



**HAL**  
open science

# L'ADN environnemental pour la bioindication du futur : aspects fondamentaux, méthodologiques et applicabilité en rivière intermittente

Héloïse Verdier

## ► To cite this version:

Héloïse Verdier. L'ADN environnemental pour la bioindication du futur : aspects fondamentaux, méthodologiques et applicabilité en rivière intermittente. Ingénierie de l'environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10178 . tel-04341638v1

**HAL Id: tel-04341638**

**<https://theses.hal.science/tel-04341638v1>**

Submitted on 7 Jun 2024 (v1), last revised 13 Dec 2023 (v2)

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°d'ordre NNT : xxx



## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° ED341**  
**Evolution, Ecosystème, Microbiologie, Modélisation (E2M2)**

**Spécialité de doctorat** : Écologie  
**Discipline** : Écologie moléculaire

Soutenue publiquement/à huis clos le 08/12/2022, par :  
**Héloïse Verdier**

---

**L'ADN environnemental pour la bioindication du futur :  
Aspects fondamentaux, méthodologiques et  
applicabilité en rivière intermittente**

---

Devant le jury composé de :

ARNAUD-HAOND Sophie  
MIAUD Claude  
BONIN Aurélie  
CHARLES Sandrine

Chargée de Recherche  
Directeur d'étude  
Directrice générale  
Professeure des Universités

IFREMER  
CEFE / EPHE  
ARGALY  
UCBL

Rapportrice  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examinatrice

LEFEBURE Tristan  
DATRY Thibault

Maître de Conférences  
Directeur de Recherche

UCBL  
INRAE

Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse



## Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

### COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

### COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR Sportives (STAPS) Activités Physiques et	Directeur : M. Yannick VANPOULLE



# Remerciements

Dix ans en arrière, si l'on m'avait dit que je passerai d'un bac professionnel équitation à un doctorat en écologie, j'aurais bien ri ! Après tant de péripéties scolaires et personnelles, en arriver là était loin d'être une promenade de santé. Finalement, cette thèse fut l'expérience la plus révélatrice et enrichissante que j'ai pu vivre, pendant laquelle j'ai beaucoup évolué et trouvé une réelle vocation. Pour la première fois, je peux dire que je suis fière de ce chemin parcouru. Bien évidemment, ce travail n'aurait jamais vu le jour sans l'aide de très nombreuses personnes : celles qui m'ont mise sur la voie, celles qui m'ont soutenue et accompagnée depuis mes premiers pas dans la recherche jusqu'à la correction des dernières fautes d'orthographe et l'organisation de la soutenance. Puisqu'il est techniquement difficile d'ériger une statue pour chacun.e d'entre vous, bien que vous le méritiez, je me contenterai de ces quelques mots afin de vous exprimer ma profonde gratitude. Si j'en suis arrivée là, c'est en grande partie grâce à vous tous.tes.

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : Sophie Arnaud-Haon, Claude Miaud, Aurélie Bonin et Sandrine Charles. En tant que pionnier.es du domaine de l'ADN environnemental, ce fut un immense honneur que vous ayez évalué ce travail. Je remercie particulièrement Sophie et Claude, dont les commentaires ont amélioré ce manuscrit et fait émerger de nouvelles pistes de réflexion. J'ai beaucoup apprécié les échanges dans la bienveillance et la bonne humeur que nous avons eu après la soutenance, ce moment restera longtemps gravé dans ma mémoire. J'espère être amenée à vous recroiser ou collaborer avec vous dans de futurs projets.

Je tiens à remercier également les membres de mon comité de pilotage : Nicolas Poulet, Philippe Usseglio-Polatera, Arnaud Foulquier et Hasna Boubakri. Merci de vous être toujours déplacés (même de loin !) et de vous être investi pour le bon déroulement de cette thèse. Je vous remercie pour vos conseils et nos échanges, qui ont orienté ce travail de la meilleure des façons.

Je remercie les institutions qui ont financé ce projet de thèse : l'Office Français de la Biodiversité (avec une pensée particulière à Nicolas Poulet et Estérelle Villemagne qui ont suivi le projet depuis le départ), Eurofins Hydrobiologie France et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie. Grâce à vous j'ai pu monter des designs expérimentaux compliqués avec plein de contrôles négatifs et de répliques.

Que serait cette thèse sans l'incroyable équipe de chercheurs et chercheuses à l'initiative du projet !!? Tristan, Thibault, Amélie, Christophe et Agnès, je vous remercie déjà tous et toutes d'avoir monté un projet de thèse aussi passionnant et de m'avoir fait confiance pour le mener à bien. J'ai adoré explorer des domaines scientifiques aussi variés ; allant de la chimie des matériaux à la biologie moléculaire, en passant par la bioindication des eaux douces et l'écologie des rivières intermittentes. Vos expertises et sensibilités propres ont fait de cette thèse une expérience extrêmement riche, tant scientifiquement qu'humainement.

Christophe, merci pour ton tact légendaire et la fabrication de capteurs en un éclair. Agnès, même à distance, tu t'es toujours intéressée de près à ma thèse et son déroulement. Je te remercie grandement pour tes conseils judicieux, de m'avoir intégré dans le groupe DNAquanet et accueillie à Thonon pour les extractions d'ADN de biofilms. Amélie, tu as toujours pris soin de créer du lien entre Eurofins et les différents labos, ainsi que de m'intégrer aux activités de l'entreprise. Tu m'as beaucoup appris sur la gestion de projet et des relations professionnelles, ce qui m'a été (et me sera) d'une grande utilité.

Nos points hebdomadaires étaient très importants pour moi, à la fois pour me remettre sur le droit chemin lorsque je m'égarais dans des expériences/analyses à la « mord moi le noeud », que pour te partager mes joies et mes déceptions de manips. Tu n'as pas peur de dire les qualités (et aussi les défauts !) des personnes avec qui tu travailles, ce qui m'a permis de garder confiance en moi et de me remettre en question tout au long de la thèse. Je te souhaite une belle carrière et de supers voyages aux quatre coins du monde !

Viens maintenant le tour de mes deux directeurs de thèse : Thibault et Tristan. Thibault, ta capacité à cerner en un clin d'œil les objectifs et enjeux de ma thèse m'a toujours épatée. Malgré tes 10 000 projets sous le coude (en plus de l'accordéon, ton miel et tes chèvres, entre autres), tu m'as toujours accordé du temps et apporté des conseils utiles et pertinents (dans un style bien à toi ;)). Je salue également ta grande réactivité, on ne se sent jamais passer au second plan, et ça, c'est vraiment motivant ! Tristan, puisque tu adores les déblatérations gênantes, j'en profite pour faire une longue tirade. Malheureusement, ça ne suffira pas à exprimer toute ma reconnaissance. Deux traits de personnalité que j'admire chez toi sont ta zénitude à toute épreuve (à la limite du stoïcisme parfois) et ta modestie. Grâce à toi, j'ai appris à relativiser beaucoup de situations, même lorsque la crise était proche. Plus généralement, je te remercie de m'avoir laissé autant d'autonomie pendant ce travail de thèse, tout en restant très présent. Un immense merci pour ton investissement, malgré toutes les responsabilités qui te sont tombées dessus en même temps. Peu d'encadrants passeraient autant de temps à aider leur doctorant.es que ce soit pour les manips (tu fais des crêpes de filtres comme personnes il faut bien l'avouer !), le terrain, les analyses stats, la rédaction, et même pour m'écouter me plaindre avec la plus grande des bienveillances. Merci aussi pour les blagues loufoques et les cafés à déterrer les morts. Merci de toujours avoir su débloquer n'importe quelle situation en un clin d'œil avec tes connexions neuronales super-soniques et tes œuvres d'art sur le tableau. En période de rédaction, quelques minutes de discussion suffisaient à dénouer plusieurs heures de rumination. Et plus que tout, je te remercie de m'avoir considérée comme si j'étais ton égale, sans jamais me rabaisser et de toujours m'avoir encouragée. Ton soutien était indispensable dans les moments de panique où mon syndrome de l'imposteur me faisait perdre confiance. Te voir danser sur du punk avec du vernis arc-en-ciel sur les ongles de pieds m'y a sûrement aidé. Je finis en te disant, en toute honnêteté, que tu es le meilleur directeur de thèse qu'un.e doctorant.e puisse avoir. Je te souhaite encore plein de beaux projets d'ADNe pour la suite (avec un peu moins d'administratif et de charge d'enseignement).

Pendant ma thèse, j'ai eu la chance de travailler avec pas moins de 5 équipes, toutes constituées de personnes formidables que je tiens à remercier particulièrement. Pour des soucis de charte graphique, vous comprendrez que je ne pourrai pas tous et toutes vous citer. Tout d'abord, l'équipe de l'entreprise Eurofins Hydrobiologie France. Merci à Florian Doyen d'avoir repris le projet à ton arrivée et fais en sorte qu'il se poursuive. Je te remercie d'avoir été très compréhensif et toujours avoir montré de l'intérêt pour les aspects scientifiques, pourtant assez éloignés de ton corps de métier. Jérémy, je te remercie de m'avoir initié aux pratiques d'Eurofins, de m'avoir accompagné sur le terrain et généré des débats animés sur l'ADNe. Un grand merci pour ton aide en période de rédaction et d'avoir pris le temps de répondre à mes questions naïves sur la bioindication.

Je remercie du fond du cœur l'équipe E3S au LEHNA où règne simplicité, humour et convivialité. J'ai beaucoup de personnes à remercier dans ce laboratoire où j'ai passé les 3/4 de mon temps pendant 4 ans. Lara, la super-woman du plateau Ecomol, capable en 1 h de temps d'effectuer 160 PCR, 50 extractions, tout en téléphonant à la DIRPAT et en remplissant les 15 cahiers de laboratoire des différents projets. Merci de m'avoir inculqué ton savoir, de m'avoir aidé dans TOUTES mes manips, d'avoir croisé les doigts avec moi, d'avoir été déçu aussi, d'avoir toujours été force de proposition, et ce, avec le sourire.

Je remercie mes co-bureaux successifs, Nathanaëlle, Maïlys, Laura, Axelle et Gauthier, pour les moments de partage et pour avoir supporté mes nombreux "ralages" quand j'étais sur l'ordi et pas en manip. Je remercie Nathanaëlle qui a grandement facilité mon intégration dans l'équipe et qui m'a fourni un topo détaillé du fonctionnement du labo dès mon arrivée. Merci au grand Florian pour son aide sur mes manips, au petit Florian pour le prêt de l'ordi afin de rédiger le chef-d'œuvre de science que vous vous apprêtez à lire (lol). Clémentine, un grand merci pour ton humour décoiffant, pour m'avoir nourri à plusieurs reprises en fin de thèse. Ton écoute et tes encouragements sur la fin m'ont vraiment (vraiment !) aidé à ne pas succomber à la panique. Je remercie la team doctorant et post-doctorant : Charlotte, Juliette, Maïlys, Hugo, Thomas, les Pauline, Valérian, Yohan, Louise, Nans, Samuel, Camille, Aurel, Lina, les Léo, Basile et les autres que j'oublie (sorry). Merci pour tous les moments passés ensemble, allant des pauses clopes sur la passerelle (que je vous aies taxées la plupart du temps, je m'excuse pour ça), des repas au domus, aux soirées jeux et aux déblatérations sur les galères de thèse. Plus généralement, je remercie tous les membres du LEHNA; le pôle administration et les autres équipes de recherche qui m'ont apporté leur aide. Une pensée particulière à Loïc Teulier, Angéline Clair et Laetitia Averty pour votre apport scientifique et technique pour ma manip en mésocosmes, merci également à Jérôme et Jihane du DTAMB pour votre aide et la mise à disposition des appareils de qPCR (vous, les appareils, je ne vous remercie pas pour tout le mal que vous m'avez fait).

