTCCTTTATTCTGTGTGATCCGTAAACATTACTGTAATTCTTCTTCT
CCTATCTCTACCAGTATTAGCGGGCGCCATTACTATACTATTAACAGACCGTAACCTAAA
TACATCATTCTTCGATCCTGCCGGGAGGTGGAGATCCAGTTCTATACCAACACCTATTC

Haplotaxis gordioides H3 Barcoding (Sanger)

>Oligo161_H3_BD_1 Haplotaxidae;Haplotaxinae;H3;Haplotaxis;gordioides;H3_BD_1
CTTAGCAAGAAATCTTGCTCATGCGGGACCTTCCGTAGATCTAGCCATTTTCTCTCTTCA
CTTAGCAGGAGTATCCTCTATCCTGGGAGCAGTAACTTCATCACTACAGTTATTAATAT
ACGATGAAACGGCCTACGCCTAGAACGAATTCCTACTATTCGTATGATCTGTAACCATTAC
AGTAGTTCTTCTCCTATTATCCCTTCTGTACTAGCGGGCGCTATCACTATATTACTAAC



AGATCGAAACCTTAACACATCATTTTTTCGACCCGGCTGGAGGGGGAGATCCCGTCCTATA
TCAGCACTTATTC-

>Sanger_Haplotaxis_1_H3

AACACTTTACTTCATCCTTGGGATTTGGGGGGGACTACTGGGAACAAGAATAAGTATAGT
TATTCGAATTGAACTAAGACAACCAGGATCATTCCTTGGAAGAGATCAACTATATAATAC
CATTGTTACTGCCCATGCCTTCCTTATAATTTTCTTCCTAGTTATACCAGTATTCATTGG
TGGGTTTCGGTAATTGACTCTTACCTTTAATACTAGGGGCACCTGATATGGCATTCCCTCG
TCTTAACAATATAAGATTCTGACTTCTCCCTCCAGCAACAATCCTTCTCGTATCCTCGGC
AGCCGTAGAAAAGGGTGCAGGAACAGGTTGAACCGTTTATCCGCCCTTAGCAAGAAATCT
TGCTCATGCGGGACCTTCCGTAGATCTAGCCATTTTCTCTCTTCACTTAGCAGGAGTATC
CTCTATCCTGGGAGCAGTAACTTCATCACTACAGTTATTAATATACGATGAAACGGCCT
ACGCCTAGAACGAATTCCACTATTCGTATGATCTGTAACCATTACAGTAGTTCTTCTCCT
ATTATCCCTTCTGTACTAGCGGGCGCTATCACTATATTACTAACAGATCGAAACCTTAA
CACATCATTTTTTCGACCCGGCTGGAGGGGGAGATCCCGTCCTATATCAGCACTTATTC

Haplotaxis gordioides H4 Barcoding (Sanger)

>Oligo156_H4_BD_15a Haplotaxidae;Haplotaxinae;H4;Haplotaxis;gordioides;H4_BD_15a
CTTAGCCAGTAACCTTGCCACGCTGGGCCATCAGTTGATCTAGCCATTTTTTCCCTTCA
CTTAGCAGGAGTTTCTCCTCATCCTAGGAGCAGTAACTTCATCACCACCGTTATCAACAT
ACGATGAAATGGGCTCCGCTTAGAGCGAATCCCTTTATTCGTATGATCCGTAACATCAC
AGTAGTTCTACTTCTTCTTCTCTTCCAGTCCTAGCCGGTGCCATTACTATACTTCTAAC
AGATCGAAACCTAAATACATCCTTCTTTGACCCAGCTGGTGGGGGCGATCCCGTCTTATA
TCAACATCTATTT-