Merci également aux 2 super team d'INRAE : Ecoflows et CARRTEL ! Les Ecoflows, j'ai passé moins de temps chez vous (ça manque un peu de thermocycleurs chez vous y'a que des binos !), mais à chaque fois j'ai été accueillie à bras ouvert, dans la bonne humeur et dans la jovialité. Maxence et Bertrand, je vous remercie d'avoir toujours demandé de mes nouvelles et de vous intéresser aux résultats des capteurs. Merci également de m'avoir aidé à préparer mon terrain et à trier mes données (parfois WTF). L'équipe du CARRTEL, merci de m'avoir accueillie dans votre petit paradis au bord du lac Léman à l'occasion de formations ou pour des manips. Plus particulièrement je souhaite remercier Sinzi, Fred et Valentin pour votre bonne humeur, votre humour et nos échanges sur le futur de l'ADNe ainsi que vos conseils sur la rédaction ou encore sur mon avenir pro. Mon court séjour chez vous à base d'extraction-bière-baignade était vraiment génial. Sinzi, ta spontanéité et nos discussions spirituelles vont me manquer. J'espère que tu m'inviteras dans ta nouvelle maison en Espagne !

J'adresse maintenant mes sincères remerciements à l'équipe Cera de MATEIS et plus particulièrement à Helen et Solène. Merci Helen (alias la reine du frittage) pour avoir brûlé mes petits capteurs avec douceur et dextérité. Je vous remercie toutes les 2 pour votre enthousiasme à sortir de votre zone de confort pour comprendre ce qui se tramait autour des expériences capteurs pas répliquables, pour m'avoir initié aux joies et aussi aux bizarreries de la science des matériaux. Je n'aurais jamais pensé faire des montages d'Archimède (je le dis juste pour avoir la classe) ou utiliser des rayons X pendant ma thèse. Je suis ravie que cette collaboration ait débouché sur un article et un stage de M2, et j'espère encore d'autres projets ! J'en profite d'ailleurs pour remercier les stagiaires qui ont contribué à l'obtention des résultats de cette thèse : Louise Camus et Jallal Omarakly.

Dans cette aventure, j'ai rencontré des personnes formidables qui m'ont permis de survivre à Lyon (si vous me connaissez bien vous savez l'aversion que j'ai pour cette ville) et qui sont devenus des ami.es vraiment chère.s à mon cœur : Maïlys, Luc, Juliette, Clarisse, Charlotte, Mathieu, Thomas, Manu, Mathis, Mohammad, Theresa et Léo. Je ne vous dois pas un grand, ni un immense mais un INCOMMENSURABLE MERCI. Merci pour tous les moments que nous avons passés ensemble, les parties de volley à la feyssine, les soirées au bar à jeux, les soirées films, les sessions grimpe, et ceux à venir.



Ce n'est pas sans émotions que j'écris ces mots pour remercier LA team, LE supra-crew, L'incroyable équipe des sisters love. Merci tout simplement de faire partie de ma vie et de m'apporter tellement de bonheur au quotidien. Vous ne vous en rendez peut-être pas compte, mais vous avez fait de moi une personne meilleure, plus à l'écoute et (un peu plus) aimable. Vous n'avez cependant pas réussi à me faire arrêter d'insulter tout et tout le temps, ni de roter, y'a encore du boulot. Merci de m'avoir également ouverte au féminisme, mes poils de jambes vous en sont très reconnaissants. J'espère qu'on se racontera toujours nos repas de famille avec les fameux "tontons GéGé" (plus généralement les gros beaufs machos) pour débriefer des meilleures punch-lines à leur balancer. Maïlys, je n'aurais pas assez d'une page pour te remercier à la hauteur de ce que je voudrais. Je te remercie d'être une amie incroyable, avec des capacités d'empathie et de compersion absolument hors du commun. Merci pour tes conseils, tes corrections, tes mots rassurants et toutes tes attentions. Tu m'impressionneras toujours avec ta faculté à mémoriser ce que tes proches aiment ou n'aiment pas, ce qu'ils font de leur week-end, ce qu'ils ont mangé la veille ou même le prénom de leur grand-tante. Cette thèse n'aurait pas été la même sans tes multiples contributions, à la fois pour les manips, les réflexions, les analyses et les relectures (et oui c'est ça d'être the "metabarcoding queen"). Je peux même affirmer que je n'y serais pas arrivé sans toi.

Juliette, ma muse de moquerie préférée, depuis que tu es parti en Australie, Maïlys subit mes super vanes ... Je n'aurais pas non plus assez d'une page pour te remercier. Merci d'être toujours de bon conseil avec un pragmatisme indétrônable, d'être toujours motivée pour tout, de dire avec diplomatie que les gens sont des cons. Merci de m'avoir souvent fait plein de compliments pour que je reprenne confiance en moi quand je disais "mais Juju c'est de la merde ce que j'ai écrit !", pour ton aide sur les stats et les multiples relectures. Je te souhaite d'amasser plein de tunes pour des projets sur le comportement de poissons et un poste CNRS avant tes 45 ans, tu le mérites tellement. Clarisse, ou la personne avec un sourire fixé à son visage H24, merci pour toutes les rigolades sur les mots que tu ne sais pas prononcer ou dont tu confonds le sens (dédicace aux poisgelés), merci pour tes pas de danses déchaînés, ton authenticité et ta gentillesse. Charlotte, merci pour ton calme et ta capacité à comprendre les autres, c'est rare de t'entendre dénigrer quelqu'un (il faut qu'iel l'ait vraiment cherché !). A ton contact, je me sens tout de suite plus sereine. Merci de nous avoir accueillie dans ton bureau, et pour tous les chouettes moments ensemble. Je rajoute dans le lot Mathieu, le King des biais cognitifs, de l'art déco et des chats à poils longs. Merci d'être aussi drôle et ouvert à parler de tout sans tabous ni jugements. Converser crûment sur les relations amoureuses fait partie de mes activités favorites.

Il est temps maintenant que je rende hommage aux vieux de la vieille comme on dit, les ami.es qui me supportent et m'encouragent depuis 5 ans et plus ! Premièrement, les ami.es de master Marie Clares, Marie Perrin, Tophy, Paolo, Robin et aux autres, merci pour ces deux ans de folie à Marseille. Même si on a perdu un peu le contact ces dernières années, vous gardez une place très chère dans mon coeur, et voir que rien ne change quand on se revoit c'est vraiment chouette. Viens le tour des ancêtres, les GB, 10 ans d'amitié ça commence à faire... Merci d'être mes ami.e.s., pour toutes nos aventures, pour les campings sonores qui m'ont fait oublier mon anxiété doctorale le temps d'un week-end, et pour les anniversaires surprises. Clémentine merci d'être, si on peut dire, "mon pilier amical" depuis si longtemps. Merci pour tous les moments ensemble à terre et à cheval, pour les corrections avec ton radar à faute d'orthographe, ton écoute, ton soutien et tes câlins si réconfortants. Merci à Flo, Cam, Harris, Rob, Julie, Soline, Laura, Laurine, Anto et Adri pour vos personnalités hors du commun, vos grandes gueules grâce auxquelles je peux me remettre en question (un remerciement spécial à Flo pour ça ;)). Je ne voudrais perdre tout ça pour rien au monde. Merci pour votre soutien sans faille depuis le début à base de " aller bac pro cheval, t'es pas si con !! ". Les avignonnais; Laure, Clément, Auria, Lucas merci pour nos week-ends pétanques, fléchettes, skis / luges et j'en passe. Laure et Clem, merci de nous accueillir souvent chez vous, et de toujours être motivé pour venir nous voir à Lyon. Vous n'imaginez pas à quel point j'étais émue et heureuse de vous voir tous et toutes à ma soutenance et de partager ce moment avec vous.

Merci aux nombreux chevaux, poneys et autres quadrupèdes ayant accepté de me porter sur leur dos pour me faire penser autre chose qu'à ma thèse. Merci à THE BEST COACH EVER : Mélo. Merci de m'avoir fait monter des chevaux incroyables, de me faire confiance depuis tant d'années maintenant que ce soit pour garder les écuries où monter en course de temps en temps. Ta force et ton courage sont une vraie source d'inspiration pour moi.

Cette aventure n'aurait jamais eu lieu sans les personnes au grand cœur qui m'ont donné ma chance. Monsieur Beranger, merci de m'avoir intégré au parcours génie biologique à l'IUT de Digne les Bains, malgré votre réticence au vue de mon parcours "un peu spécial", vous avez accepté de m'accueillir et de me faire confiance. Merci à vous et à toute l'équipe pédagogique de m'avoir fait découvrir l'écologie, par les sorties, les cours et les TP et d'avoir fait naître une nouvelle passion. Pendant ces 2 premières années, Mr Abbes vous avez joué un rôle important en me maintenant à peu près à flot en physique-chimie grâce à vos cours particuliers. Je tiens maintenant à remercier deux personnes qui m'ont fait faire mes premiers pas dans la recherche : Steven Criquet et Julie Foulon. Stéven, merci de m'avoir permis de faire mes stages de M1 et M2 à l'IMBE, sur l'écologie microbienne des boues rouges de Marseille, un sujet passionnant aussi bien sur le plan politique que scientifique. Je garde d'excellents souvenirs de ces stages, ponctués de blagues loufoques et de récits de pêche sur les côtes bretonnes. Merci de m'avoir (sur)vendue à mes encadrants actuels pour qu'ils me prennent en thèse ! Julie, je te remercie pour m'avoir initié aux joies et aux déceptions de la biologie moléculaire. Tu es vraiment un exemple de ténacité pour moi, je tiens encore à te féliciter pour ton poste. Je prendrais du temps pour venir vous voir, j'espère bien qu'on puisse retravailler ensemble et finir nos papiers. J'ai été extrêmement touchée de lire vos petits mots dans mon livre d'or. Pour être honnête, je verse une larme à chaque fois que je les lis, je vous remercie infiniment.

J'adresse maintenant des remerciements spéciaux à ma famille. Pierro, moumoute, dougy et autres surnoms bizarres dont je te gratifie, je ne saurais même pas comment te remercier pour tout ce que tu as fait et fait encore pour moi. Derrière ton petit sourire malicieux et ton calme apparent, tu es quelqu'un avec un cœur immense qui serait prêt à tout pour que je me sente bien. Merci d'être présent depuis plus de 5 ans, de me faire rire, de me faire des plats dignes d'un resto étoilé, et par-dessus tout, de m'avoir soutenue (ou plutôt supportée) ces derniers mois. Je te dois 1000 mercis pour avoir fait mes références, corriger mes fautes d'orthographe des heures durant et d'être souvent rentré "plus tôt" de soirée pour me tenir compagnie (bah oui 5h c'est tôt quand même :p). J'ai beaucoup de chance de t'avoir. Merci à mon pilier émotionnel poilu, mon ti'waf, d'égayer mon quotidien et de me changer les idées le temps d'une balade ou d'une séance de tir à la corde. Merci à ma famille par alliance, Laurie, Arnaud, Agnès, JP, Julien, Méli et les enfants, pour votre gentillesse et vos délicates attentions. Je suis super touchée que vous soyez venu à ma soutenance. Mes petits frères et sœurs, Jules et Jade, je suis tellement fière de ce que vous êtes devenus malgré le contexte. Merci de vous être intéressé à ce que je faisais et savoir comment j'allais malgré vos "nan mais LoLo, on comprend rien à ce que tu dis...". Merci d'être vous tout simplement, je vous aime tant. Les musiciens ; Florian, Aurélie, les deux zouav et Catou, on se voit moins souvent maintenant mais je vous remercie pour les moments en famille, les parties de whist avec un petit verre de Marselan ou encore les imitations d'accents tordantes. Aurélie, merci pour tes paroles encourageantes en période de rédaction qui ont remonté mon moral en berne. Mamie D, je ne crois pas que tu aies compris ce que je traficote avec l'ADN (" c'est trop compliqué pour moi tout ça, moi faut pas m'emmerder, trop réfléchir c'est fatigant !). Malgré ça, tu me donnes beaucoup de force par ton courage et ton mental d'acier. Isa, marraine, je te dois tellement aussi... Merci de m'avoir soutenue financièrement pour que je poursuive mes études sereinement et de m'accueillir si souvent chez toi. Merci pour notre complicité, tous nos moments ensemble partagés aussi avec Hugo et Axel.

Je finirai par remercier mon papa, mon allié depuis toujours. Je ne pourrais pas écrire ici toutes les raisons pour lesquelles je dois te dire merci. Rien que de penser à tout ce que tu as donné pour moi, pour ma soutenance et j'en passe, m'émeus beaucoup. Merci pour ta patience, ne m'avoir jamais jugé, m'avoir accompagné dans tous mes rêves depuis le bac professionnel jusqu'à la thèse et de t'être donné corps et âmes pour que je poursuive mes études. Je te remercie de toujours t'intéresser à ce que je fais dans les moindres détails, de me poser 10 000 questions pour tenter de comprendre le quotidien d'une thésarde. Essayer de t'expliquer ma thèse pendant les trajets en voiture m'a souvent aidé à y voir plus clair. Tu y es pour tellement dans la consécration de ce doctorat. Je trouve que nous formons la meilleure équipe.

Sur ce, après cette séquence émotion, je vous souhaite une bonne (et longue) lecture !

# Résumé

Dans un contexte de dégradation généralisée des écosystèmes d'eau douce et d'érosion de la biodiversité, une surveillance accrue de l'état écologique de ces milieux est indispensable. L'évaluation de l'état écologique des eaux douces est généralement réalisée par le biais d'inventaires des communautés biologiques qui y résident, indicatrices de la qualité de l'écosystème (e.g. ichtyofaune, macro-invertébrés benthiques, diatomées, macrophytes). Quel que soit le groupe bioindicateur ciblé, les méthodes d'inventaires sont basées sur la capture des organismes vivants, leur identification à partir de leurs traits morphologiques et le calcul d'indices de qualité du milieu par rapport à un écosystème de référence. En plus d'être extrêmement invasives, ces méthodes s'avèrent inopérantes voire impossibles à mettre en œuvre dans certains milieux complexes, en raison de leur dynamisme, de leur inaccessibilité et du manque de connaissances des espèces qui les peuplent (i.e. rivières intermittentes, eaux souterraines). L'émergence des approches moléculaires pour l'étude de la biodiversité offre des perspectives nouvelles pour intégrer ces écosystèmes complexes dans la bioindication. Plus particulièrement, l'échantillonnage de l'ADN relargué par les organismes vivants dans leur milieu, appelé ADN environnemental (ADNe), permet de détecter la présence d'espèces à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement (e.g. eau, sédiments). L'ADNe offre la possibilité d'inventorier la biodiversité de manière non-invasive, et ce même dans les milieux les plus dynamiques et difficiles d'accès. Néanmoins, le manque de connaissances fondamentales sur la dynamique de l'ADNe et les verrous méthodologiques limitent son application pour la bioindication.

Les enjeux de cette thèse sont i) de mieux comprendre les caractéristiques et la dynamique des ADNe relargués par les organismes vivants, ii) de développer un outil d'échantillonnage standardisé et applicable à une large variété d'habitats et iii) d'explorer le potentiel d'approches basées sur l'ADNe pour la bioindication d'un milieu complexe et dynamique, en comparaison avec les inventaires conventionnels.

# Abstract

In a context of generalized degradation of freshwater ecosystems and erosion of biodiversity, monitoring the ecological status of these environments is essential. Assessing the ecological status of freshwaters is generally carried out by inventories of biological communities, which are indicators of the quality of the ecosystem (e.g. ichthyofauna, benthic macroinvertebrates, diatoms, macrophytes). Inventory involved the capture of living organisms, their identification based on their morphological traits and the calculation of environmental biotic indices compared to a reference ecosystem. In addition to being extremely invasive, these methods have proven to be inoperable or even impossible to implement in certain complex environments, due to their dynamism, inaccessibility and lack of knowledge of the species that inhabit them (e.g. intermittent rivers, groundwater). The emergence of molecular approaches for the study of biodiversity offers new perspectives for integrating these complex ecosystems in bioassessment. In particular, the sampling of the DNA released by living organisms into their environment, called environmental DNA (eDNA), allows the detection of the presence of species from environmental samples (e.g., water, sediment). eDNA offers the possibility to characterise biodiversity in a non-invasive way, even in the most dynamic and difficult to access environments. Nevertheless, the lack of fundamental knowledge on eDNA dynamics and methodological limitations limit its application for bioassessment, in particular in complex aquatic ecosystems.

The objectives of this thesis are i) to better understand the characteristics and dynamics of eDNA released by living organisms, ii) to develop a standardized sampling tool applicable to a wide variety of habitats, and iii) to explore the potential of eDNA-based approaches for the bioassessment of a complex and dynamic habitat, in comparison with conventional inventories.

# Cadre de la thèse

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE (Convention Industrielle Recherche et Enseignement) établie entre un partenaire industriel (Eurofins Hydrobiologie France), et quatre laboratoires de recherche : le Laboratoire d'Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA), l'Institut National de la Recherche et de l'Agronomie (INRAE) de Villeurbanne et de Thonon-les-Bains, et enfin l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire (ICBMS). Ce travail a été cofinancé par Eurofins Hydrobiologie, l'Office Français de la Biodiversité (OFB) et l'ANRT (Agence Nationale de Recherche et de Technologie). Au cours de son avancée, cette thèse a aussi bénéficié du support et de l'aide du laboratoire MATEIS, spécialiste de la science et des techniques relatives aux matériaux. À l'interface entre biologie moléculaire, sciences des matériaux et écologie, ce projet de thèse propose plusieurs pistes d'applications : les premières opérationnelles et techniques en direction de l'entreprise Eurofins et de l'OFB, les suivantes en qualité de recherches fondamentales et appliquées pour une utilisation de l'ADNe à l'intention des laboratoires publics.

# Contributions scientifiques

## Publications

### Publiés

**Verdier**, H., Konecny-Dupre, L., Marquette, C., Reveron, H., Tadier, S., Grémillard, L., Barthès, A., Datry, T., Bouchez, A. & Lefébure, T. (2022). Passive sampling of environmental DNA in aquatic environments using 3D-printed hydroxyapatite samplers. *Molecular Ecology Resources*.

Malard, F., **Verdier**, H., Konecny-Dupré, L., Eme, D., Douady, C. J., & Lefébure, T. (2022). *Subterranean species inventory in the molecular era*. 9.

Banerjee, P., Stewart, K. A., Antognazza, C. M., Bunholi, I. V., Deiner, K., Barnes, M. A., Saha, S., **Verdier**, H., Doi, H., Prakash, J., Chan, M.W.Y & Chen, C. Y. (2022). Plant–animal interactions in the era of environmental DNA (eDNA)—A review. *Environmental DNA*.

### En cours de finalisation

**Verdier**, H., Konecny-Duprè, L., Gauthier, M., Tariel-Adam, J., Lefébure, T. Concentration and particle size distribution of eDNA varies with species and organelles.

**Verdier**, H., Gauthier, M., Datry, T., Lefébure, T. 4. L'ADNe de macro-invertébrés révèle l'impact d'une pollution en contexte d'intermittence

# Table des matières

## Chapitre I

<b>État de l'art</b> .....	<b>1</b>
1. Écosystèmes d'eau douce : menaces et enjeux de gestion .....	3
1.1. Une ressource sous pressions .....	3
1.2. Politiques de gestion de l'eau .....	6
1.3. Objectifs de la Directive Cadre sur l'Eau .....	6
1.4. Évaluer l'état écologique par la bioindication.....	7
1.5. Utilisation et limites des outils de bioindication actuels.....	12
2. L'ADN environnemental : une alternative pour la bioindication des milieux complexes ?	15
2.1. Contradictions dans l'utilisation du terme d'ADNe .....	16
2.2. L'ADNe issu de macro-organismes et son écologie .....	17
2.3. De l'échantillonnage à la description de communautés biologiques .....	22
2.4. Détection des espèces à partir de l'ADNe .....	24
3. Potentiels et défis liés à l'utilisation de l'ADNe .....	27
3.1. Apports de l'ADNe en milieux complexes et dynamiques.....	27
3.2. Défis limitant l'application de l'ADNe .....	28
3.3. Les rivières intermittentes : un modèle pour tester l'applicabilité de l'ADNe dans un milieu dynamique .....	31
4. Objectifs et structure de la thèse.....	32
5. Références .....	34
6. Annexe I .....	48

## Chapitre II

<b>Aspects fondamentaux : production et états de l'ADNe</b> .....	<b>50</b>
1. Résumé .....	51
2. Effet de l'espèce, du compartiment génétique et du temps sur la concentration et l'état des particules d'ADNe.....	53
2.1. Abstract .....	54
2.2. Introduction .....	54
2.3. Materials and methods.....	57
2.4. Results.....	64
2.5. Discussion .....	71
2.6. Conclusion .....	75
3. References .....	76

## Chapitre III

<b>Optimisation et test d'un outil d'échantillonnage de l'ADNe : capteurs passifs en hydroxyapatite imprimés en 3D</b> .....	<b>85</b>
1. Résumé .....	87
2. Développement de capteurs passifs en hydroxyapatite pour l'échantillonnage de l'ADNe en milieu aquatique.....	89
2.1. Abstract .....	90
3. Introduction.....	91
3.1. Materials and methods.....	93



3.2. Results.....	104
3.3. Discussion .....	112
3.4. Conclusion.....	116
4. Références .....	117
<b>Chapitre IV</b>	
<b>Applicabilité de l'ADNe pour la bioindication des rivières intermittentes .....</b>	<b>124</b>
1. L'ADNe de macro-invertébrés révèle l'impact d'une pollution en contexte d'intermittence 126	
1.1. Résumé .....	126
1.2. Introduction.....	127
1.3. Matériels et méthodes.....	131
1.4. Résultats.....	139
1.5. Discussion .....	150
1.6. Conclusion.....	156
2. Références .....	157
3. Annexes II.....	165
<b>Chapitre V</b>	
<b>Synthèse des résultats, discussion et perspectives .....</b>	<b>168</b>
1. Synthèse et discussion .....	170
1.1. Interactions complexes entre états, origine et persistance de l'ADNe .....	170
2. Conclusion et recommandations .....	181
3. Perspectives .....	182
3.1. Mieux comprendre les liens entre états, persistance et transport de l'ADNe .....	182
3.2. Voies d'amélioration des capteurs passifs à ADNe .....	183
3.3. Un pas vers la bioindication du futur .....	186
4. Références .....	190
5. Articles annexe III .....	196