>Sanger_Haplotaxis_15a_H4

AACACTTTACTTCATTCTAGGCGTGTGAGGGGGGCTCTTAGGAACAAGAATAAGAATAAT
TATTCGAGTCGAACTAAGTCAACCCGGGTCATTCTAGGAAGAGACCAACTCTATAACAC
TATTGTTACCGCTCACGCTTTCTAATAATCTTCTTCTAGTAATACCTGTATTTATTGG
TGGTTTCGGGAATTGACTCCTACCACTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCCTTCCCTCG
ACTAAACAATATAAGATTCTGACTACTTCTCCCGCAACAATCCTGCTTGTATCTTCAGC
AGCAGTAGAAAAGGGAGCAGGAAGTGGTTGAACCGTTTACCCTCCCTTAGCCAGTAACCT
TGCCACGCTGGGCCATCAGTTGATCTAGCCATTTTTTCCCTTCACTTAGCAGGAGTTTC
CTCCATCCTAGGAGCAGTAACTTCATCACCACCGTTATCAACATACGATGAAATGGGCT
CCGCTTAGAGCGAATCCCTTTATTCGTATGATCCGTAACATCACAGTAGTTCTACTTCT
TCTTCTCTTCCAGTCCTAGCCGGTGCCATTACTATACTTCTAACAGATCGAAACCTAAA
TACATCCTTCTTTGACCCAGCTGGTGGGGGCGATCCCGTCTTATATCAACATCTATTT

Haplotaxis gordioides H5 Barcoding (Sanger)

>Oligo157_H5_BD_31 Haplotaxidae;Haplotaxinae;H5;Haplotaxis;gordioides;H5_BD_31
CTTAGCCAGTAATCTCGCTCACGCGGGGCCCTCAGTAGATCTAGCTATTTTTTCCCTTCA
TCTAGCTGGAGTTTCTCTATCCTGGGAGCAGTAACTTTATTACCACAGTTATTAATAT
ACGCTGAAATGGGCTCCGTTTAGAGCGAATCCCTTTATTTGTGTGGTCAGTAACATTAC
AGTAGTTCTACTTCTACTTTCTCTTCCAGTTCTAGCTGGCGCCATTACTATACTCCTAAC
AGACCGGAACCTAAATACATCCTTTTTTGACCCTGCTGGTGGTGGAGATCCTGTCTTATA
TCAACATCTATTT-

>Sanger_Haplotaxis_31_H5

AACACTTTACTTTATCTTGGGCGTGTGAGGGGGGCTTTTAGGGACAAGAATAAGAATAAT
TATTCGAGTAGAACTAAGACAACCTGGATCATTCCTAGGTAGAGACCAACTCTATAACAC
TATTGTTACCGCTCACGCTTTCTAATAATCTTCTTCTAGTAATACCTGTATTTATTGG
GGGTTTCGGAAATTGACTCCTCCCACTAATACTAGGAGCTCCAGATATAGCCTTCCCACG
ATTAATAATATAAGATTCTGACTACTACCTCCAGCAATTATTCTACTTGTATCTTCGGC
AGCAGTAGAAAAGGAGCAGGGACCGGTGAACCGTTTACCCGCCCTTAGCCAGTAATCT
CGCTCACGCGGGGCCCTCAGTAGATCTAGCTATTTTTTCCCTTCTATCTAGCTGGAGTTTC
CTCTATCCTGGGAGCAGTAACTTTATTACCACAGTTATTAATATACGCTGAAATGGGCT
CCGTTTAGAGCGAATTCCTTTATTTGTGTGGTCAGTAACATTACAGTAGTTCTACTTCT



ACTTTCTCTTCCAGTTCTAGCTGGCGCCATTACTATACTCCTAACAGACCGGAACCTAAA
TACATCCTTTTTTGACCCTGCTGGTGGTGGAGATCCTGTCCTATATCAACATCTATTT

Haplotaxis gordioides H6 Barcoding (Sanger)

>Sanger_Haplotaxis_45_35F19b_H6

AACACTTTACTTCATTCTAGGAGTATGAGGCGGCCTTCTAGGGACAAGAATAAGAATAAT
TATTCGTATTGAACTAAGACAACCCGGATCATTCTCGGAAGAGACCAGCTTTATAACAC
TATTGTTACCGCTCATGCCTTCTTAATAATCTTCTTTCTAGTGATACCAGTATTTATTGG
GGGTTTTGGGAATTGACTTCTACCGTTAATACTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTCCCACG
ATTAATAATATAAGATTCTGACTCCTTCCTCCTGCAACAATTCTACTTGTATCCTCAGC
AGCAGTAGAAAAAGGAGCAGGAACCTGGTTGAACCGTTTACCCCCCTCTAGCCAGTAACCT
TGCCCATGCTGGTCCCTCAGTAGATCTAGCTATTTTTCCCTTCATTTAGCGGGAGTTTC
ATCCATCCTAGGAGCAGTAACTTTATTACCACTGTTATCAATATACGATGAAACGGGCT
TCGCATAGAACGAATCCCTTTATTTGTATGATCTGTAACATTACAGTAGTACTTCTTCT
ACTTTCTCTTCCAGTTCTAGCTGGAGCCATCACTATACTCCTAACAGATCGGAACCTAAA
CACGTCTTTTTTGATCCGGCTGGGGGTGGAGATCCAATCCTATATCAACATCTATTT

Lumbriculidae sp. LL7 SHD spécimens marqués

>Oligo153_LL7_ECH43_ASV50 Lumbriculidae;Lumbriculinae;LL7;Lumbriculi-
dae;sp;LL7_ECH43_ASV50

ATTAGCAAGAAACATTGCACACTCTGGACCCTCAGTAGATTTAGCTATTTTTTCCCTTCA
CTTAGCTGGAGCTTCCTCAATCTTAGGCGCTGTAACTTTATTACCACAGTAATCAATAT
ACGATGACAGGGTATACGTTTAGAACGAATTCCCCTATTTGTATGAGCCGTAATTATTAC
AGTAATCCTTCTACTACTATCACTACCTGTATTAGCAGGAGCCATTACTATACTCTTAAC
AGATCGAAACCTAAATACTTCCTTCTTCGATCCAGCCGGAGGAGGTGATCCGATTCTATA
CCAACATCTTTTT-

Stylodrilus sanguineus LL8 SHD spécimens marqués

>Oligo182_LL8_DOU8_12_44_47_ASV66 Lumbriculidae;Lumbriculinae;LL8;Stylodrilus;sangui-
neus;LL8_DOU8_12_44_47_ASV66

TCTCTCTTCAAATCTAGCCCATTACAGGTCTTCAGTAGATCTAGCTATTTTTTCACTTCA
TCTTGCTGGTGCATCCTCTATTTTAGGAGCCATTAATTTTATTCAACAGTAGCTAACAT
ACGATGAACTGGACTCCGAATAGAACGAGTACCCTTATTTGTTTGAGCTGTGACTATTAC
AGTAGTATTACTTCTTCTTTCTTACCTGTTCTTGACAGGAGCTATTACTATACTACTAAC
AGATCGAAATCTAAATACATCTTTTTTTGATCCAGCTGGTGGCGGTGACCCTATTTTATA
TCAACATCTTTTT-

Guestphalinus sp. LL9 Barcoding (Sanger)

>Oligo158_LL9_BD_32 Lumbriculidae;Lumbriculinae;LL9;Guestphalinus;sp;LL9_BD_32
CTTGTCAGCAACATTGCCATGCAGGGCCATCTGTAGACCTAGCAATTTTTTCACTACA
TTTAGCCGGTGCCTCGTCAATTTTAGGTGCCGTAAATTTTATCTCTACAGTAATTAATAT
ACGATGAAATGGTCTTCGATTAGAGCGAATTCCTTTATTTGTATGGGCTGTAACAATTAC
AGTAGTTCTTCTTCTTTTATCTCTTCCAGTATTGGCTGGGGCTATTACCATATTACTAAC
AGACCGAAATCTAAATACTTCATTCTTCGACCCAGCTGGTGGGGGCGATCCGGTATTATA
TCAACACTTATTT-

>Sanger_Guestphalinus_sp_32_LL9

--AACACTATACTTCATTTTAGGTGTCTGAGCTGGGATAATCGGAGCTGGTATAAGATTA
TTAATTGCAATTGAACTAACACAGCCAGGAGCATTCTTGGAAGGGATCAACTATATAAT
ACTATAGTAACAGCCCATGCCTTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCTATATTTATT
GGGGGATTTGGAAATTGAATACTTCCACTTATATTAGGCGCGCCAGATATAGCTTTCCCA
CGTCTAAACAACCTTAGATTTTGATTACTACCACCATCATTAATTCTTCTAGTTTCATCT
GCGGCTGTGGAAAAGGGAGCAGGAACAGGATGAAGTGTCTATCCACCCTTGTCAGCAAC
ATTGCCATGCAGGGCCATCTGTAGACCTAGCAATTTTTTCACTACATTTAGCCGGTGCC
TCGTCAATTTTAGGTGCCGTAAATTTTATCTCTACAGTAATTAATATACGATGAAATGGT