# Table des figures

## Chapitre I – Etat de l’art

Figure 1-1 : Schéma conceptuel représentant les principales menaces pesant sur les écosystèmes d'eau douce (Dudgeon, 2019). 5

Figure 1-2 : Schéma reprenant les principales étapes de l’approche morphologique pour la bioindication issue de Pawlowski et al., (2018). 10

Figure 1-3 : Critères utilisés pour définir l’état écologique des masses d'eau. Schéma tiré de @SIAVHY 2022. 11

Figure 2-1 : Schéma conceptuel (a) des types d’ADN, organismal (correspondant à des organismes entiers) et extra-organisme. (b) Distribution de taille des particules d’ADNe capturées par divers outils d’échantillonnage couramment utilisés. 17

Figure 2-2 : Les quatre éléments de l’écologie de l’ADNe tels que définis par Barnes et Turner (2016). (a) représente la production d’ADNe (origine probable et quantité) ; (b) son état dans l’environnement ; (c) sa distance de transport depuis son origine ; et (d) sa persistance. Figure tirée de Barnes et Turner (2016). 18

Figure 2-3 : Principales étapes de l'utilisation de l'ADNe pour la détection de communautés biologiques. Après échantillonnage, l'ADNe est soit extrait directement de la matrice naturelle soit cela nécessite une étape de pré-traitement (e.g. tamisage, filtration). L'ADNe extrait peut être utilisé pour détecter des taxons cibles (qPCR, ddPCR) ou séquencé pour décrire des communautés entières. Ensuite, les données sont nettoyées à l'aide d'un traitement bio-informatique avant d'être analysées. 26

Figure 3-1: Photos de la rivière de l'Albarine (Ain, France) à différents niveaux d'écoulement. Photos : H. Verdier. 31

## Chapitre II - Aspects fondamentaux : production et états de l'ADNe

Figure 2-1: Experimental design 58

Figure 2-2: Number of mt-eDNA and nu-eDNA copies (eDNA copy/L of water in log scale) per species and sampling times (after 7, 14 and 21 days). Each point represents one water sample of one tank. The colours represent a species (orange = *Asellus aquaticus*, purple = *Physa acuta*, blue = *Danio rerio*, green = *Rana ridibunda*). The boxplots with the light grey fill represent mt-DNA and those with the dark grey fill represent nu-DNA. 66

Figure 2-3: Pie chart showing the percentage of eDNA copies per particle size class, per species and per genetic compartment averaged over the three sampling times. 68

Figure 2-4: Frequency of nu-eDNA and mt-eDNA copies per particle size class (< 0.2 to 8 µm), per species and per sampling timing (Time 1,2 and 3). Note: eDNA particle counts have been transformed into frequency to allow a better graphical representation. 69

## Chapitre III - Optimisation et test d’un outil d’échantillonnage de l’ADNe : capteurs passifs en hydroxyapatite imprimés en 3D

Figure 1-1: Schéma présentant une des interactions d'adsorption possible entre l'ADN et l'hydroxyapatite. Figure tirée de Brundin et al., (2013) 88

Figure 3-1 : Images of 3D-printed hydroxyapatite samplers prototype P1 (a) and P2 (b) obtained with a confocal microscope (objective x0.5, LEICA Z16 APO, camera LEICA DMC5400). 94

Figure 3-2: DNA adsorption and desorption protocol. 97

Figure 3-3: Experimental design (experiment 3) testing the efficiency of HAp samplers to recover eDNA from *Asellus aquaticus* in microcosms compared to a conventional sampling method (precipitation). 101

Figure 3-4: (A) experiment 1 layout, (B) electropherograms of the long and short DNA fragments desorbed from the HAp samplers. The most concentrated DNA replicates were selected to get a clearer description of the fragment distribution (P1-B, P1-E, P2-A, P2-D, Table 2). As standards, the curves 1 and 4 represent the profile of the initial DNA markers. The horizontal axis represents the size of DNA fragments in bp, and the vertical axis represents fluorescence. The left-most (1 bp) and right-most (20 000 bp) peaks are internal markers. 106

Figure 3-5: Percentage of DNA recovered by two prototypes (P1 and P2) of HAp samplers in three consecutive experiments (A, B and C). Five P1 and 25 P2 samplers are sorted according to their DNA recovery variance. Samplers that recovered no DNA are in the red box. 108

Figure 3-6: Relationship between DNA desorbed from HAp samplers and residual DNA in supernatants (%) in three consecutive experiments (A, B and C). The lines connect the same sampler used in experiments B and C. 109

Figure 3-7: Number of copies (in log scale) of *A. aquaticus* 16S rDNA recovered by the two HAp prototypes (P1 = triangle, P2 = circle) and in precipitated water samples (blue triangle) after 24 hours of incubation in microcosm containing *A. aquaticus* genomic DNA u 110

Figure 3-8: Number of copies of *A. aquaticus* eDNA recovered from HAp samplers P2 (orange triangles) and in 1 L filtered water samples (blue circles). Sampling locations in the pond are ranging from S1 to S9. Each point represents the average number of DNA copies over three qPCR measurements per sample, and the vertical bar represents the lowest and highest estimates. 111

#### **Chapitre IV- Applicabilité de l'ADNe pour la bioindication des rivières intermittentes**

Figure 1-1 : (A) Localisation de la rivière de l'Albarine, (B) carte du bassin versant de l'Albarine montrant la section pérenne (remplissage blanc) et la section intermittente (remplissage rose) ainsi que les 6 sites d'échantillonnages (ronds = sites de référence, triangles = sites pollués) distribués le long du gradient d'intermittence (PR = Pérenne, MI = Moyennement Intermittente, FI = Fortement Intermittente). 132

Figure 1- 2: Diagrammes circulaires comparant l'abondance relative (en %) des communautés d'invertébrés benthiques (au niveau de l'ordre) entre l'approche morphologique et l'échantillonnage de l'ADNe à travers différentes matrices. 141

Figure 1-3 : Diagramme de Venn représentant le nombre de familles détectées par la morphologie et les quatre matrices ADNe. 142

Figure 1-4 : Heatmap comparant les familles détectées par l'approche morphologique et par l'ADNe issus des différentes matrices (eau, sédiments, biofilms, capteurs) au rang de la famille. Les cases blanches sont synonymes d'une abondance égale à zéro. Pour alléger la représentation, seules les familles avec une abondance relative supérieures à 0.001% sont représentées. Les familles présentant une abondance relative inférieure à 0.0001% sont disponibles en annexes. 143

Figure 1-5 : (a) Nombre de taxons observés et (b) nombre d'ASVs dans les sites de référence (REF) et pollués (P) par les effluents de station d'épuration, selon trois niveaux d'écoulement de la rivière (PR= Pérenne, MI = Moyennement Intermittente, FI = Fortement Intermittente) et par méthode d'échantillonnage. Les p-values sont celles associées aux tests post-hoc comparant la richesse taxonomique entre les sites de référence et les sites pollués. \* indique p-value < 0,001 ; \*\* indique  $0,001 \leq p\text{-value} < 0,1$  ; \* indique  $0,1 \leq p\text{-value} < 0,5$  ; ns indique p-value  $\geq 0,5$ ). 145

Figure 1-6 : Analyse NMDS, basée sur une matrice de distance de Bray-Curtis, des communautés d'invertébrés sur les sites de référence (cercles) et pollués (triangles) selon trois niveaux d'écoulement de la rivière (PR = Pérenne, MI = Moyennement Intermittent, FI = Fortement Intermittent), pour l'approche morphologie et les méthodes basées sur l'ADNe (filtres, biofilms, sédiments). Les ellipses indiquent le niveau de confiance à 95 % basé sur le centroïde calculé pour chaque zone (PR, MI et FI). 147

## Annexes II

Figure 3-1: Courbe de raréfaction sur les données brutes issus du séquençage ; pour chaque échantillon selon les matrices d'échantillonnage utilisées (rouge = eau, vert = capteurs, bleu = sédiments, noir = biofilms). 164

Figure 3-2 : Heatmap comparant les familles détectées par l'approche morphologique et par l'ADNe issus des différentes matrices (eau, sédiments, biofilms, capteurs) au rang de la famille (abondance supérieure à 0.0001%). 165

# Table des tableaux

## Chapitre I – Etat de l’art

Tableau 6-1: Indices biotiques utilisés pour la bioindication. .... 48

## Chapitre II - Aspects fondamentaux : production et états de l'ADNe

Tableau 2-1 :Species-specific primers sets for amplification of 16S and ITS2 gene in qPCR.....61

Tableau 2-2: Results of the LMM model testing the effect of species, genetic compartment and sampling time on the global eDNA production per species and genetic marker (after log10 transformation). *Note:* Species, genetic compartment and time were added as fixed effects while the tank replicates were added as random effects. The model intercept is the species *Asellus aquaticus*, mt-eDNA and sampling time at 7 days. p-values below 5% are in bold.. 67

Tableau 2-3 : Effects of taxa, genetic marker, sampling time and their interactions on the probability that eDNA particles belong to a size fraction given by the multinomial model. The reported coefficients are log odds, i.e. the relative probability that a particle falls into a given size fraction compared to the baseline size fraction which is here the first size fraction ( $f_1$ ,  $< 0.2 \mu\text{m}$ ). The independent variables are species, marker, and time. The intercept model is fit for *Danio rerio* (danio), the mitochondrial particles (mito) and for the first sampling time ( $t_0$ ). The impact of a change in an independent variable is then given by its influence on the log odds, its significance (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ ), and its standard error in parenthesis. For example, the odds of a mitochondrial zebrafish particle at  $t_0$  to fall in the second fraction ( $f_2$ ) relative to  $f_1$  is  $\exp(0.112)=1.12$ ; it is therefore about as likely to sample a  $f_1$  than a  $f_2$  particle. If we switch to *Asellus*, the same odds now becomes  $\exp(0.112+3.674)=44.08$ ; it is now much more likely to sample a  $f_2$  than a  $f_1$  particule, with this time a highly significant parameter. If two different parameters are changed compared to the intercept levels, it is than necessary to also include their interactions..... 70

## Chapitre III - Optimisation et test d’un outil d’échantillonnage de l’ADNe : capteurs passifs en hydroxyapatite imprimés en 3D

Tableau 3-1: Process parameters for debinding HAp samplers..... 95

Tableau 3-2: DNA concentration in supernatants and recovered from six P1 and six P2 HAp samplers (three replicates per marker solution) measured by QuBit ®..... 105

## Chapitre IV- Applicabilité de l'ADNe pour la bioindication des rivières intermittentes

Tableau 1-1 : Caractéristiques des stations d'épuration ..... 133

Tableau 1-2 : Résultats des analyses physico-chimiques réalisées sur les 6 sites de prélèvements de la rivière (PR = Pérenne, MI = Moyennement Intermittente, FI = Fortement Intermittente, REF = site de référence, P = site impacté par les effluents de station d'épuration. .... 140

Tableau 1-3 : Effet de la pollution et de la permanence d'écoulement sur les métriques de diversité- $\alpha$  (ANOVA à deux facteurs) par méthode d'échantillonnage. Les p-values significatives sont indiquées en gras. .... 146

Tableau 1-4 : Analyse PERMANOVA testant la différence de structure des communautés mises en évidence avec les NMDS, entre les sites de référence et les sites pollués, par niveau d'écoulement et par méthode d'échantillonnage. Les p-values significatives sont en gras. 149

Tableau 3-1 : Tableau présentant les 10 taxons contribuant le plus à la dissimilarité entre les sites de référence et pollués sur les trois zones de la rivière présentant différents degrés d'intermittence (FI = Fortement Intermittente, MI = Moyennement Intermittente, PR = Pérenne)  
..... 167

# Chapitre I

## État de l'art

---

Depuis l'aube de l'humanité, les écosystèmes d'eau douce sont exploités et transformés pour procurer nourriture, transport et loisirs (Häder et al., 2020). En exploitant cette ressource rare et précieuse, les humains ont fortement dégradé la composition (géo)morphologique, chimique et biologique des milieux aquatiques. Les impacts négatifs des activités humaines se sont surtout manifestés à la fin de l'Holocène, principalement en raison de l'industrialisation, du développement de l'agriculture intensive et de la croissance démographique. Depuis, les activités humaines se sont intensifiées et diversifiées en impactant toujours plus sévèrement les milieux aquatiques (Reid et al., 2019), et ce dans un contexte global de changement climatique. Si bien qu'aujourd'hui, aucun écosystème n'est considéré comme exempt de perturbations (Halpern et al., 2008; Vitousek et al., 1997). Évaluer la qualité des écosystèmes et maintenir la ressource en eau, sans en affecter la biodiversité, sont des enjeux de premier ordre.