CTTCGATTAGAGCGAATTCCTTTATTTGTATGGGCTGTAACAATTACAGTAGTTCTTCTT
CTTTTATCTCTTCCAGTATTGGCTGGGGCTATTACCATATTACTAACAGACCGAAATCTA
AATACTTCATTCTTCGACCCAGCTGGTGGGGGCGATCCGGT-ATTATATCAACACTTATT
T-

Lumbriculus variegatus LL10 SHD éthanol

>Oligo281_LL10 LAND_eth_ASV705 Lumbriculidae;Lumbriculinae;LL10;Lumbriculus;varie-
gatus;LL10 LAND_eth_ASV705
ATTAGCAAGAACTTAGCACATGCAGGCCCATCAGTAGACTTAGCCATTTTCTCCCTTCA
TCTCGCTGGTGCATCCTCAATTCTAGGTGCCCTGAATTTTATTACAACAGTAATTAATAT
ACGATGAAATGGAATACGCCTTGAACGAATTCCTTTATTTGTATGAGCCGTAATAATCAC
CGTAATCTTGCTACTTTTATCCTTACCTGTTCTAGCAGGAGCTATTACTATATTACTTAC
GGACCGAAATCTAAATACATCCTTCTTTGATCCAGCAGGAGGCGGAGATCCAGTTCTATA
TCAACACTTATTT-

Lumbriculidae sp. LL11 SHD éthanol

>Oligo306_LL11_Spe18z_MOH_eth_ASV1692 Lumbriculidae;Lumbriculinae;LL11;Lumbriculi-
dae;sp;LL11_Spe18z_MOH_eth_ASV1692
TCTAGCTAGAAACATTGCACACGCTGGCCCATCAGTTGATATAGCAATTTTTCTCACTTCA
TCTAGCAGGAGCATCATCAATTCTAGGTGCTGTAAATTTTATTACCACAGTAATTAACAT
ACGATGAAATGGGATACGATTAGAACGTATTCCACTATTTGTATGAGCAGCACTTCTTAC
ACAATTCTTCTACTTCTATCACTACCTGTTTTTGTGGAGCTATTACTATACTACTAAC
AGATCGAAACCTTAATACATCATTTTTTCGATCCTGCTGGTGGTGGAGACCCTATTCTCTA
TCAACACTTATTC-

Lumbriculidae sp. ? LL12 SHD éthanol

>Oligo311_LL12_TIN_Spe17z_eth_ASV3237 Lumbriculidae;Lumbriculinae;LL12;Lumbriculi-
dae;sp;LL12_TIN_Spe17z_eth_ASV3237
ATTGTCAAGCGTAGAAGCTCACTCAGGGCCATCAGTAGATTTAGCGATTTTTCTCACTACA
TCTAGCGGGTGCTTCGTCAATTCTAGGAGCTATTAATTTTATTACAACCATTGTAAACAT
ACGTGCACCAGGTATAACAATACACCGATTGCCGCTATTTTGTGGTCACTGCTAATTAC
AGCAGTACTACTATTGTTGTCACTACCAGTACTAGCAGGTGCTATTACAATGCTACTAAC
AGACCGTAATTTCAATACGTCAATCTTCGATCCAGCTGGAGGTGGAGATCCTATTCTATA
CCAGCATAGGTTC-

Oligochaeta sp. ? O1 SHD ethanol

>Oligo310_O1_TIN_eth_ASV178 Oligochaeta;Oligochaeta;O1;Oligo-
chaeta;sp;O1_TIN_eth_ASV178
ATTAGCTAGTAATATAGCTCACGCCGGCCCATCAGTTGACCTAGCAATTTTCTCCCTTCA
CTTAGCCGGAGCCTCATCTATTTTAGGTGCAGTCAATTTTCAATTTCAACAGTTATTAATAT
ACGTTGACAGGGCCTCCAACCTTGAACGAATCCCACTATTCGTCTGAGCAGTCACAATTAC
AGTAGTTCTACTCCTTCTATCACTTCCAGTACTAGCTGGAGCCATTACTATACTCCTAAC
TGATCGTAATCTTAACACATCATTCTTTGACCCAGCTGGCGGAGGAGATCCAATTCTATA
TCAACATTTATTT-