# 1. Écosystèmes d'eau douce : menaces et enjeux de gestion

## 1.1. Une ressource sous pressions

Sur le volume total de l'eau sur Terre (soit 1,386,000,000 kilomètres cubes), les écosystèmes d'eau douce en représentent seulement 2 % dont les 2/3 sont présents sous formes de glace et de neige permanentes. En définitive, seulement 0,01 % de l'eau douce liquide est contenue dans les lacs, les rivières et les zones humides (Postel et Carpenter, 1997). Malgré leur représentation pour le moins marginale à l'échelle planétaire, les écosystèmes d'eau douce abritent environ 10 % de la biodiversité décrite à ce jour (Balian, 2008; Kopf et al., 2015). Ceci les place parmi les milieux les plus diversifiés par unité de volume d'habitat sur Terre. Les écosystèmes d'eau douce jouent un rôle clé dans le cycle de l'eau et des nutriments (Wetzel, 2001). De plus, ces écosystèmes et leur biodiversité fournissent des biens et des services irremplaçables à la société incluant des services d'approvisionnement (i.e. alimentaires, matériaux, pharmaceutiques), des services de régulation (i.e. pollinisation, régulation de l'érosion, du climat et de la qualité de l'eau) et des services culturels (i.e. loisirs, valeurs éducatives, scientifiques et artistiques) (UICN, 2013). Malgré leur importance, les milieux aquatiques figurent parmi les écosystèmes les plus menacés en termes de dégradation et de perte de la biodiversité (Dudgeon, 2019).

Les activités humaines sont à l'origine de nombreuses perturbations se traduisant par des effets délétères et difficilement réversibles sur les milieux aquatiques (Dudgeon, 2019; Vörösmarty et al., 2010). Ces perturbations, pouvant se cumuler et interagir entre elles, peuvent être classées en trois grandes catégories : la **pollution**, les **altérations physiques** ou **hydromorphologiques** et **l'invasion d'espèces exotiques et envahissantes**. En Europe, le développement de l'industrie, de l'agriculture intensive et les rejets de stations d'épuration ont été, et sont encore, à l'origine d'une **pollution chimique** importante (Qadri & Faid, 2020). Chaque année dans le monde, ce sont plusieurs millions de tonnes de substances chimiques qui sont déversées dans les eaux douces (Schwarzenbach et al., 2006). Parmi ces substances on trouve majoritairement des composés organiques (e.g. pesticides, résidus médicamenteux) et inorganiques (métaux lourds, PCB), des nutriments (e.g. nitrates, phosphore), des matières en suspension et des organismes pathogènes (e.g. virus, bactéries).

**L'eutrophisation** (accumulation de nutriments conduisant à la prolifération d'algues parfois toxiques) est une des conséquences de l'excès de pollution et entraîne régulièrement des mortalités massives de poissons et d'invertébrés (Smith, 2003). En parallèle, les nombreux aménagements et installations pour contrôler le débit et la géométrie des cours d'eau (e.g. artificialisation des berges, modifications des régimes hydrologiques, extraction de granulats) ont fortement altéré les **conditions hydromorphologiques** des eaux douces (Elosegi & Sabater, 2013). Par exemple, les modifications de la forme des cours d'eau (e.g. chenalisation) ont homogénéisé les habitats et sont à l'origine d'une perte de diversité faunistique et floristique importante (Wasson et al., 1998). D'autre part, les ouvrages tels que les barrages et les seuils modifient l'écoulement des eaux et entravent la migration des organismes vivants, et sont particulièrement visibles sur la faune piscicole (Søndergaard & Jeppesen, 2007).

Une autre conséquence de ces aménagements, couplée à l'exploitation de la ressource en eau elle-même, conduit à des **modifications importantes du régime d'écoulement** des cours d'eau. Certains des plus grands fleuves du monde sont maintenant à sec pendant une partie de l'année ou sont susceptibles de l'être (Postel & Richter, 2003). En France en 2022, 45 % des cours d'eau étaient complètement asséchés pendant la période estivale (Observatoire national des étiages, 2022). Ces altérations de débit sont susceptibles d'être exacerbées par le changement climatique global, car on peut s'attendre à une plus grande fréquence des inondations et des sécheresses. Les habitats aquatiques ainsi modifiés ou dégradés par les humains peuvent faciliter, en partie, **l'invasion d'espèces exotiques et envahissantes** en plus des introductions volontaires (e.g. commerce, aquaculture) et involontaires (e.g. tourisme) (Bunn & Arthington, 2002; Koehn & MacKenzie, 2004). Les exemples dramatiques des impacts de ces espèces sont nombreux : la perte des écrevisses à pattes blanches en Europe, des salmonidés dans les lacs et les cours d'eau de l'hémisphère Sud (Rahel, 2004).

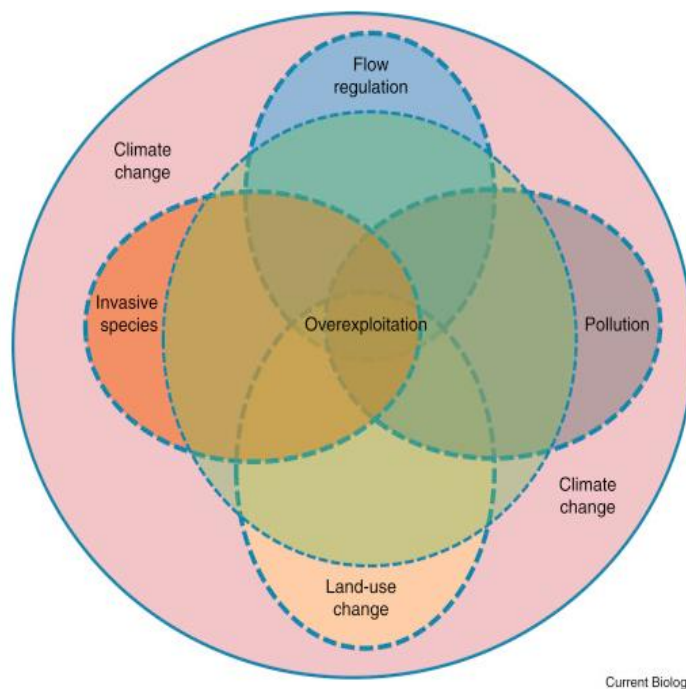


Figure 1-1 : Schéma conceptuel représentant les principales menaces pesant sur les écosystèmes d'eau douce (Dudgeon, 2019).

L'ensemble de ces facteurs a profondément dégradé et fragilisé les hydrosystèmes ainsi que les communautés biologiques qui les peuplent (Reyjol & Spyrtos, 2013). Des études indiquent que le déclin des animaux d'eau douce est deux fois plus rapide que celui de leurs homologues terrestres (Dudgeon, 2010; Ormerod et al., 2010). Dans les régions développées, plus d'un tiers des espèces des principaux groupes d'animaux sont menacées, dont 38 % des espèces de poissons en Europe et 39% en Amérique du Nord (Dudgeon, 2019). Dans le groupe des amphibiens, ce sont près de 32 % des espèces qui sont menacées d'extinction et 168 espèces qui pourraient déjà être éteintes (AmphibiaWeb, 2022).

Au vu de ces constats alarmants, le rétablissement de la qualité des eaux et la surveillance de l'état des écosystèmes est devenu un enjeu majeur. En France et en Europe, des politiques de gestion ont été mises en place afin d'en réduire les sources de dégradation et protéger les écosystèmes d'eau douce face aux menaces qui les incombent.

### 1.2. Politiques de gestion de l'eau

La prise de conscience de notre impact sur les écosystèmes aquatiques et sa traduction en cadre réglementaire est relativement récente. La première loi sur l'eau en France date de 1964 (Loi sur l'Eau n° 64-1245 du 16 décembre 1964). Action pionnière de l'État en matière de protection de l'environnement, elle pose le principe d'une gestion des écosystèmes d'eaux douces par bassins versants, rattachés aux principaux fleuves français (Ministère de la Transition Écologique et de la Cohésion des territoires, 2021). Elle introduit également le principe du « pollueur-payeur » afin de lutter contre la pollution des eaux. À partir des années 1990, les mesures environnementales se renforcent et donnent naissance à une deuxième loi qui concilie développement économique et gestion qualitative de l'eau. L'eau est reconnue comme « patrimoine commun de la Nation », et sa gestion est maintenant conduite à l'échelle européenne. À cette période, les investissements portent principalement sur les aménagements et les technologies de traitement de l'eau en vue d'améliorer sa qualité. Cependant, l'unique prise en compte de la composition chimique de l'eau ne suffit pas à garantir la durabilité et la qualité de la ressource en eau. De ce constat, est née la Directive Européenne Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE), qui place la **qualité écologique** et le **fonctionnement biologique** des écosystèmes au centre des réglementations.

### 1.3. Objectifs de la Directive Cadre sur l'Eau

Pour lutter contre la dégradation des milieux aquatiques, la Directive Cadre sur l'eau (DCE, 2000/60/CE) engage les États membres à une reconquête de la qualité de l'eau et des écosystèmes. Elle impose l'atteinte du « bon état » général de l'ensemble des masses d'eau (i.e. eaux superficielles et souterraines, eaux de transition et eaux côtières), soit atteindre une qualité équivalente à un écosystème faiblement altéré par les activités anthropiques (un écosystème de référence). Pour cela, une évaluation précise est nécessaire et fait partie des programmes de surveillance environnementale. Celle-ci est réalisée par le biais d'une caractérisation des **communautés biologiques**, aussi appelée **bioindication**, et la prise en compte des conditions **physico-chimiques** et **hydromorphologiques** des masses d'eau. Parmi ces paramètres, la bioindication est le pilier central dont les méthodes sont aujourd'hui normalisées et bien intégrées à la réglementation.

## 1.4. Évaluer l'état écologique par la bioindication

### 1.4.1. Notions de bioindication et bioindicateurs

La bioindication repose sur l'idée que les caractéristiques des organismes vivants dans un écosystème sont le meilleur reflet de l'état de santé de celui-ci (Blandin, 1986). En effet, certains organismes vivants sont extrêmement sensibles, ou à l'inverse tolérants, aux variations et altérations de leur environnement, qu'elles soient chimiques, physiques ou hydromorphologiques. La bioindication consiste à inventorier certains organismes ou groupes d'organismes, appelés « **bioindicateurs** » capables de refléter l'état d'un milieu et de retranscrire l'impact de perturbations. Contrairement aux mesures chimiques et hydrologiques qui fournissent une vision instantanée de la qualité du milieu, les bioindicateurs intègrent des phénomènes intervenant à différentes échelles de temps et d'espace (Markert et al., 2003). Par exemple, ils peuvent révéler la présence d'une pollution, même s'il n'y a pas de rejet de polluants au moment de l'échantillonnage (Hynes, 1960). Ils renseignent la présence d'une perturbation par divers processus biologiques tels que l'accumulation de substances chimiques dans les tissus, la perturbation du cycle de reproduction ou du comportement, ou encore des modifications de la composition et de la structure de communautés entières. Un bioindicateur peut donc être utilisé à différents niveaux d'organisation : **molécule, cellule, individu, population, communauté ou biocénose** (Niemi & McDonald, 2004).

La **communauté** est le niveau biologique retenu par la réglementation de la DCE pour l'évaluation de l'état écologique des masses d'eau. Une communauté peut être définie comme un ensemble de populations qui coexistent et interagissent entre elles dans un espace et un temps donné (Lawton, 1999). Cette échelle semble la plus pertinente pour mettre en évidence l'impact d'activités humaines et ainsi d'inférer l'état global de l'écosystème (Attrill & Depledge, 1997; Clements, 1994). Les fondements théoriques de cette approche sont intimement liés à l'écologie des communautés et à la notion de niche écologique. Brièvement, ce concept suppose que la composition et la structure des communautés sont en équilibre avec les conditions de leur environnement. Selon leurs traits, leur histoire de vie et leurs préférences écologiques, les organismes sont adaptés à une certaine gamme de variation des conditions de leur milieu (Suding et al., 2004).

Par conséquent, si une perturbation d'origine anthropique (e.g. pollutions, barrages) ou naturelle (e.g. crue) fait varier les conditions environnementales au-delà de l'amplitude auxquelles les organismes sont adaptés, les effets seront mesurables sur leurs caractéristiques telles que leur abondance et leur diversité (Marzin, 2013). En pratique, il est difficile, voire impossible, de caractériser une communauté de manière exhaustive. Pour cette raison, nous nous intéressons généralement à de grands **groupes taxonomiques** formant des **assemblages pluri-spécifiques**, le plus souvent situés à des niveaux clés dans le réseau trophique. Toutefois, le terme de « communauté » est couramment utilisé dans la littérature pour se référer à ces assemblages.

### Encadré 1 : Caractéristiques d'un bioindicateur

Idéalement, un bon bioindicateur présente les caractéristiques suivantes : 1) facile à identifier, 2) une distribution ubiquiste, 3) une faible mobilité (i.e. indication locale), 4) des caractéristiques écologiques bien documentées, 5) être abondant, 6) facile à manipuler en laboratoire, 7) une grande sensibilité au(x) facteur(s) de stress environnemental(aux).

### 1.4.2. Les bioindicateurs réglementaires

Dans le cadre des suivis réglementés par la DCE, **cinq communautés biologiques** (nommées Éléments de Qualité Biologique, EQBs) sont utilisées pour rendre compte de l'état écologique des différentes masses d'eau et/ou déceler l'impact d'une perturbation : **les diatomées, les macroinvertébrés benthiques, l'ichtyofaune, les macrophytes et le phytoplancton**. Le choix d'un ou plusieurs de ces groupes dépend de l'objectif et du type de masse d'eau à évaluer. Néanmoins, les trois premiers groupes cités sont les plus couramment utilisés et seront détaillés ci-après. Ces groupes bioindicateurs présentent des cycles de vie plus ou moins longs et des sensibilités différentes aux conditions de leur environnement. Ainsi, ils offrent des informations complémentaires sur les effets des perturbations, et ce, sur différentes échelles de temps.

Les **diatomées**, algues brunes microscopiques (5 à 500 µm), sont particulièrement sensibles à la qualité physico-chimique et rendent compte de la qualité générale de l'eau et du niveau d'eutrophisation à court terme. Les **macroinvertébrés** sont des organismes dépourvus de vertèbres, visibles à l'œil nu, peuplant le fond des eaux douces. Les macro-invertébrés sont fréquemment utilisés en bioindication, car ils couvrent une grande diversité physiologique et comportementale. Ils sont sensibles à l'enrichissement en matière organique et en métaux lourds, à court et moyen terme. Peu mobiles, les macroinvertébrés renseignent également sur les conditions locales de l'habitat. **L'ichtyofaune** - ensemble des espèces de poissons formant un peuplement - est davantage sensible aux modifications hydromorphologiques (e.g. présence de barrage empêchant la migration de certains poissons, Van Looy et al., 2014) et à la qualité physico-chimique des milieux (e.g. désoxygénation de l'eau). Bien que les groupes de bioindicateurs soient souvent utilisés seuls pour des raisons économiques, des approches multi-indicateurs sont vivement encouragées par les législations (DCE, voir aussi Reyjol et al., 2011).

### Encadré 2 : Controverse sur les termes « macro-invertébrés » et « poissons »

Il est important de mentionner que les termes de macroinvertébrés et poissons sont, d'un point de vue phylogénétique, inappropriés. En effet, ce sont des groupes paraphylétiques très hétéroclites. Les macro-invertébrés benthiques au sens de la bioindication désignent, peut-être abusivement, la « faune dépourvue de vertèbres visibles à l'œil peuplant le benthos ». Les poissons quant à eux regroupent à la fois les Agnathes, les Chondrichthyens, les Dipneustes et les Actinoptérygiens. Par souci de clarté, je garderais les termes de **macroinvertébrés** et **poissons** en faisant référence aux organismes ciblés par la bioindication, bien qu'ils soient sujets à controverse. Dans ce manuscrit, les macro-invertébrés regroupent tous les organismes de tailles supérieures à 500 µm présents dans le benthos (Tachet et al. 2002) et les poissons désignent les téléostéens, c'est-à-dire une sous-classe des Actinoptérygiens à laquelle appartient la quasi-totalité des poissons communs (99,8 %).

### 1.4.3. Principe et diversité des indices biotiques

Une fois les organismes bioindicateurs capturés et identifiés, des listes de taxons et leur abondance associée sont établies. Ces listes taxonomiques permettent de calculer des **indices biotiques** à partir des métriques telles que l'occurrence, l'abondance et la diversité des taxons. Ces indices permettent de donner une note de qualité du milieu, simple et compréhensible. Depuis la mise au point du premier indice biotique basé sur les exigences des espèces aux pollutions organiques, appelé système saprobique (Kolkwitz & Marsson), de nombreux indices biotiques ont été développés dans les différents pays pour évaluer les écosystèmes d'eau douce (Birk et al., 2012).

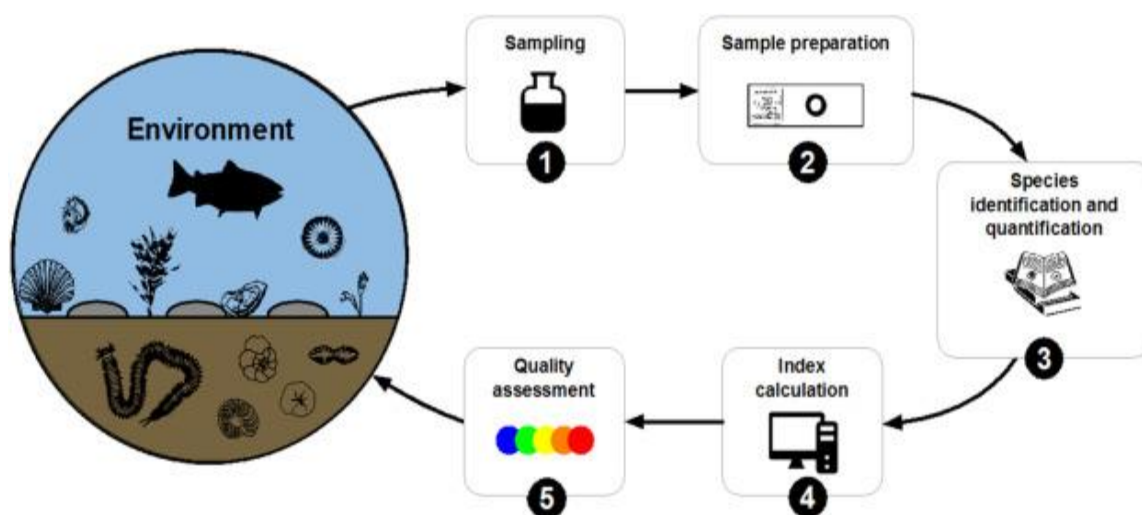


Figure 1-2 : schéma reprenant les principales étapes de l'approche morphologique pour la bioindication issue de Pawlowski et al., (2018).

On retrouve des **indices univariés** (utilisant des métriques simples à l'inverse des indices multivariés, ou multimétriques) souvent basés sur la richesse ou l'abondance des organismes (e.g., Indice de Shannon-Winner, Shannon, 1948; indice d'Evenness, Pielou, 1966; richesse des Ephemeroptères, Plécoptères et Trichoptères), **des indices de polluo-sensibilité** (e.g. IPS; Coste et al., 2005), et plus récemment développés des **indices multimétriques** intégrant les traits fonctionnels des organismes tels que la capacité de se reproduire rapidement face aux conditions changeantes ou de protéger sa progéniture (e.g., I2M2; Mondy et al., 2012; IPR+, Indice Poisson Rivière; Marzin et al., 2014). Ces derniers représentent une avancée majeure dans la prise en compte de l'écosystème dans sa globalité en améliorant significativement la sensibilité des indices aux différentes perturbations.



Actuellement en France, les indices biotiques utilisés pour la surveillance de la qualité écologique des eaux douces sont : **I2M2** pour les macro-invertébrés, **IBD** pour les diatomées, **IPR** pour les poissons et **IBMR** pour les macrophytes. Le tableau 6-1 en annexes résume les indices utilisés actuellement. Une fois calculés, les indices sont comparés à des indices établis à partir d'**écosystèmes dits de « référence »**, correspondant à des milieux aquatiques pas ou peu dégradés. C'est cet **écart** entre l'indice calculé et l'indice de référence qui est utilisé pour attribuer une note de qualité et classer les écosystèmes en 5 catégories d'état écologique allant de « mauvais » à « très bon ». L'état écologique global du cours d'eau est ensuite calculé en considérant à la fois l'état biologique, chimique et physico-chimique (Figure 1-3).

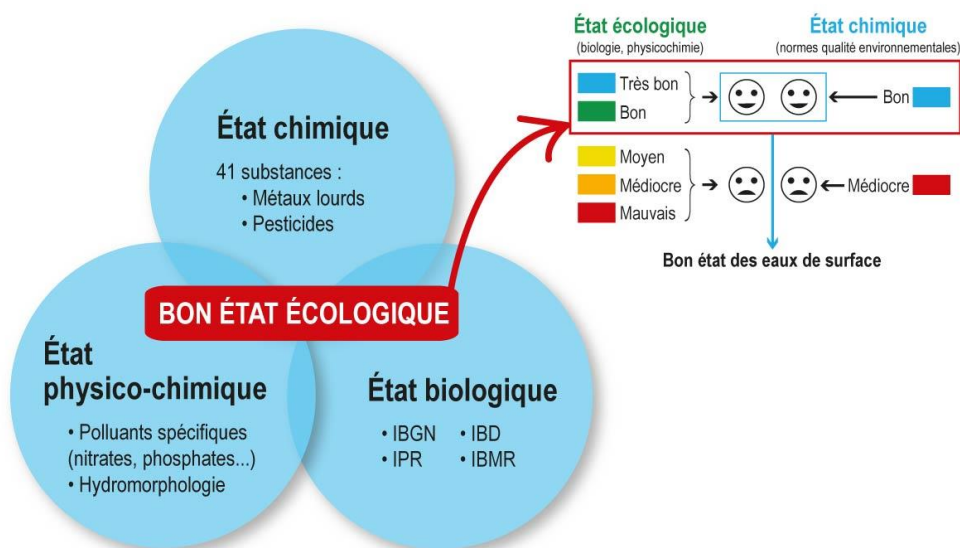


Figure 1-3 : Critères utilisés pour définir l'état écologique des masses d'eau. Schéma tiré de @SIAVHY 2022.

## 1.5. Utilisation et limites des outils de bioindication actuels

### 1.5.1. Approche morphologique

Quel que soit le groupe bioindicateur ciblé, l'évaluation de la qualité écologique d'un milieu requiert : i) la capture ou le prélèvement des organismes vivants, ii) la préservation et/ou le tri des spécimens si nécessaire, iii) l'identification des taxons à partir de leurs traits morphologiques et iv) le calcul d'un indice de qualité par rapport à un écosystème de référence. Bien que des efforts conséquents aient été réalisés pour standardiser et améliorer cette approche (appelée **approche morphologique** ci-après), **de fortes contraintes méthodologiques limitent sa fiabilité et son échelle d'application à l'ensemble des écosystèmes**. En plus du coût élevé et de l'aspect fastidieux et chronophage souvent utilisés comme arguments pour se tourner vers d'autres méthodes, les principales limites sont associées à la capture et l'identification des organismes.

- 1- **Capture ou prélèvement des organismes : des protocoles invasifs et inaplicable dans certains écosystèmes.** Afin d'être identifiés, les organismes vivants sont échantillonnés en utilisant des méthodes de capture dites invasives, c'est-à-dire entraînant des blessures (e.g. pêche électrique pour les poissons) ou la mort (e.g. macro-invertébrés prélevés au filet surber). D'autre part, les protocoles d'échantillonnage sont applicables uniquement à une certaine typologie d'écosystèmes : des milieux entièrement prospectables à pied, présentant un écoulement permanent et une faible hauteur d'eau (AFNOR, 2016). Ainsi, les milieux sortant de ce cadre comme les cours d'eau larges et profonds, les milieux souterrains, les rivières intermittentes (qui peuvent s'assécher sur une longue période pendant l'année ; 25 à 40 % du linéaire Snelder et al., 2013), les mares temporaires et les zones de transition sont souvent exclus des suivis de bioindication. Ceci s'explique, d'une part, par le fait que l'accès à la biodiversité de ces milieux peut être limité, voire même impossible. D'autre part, les organismes peuplant ces écosystèmes particuliers (i.e. milieux souterrains), peuvent être très différents de ceux retrouvés dans les écosystèmes suivis en routine en bioindication, incitant ainsi à développer des méthodes d'échantillonnage et des indices biotiques adaptés à ce type de milieu.

- 2- Identification taxonomique des organismes : un processus complexe associé à une expertise de plus en plus rare.** Certains groupes biologiques, comme les macro-invertébrés et les diatomées, renferment de très nombreuses espèces (par exemple plus de 7000 espèces de diatomées) présentant une grande diversité de traits morphologiques. Ainsi, leur identification repose sur une expertise taxonomique élevée, qui devient malheureusement de plus en plus rare avec la diminution du nombre de taxonomistes spécialistes. D'autre part, en prenant l'exemple des macro-invertébrés, des organismes peuvent être mis de côté où identifier à des niveaux taxonomiques grossiers (i.e.famille) car trop difficiles à identifier, trop petits, endommagés ou encore sous formes larvaires. Bien que la plupart du temps, une résolution taxonomique au rang de la famille soit suffisante pour détecter l'impact d'une pression anthropique, il semblerait que dans des écosystèmes présentant de multiples stress ou des conditions instables, il ne permette pas de décrire avec précisions les réponses des communautés biologiques aux stress cumulatifs (e.g. pollution et stress hydrologique, Poikane et al., 2020, Soria et al., 2020). Par exemple, certains macroinvertébrés comme les larves de Chironomidae sont très difficiles à déterminer aux niveaux inférieurs à la famille et représentent souvent un unique taxon dans les inventaires. Pourtant, des études mettent en avant le potentiel de ces organismes à retranscrire différents facteurs de stress (e.g. pollution, Cañedo-Argüelles et al., 2016) lorsque ceux-ci sont déterminés à l'espèce. Dans certains cas, une résolution taxonomique plus fine permettrait une détection plus fiable des stress naturels et/ou anthropiques.

### 1.5.2. Approche d'identification moléculaire

Ces contraintes méthodologiques, associées à leur cout élevé et leur aspect chronophage, ont poussé au **développement de méthodes alternatives**, notamment basées sur des **outils moléculaires pour s'affranchir de l'étape d'identification et obtenir une résolution taxonomique plus fine**. Ainsi, l'ère du moléculaire a d'ores et déjà initié un tournant pour le suivi des communautés bioindicatrices (Baird & Hajibabaei, 2012). Une des avancées majeures réside dans la possibilité d'identifier et d'inventorier les organismes non plus à partir de leurs traits morphologiques, mais à partir de leur ADN (Hebert et al., 2003).

Chez les êtres vivants, certaines régions de l'ADN présentent de faibles variations entre individus d'une même espèce, alors qu'elles sont élevées entre espèces. C'est le cas de certaines régions de l'ADN comme sur le gène COI pour les animaux, les gènes *rbcL* et *matK* pour les embryophytes (CBOL Plant Working Group 2009), et *ITS* pour les champignons (Nilsson et al., 2009). L'utilisation d'un court fragment d'ADN de ces gènes, appelé marqueur génétique ou « barcode », permet de déterminer rapidement et avec précision l'espèce dont il est issu. Cette approche est connue sous le nom de barcoding. L'émergence des technologies de Séquençage Haut Débit (HTS, Margulies et al., 2005) a rendu possible le passage de l'identification d'un seul organisme (barcoding) à l'identification de multiples organismes en un seul évènement de séquençage (metabarcoding), à partir de l'ADN extrait d'un mélange d'organismes ou de communautés prélevées dans l'environnement. Ainsi, les premiers développements du metabarcoding pour la bioindication ont été réalisés sur l'ADN de communautés bioindicatrices prélevées *in situ* ou communautés « bulk » (macroinvertébrés : Hajibabaei et al., 2011, diatomées : Kermarrec et al., 2014). Cette approche consiste à capturer les organismes dans l'environnement, les broyer pour les macroinvertébrés ou les fixer dans l'éthanol pour les diatomées, à extraire l'ADN à partir du mélange d'organismes obtenus puis à séquencer l'ADN. De par sa rapidité de mise en œuvre, son coût réduit et la congruence avec les inventaires morphologiques, l'identification moléculaire des bioindicateurs a ouvert la voie de la « Bioindication du futur ». Dans cette optique, les travaux sur les diatomées sont les plus avancés. Un indice diatomique moléculaire a déjà intégré la réglementation en Angleterre, et a été étendu à l'échelle d'un réseau de surveillance DCE en France (Vasselon, 2017).

Bien que les approches moléculaires aient permis de s'affranchir de l'étape d'identification en apportant une résolution taxonomique fine et une rapidité de mise en œuvre, elles ne permettent pas de s'affranchir des limites liées à la capture des organismes. Elles restent **invasives et inapplicables dans les écosystèmes complexes, dynamiques ou présentant des conditions et/ou une biodiversité particulière** (e.g. rivières intermittentes, milieux souterrains). Cependant, ces milieux subissent également des pressions grandissantes, au même titre que ceux suivis en routine pour la bioindication. Ainsi, développer des méthodes pour déceler l'impact de perturbation et évaluer leur état écologique fait partie des 10 axes de recherche majeurs pour l'amélioration de la bioindication (Reyjol et al., 2014). L'usage de l'**ADN environnemental** (ADNe) semble particulièrement pertinent pour remplir cet objectif et sera testé dans le cadre de cette thèse.

## 2. L'ADN environnemental : une alternative pour la bioindication des milieux complexes ?

Une nouvelle avancée permet d'analyser l'ADN directement libéré par les organismes dans le milieu pour les inventorier, sans les capturer ni même les observer : l'**ADN environnemental** ou **ADNe**. Ces quinze dernières années, l'utilisation de l'ADNe pour étudier la biodiversité a suscité un immense intérêt (Beng & Corlett, 2020; Bohmann et al., 2014; Deiner et al., 2017). Les organismes laissent des traces d'ADN dans leur milieu sous différentes formes, telles que des cellules, des morceaux de tissus, des fèces ou encore du mucus. Ce matériel génétique diffuse dans les différents compartiments de l'écosystème, et peut être extrait directement à partir d'échantillons environnementaux. Ces échantillons peuvent être extrêmement variés et incluent notamment l'eau (Lodge et al., 2012; Thomsen et al., 2012), les sédiments (Turner et al., 2015), les biofilms épilithiques (Rivera et al., 2021) ou encore l'air (Clare et al., 2021). Après la collecte de cet ADN par différentes méthodes (e.g. filtration d'eau, ou extraction directe à partir de sédiments) et son analyse, il est alors possible d'obtenir des mesures (présence/absence ou quantité d'ADN) sur des espèces cibles ou même des communautés entières *via* un certain nombre de protocoles de laboratoire qui seront détaillés ci-après. En surmontant à la fois les limites liées à la capture et à l'identification morphologique des organismes imposées par les méthodes de bioindication actuelles, l'échantillonnage et l'analyse de l'ADNe permettraient d'inventorier les communautés biologiques des milieux difficiles d'accès ou présentant de multiples pressions, dans lesquels il n'existe pas à ce jour de protocole standardisé de bioindication. Au-delà d'une application à la bioindication, l'échantillonnage de l'ADNe peut être appliqué dans des domaines extrêmement variés comme la conservation, la paléo-écologie ou encore l'étude des relations trophiques. Deux exemples d'application sont présentés en annexe III.

Les sections qui suivent présentent tout d'abord le terme d'ADNe et son origine, ainsi que les aspects fondamentaux liés à leur production et leur dynamique dans un écosystème aquatique. Dans un deuxième temps, les étapes clés de l'utilisation de l'ADNe seront présentées à savoir l'échantillonnage et les principales méthodes de détection des taxons aquatiques.

## 2.1. Contradictions dans l'utilisation du terme d'ADNe

Avant de présenter les caractéristiques de l'ADNe, il est nécessaire de souligner les contradictions de l'usage de l'acronyme « ADNe », et le cadre dans lequel il est utilisé dans cette thèse. Le terme d'ADNe n'est pas si récent puisqu'il a été premièrement employé dans les années 1980 en microbiologie, pour caractériser les communautés bactériennes à partir d'échantillons de sols (Ogram et al., 1987; Steffan et al., 1988). En 2008, les recherches de Ficetola et al., initient un tournant dans l'utilisation de l'ADNe. Pour la première fois, l'analyse de l'ADNe est utilisée pour la détection d'un métazoaire à partir d'échantillons d'eau : un amphibien invasif (*Rana catesbeiana*). À cette époque-là, le terme d'ADNe est employé dans un sens très large : il correspond à tout type de matériel génétique provenant d'un échantillon environnemental (e.g. eau, sédiments, fèces, air, sol, neige). Dans de tels échantillons, plusieurs sources d'ADN peuvent être retrouvées : à la fois des micro-organismes entiers invisibles à l'œil nu (e.g. bactéries, diatomées), et des ADN dérivés de macro-organismes (e.g. tissus, cellules ; Figure 2-1). Les années suivantes, l'utilisation massive de l'ADNe pour la détection de métazoaires a conduit certaines auteur.ices à considérer l'ADNe comme l'ADN dérivé de macro-organismes uniquement, nommé « ADNe extra-organisme » (e.g. cellules, tissus), excluant ainsi les organismes entiers (e.g. bactéries, diatomées). Ces deux définitions de l'ADNe (ADN au sens large et ADN extra-organismes) sont encore largement employées et suscitent de vives discussions (Pawlowski et al., 2020; Rodriguez-Ezpeleta et al., 2021).

Ceci mène souvent à confondre l'ADN extrait de communautés avec l'ADNe dérivé de macro-organismes, qui sont pourtant de natures très différentes et ne soulevant pas les mêmes problématiques. **Ainsi, cette thèse se concentre exclusivement sur l'ADNe dérivé de macro-organismes, ou extra-organismes** (Figure 2-1).

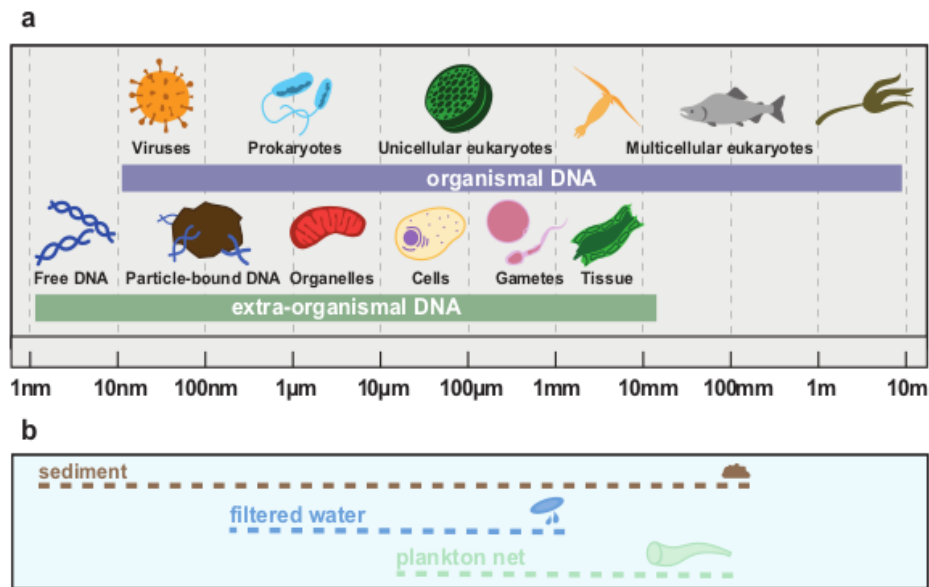


Figure 2-1 : Schéma conceptuel (a) des types d'ADN, organismal (correspondant à des organismes entiers) et extra-organisme. (b) Distribution de taille des particules d'ADNe capturées par divers outils d'échantillonnage couramment utilisés.

## 2.2. L'ADNe issu de macro-organismes et son écologie

Dans les écosystèmes aquatiques, **l'ADNe dérivé de macro-organismes** comme les poissons, les macro-invertébrés et les plantes, peut se présenter sous **différentes formes ou états moléculaires**, allant de cellules entières à des fragments d'ADN libres ou dissous (Figure 2-1). Ces molécules d'ADNe se diffusent dans les différents compartiments de l'écosystème et évoluent avec les conditions du milieu. Ainsi, la présence et la quantité d'ADNe à un instant et un endroit donnés dépendent à la fois des caractéristiques mêmes des molécules d'ADNe, mais aussi de leur dynamique au sein de l'écosystème. Quatre processus, que l'on peut regrouper sous le terme « d'écologie de l'ADNe » proposé par Barnes & Turner (2016), constituent le cycle de vie de l'ADNe : (i) **l'origine et la production** d'ADNe par les organismes, (ii) les **états** (i.e. les différentes formes physiques des molécules d'ADN une fois relargué), (iii) le **transport** et (iv) la **persistance** des molécules d'ADNe (Figure 2-2). Comprendre ces processus permet d'une part de faire le lien entre les molécules d'ADN récoltées dans le milieu et les organismes dont elles proviennent, et d'autre part, d'inférer la présence d'organismes de manière fiable et précise en particulier pour une application en routine de l'ADNe.

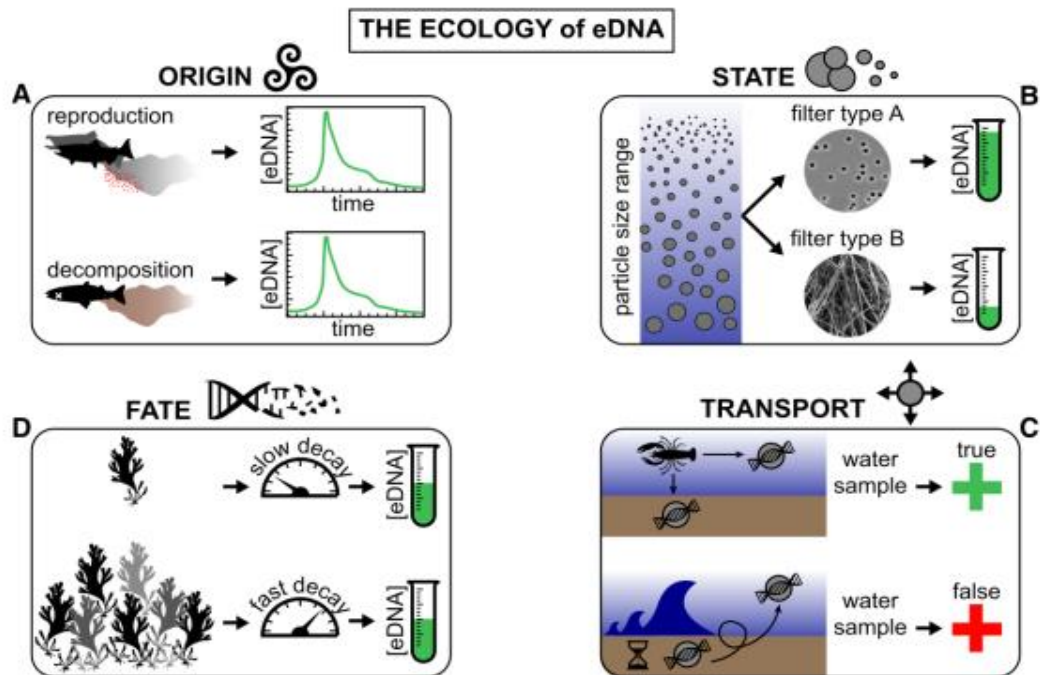


Figure 2-2 : Les quatre éléments de l'écologie de l'ADNe tels que définis par Barnes et Turner (2016). (a) représente la production d'ADNe (origine probable et quantité) ; (b) son état dans l'environnement ; (c) sa distance de transport depuis son origine ; et (d) sa persistance. Figure tirée de Barnes et Turner (2016).

### 2.2.1. Production et états des ADNe

- **Production de l'ADNe**

La production d'ADNe se réfère à la fois à l'origine biologique de l'ADNe, et aux quantités de molécules relarguées dans le milieu. L'ADNe peut provenir des organismes vivants *via* leurs déjections (Martellini et al., 2005), de l'excrétion de substance (e.g. mucus, Henley et al., 2006), des cellules desquamées, ou encore des gamètes (Tsuji & Shibata, 2021). Il peut aussi provenir de la décomposition d'organismes morts (Merkes et al., 2014). La prédominance de chacune de ces sources d'ADNe dans un milieu aquatique est encore inconnue (Taberlet et al., 2018), et peut constituer un défi important pour caractériser les communautés en place. La quantité d'ADN produite a été essentiellement étudiée chez les poissons et les amphibiens. Les résultats montrent que ces organismes libèrent des quantités importantes d'ADNe, dépendantes en partie de la densité d'organismes dans le milieu et de leur biomasse (Doi et al., 2015; Lacoursière-Roussel et al., 2016).



Cependant, le manque d'informations sur les autres groupes biologiques, tels que les invertébrés, limite la généralisation des résultats à l'ensemble des organismes aquatiques. Les organismes plus petits et/ou présentant des métabolismes et morphologies éloignés des vertébrés sont susceptibles de relarguer des quantités d'ADNe plus faibles et d'être moins bien détectés comme le suggèrent les quelques études sur le sujet (Andruszkiewicz Allan et al., 2021; Moushomi et al., 2019; Zhao et al., 2021).

- **États des ADNe**

L'état de l'ADNe fait référence aux diverses caractéristiques physiques que peuvent prendre les molécules d'ADNe dans un échantillon environnemental : un morceau de tissu, une cellule, un fragment d'ADN libre ... Certains d'entre eux pourraient être prédominants dans un milieu et plus ou moins sensibles à la dégradation selon leur niveau de protection (e.g. présence d'une paroi cellulaire). Mais ces aspects sont encore largement sous-évalués dans la littérature. Pour identifier les différents états de l'ADNe, des études ont procédé à la filtration séquentielle de volumes d'eau avec des filtres présentant des tailles de porosité décroissantes, et ont quantifié les particules d'ADNe récupérées sur chaque filtre. Les résultats montrent que les particules d'ADNe dérivées de poisson sont majoritairement supérieures à 10  $\mu\text{m}$  (Jo et al., 2019; Turner et al., 2014; Wilcox et al., 2015). Ceci a conduit les auteur.ices à conclure que l'ADNe relargué dans l'eau, de manière générale, était principalement sous forme intracellulaire (1-10  $\mu\text{m}$  ou plus), correspondant à des cellules entières ou des parties de tissus biologiques directement détachées ou excrétées par les organismes. Ces cellules ou tissus se dégradent ensuite pour atteindre plusieurs états intermédiaires (e.g. organites sortis de la cellule, des complexes nucléo-protéiques, de l'ADN adsorbé à des particules en suspension ou encore des fragments d'ADN libres ou dissous), avant de complètement disparaître.

### 2.2.2. Transport, sédimentation et adsorption

Dans les milieux aquatiques, les particules d'ADNe peuvent être transportées horizontalement par le courant ou verticalement par sédimentation et/ou adsorption sur le substrat benthique (Shogren et al., 2017). L'ADNe peut donc être échantillonné à un endroit plus ou moins distant de l'organisme dont il est issu. En milieu lentique, le transport horizontal est relativement limité (< 100 mètres, Li et al., 2019; Shu et al., 2022), avec une déposition rapide probable des ADNe dans le substrat benthique (Fremier et al., 2019). Ainsi l'ADNe collecté dans les lacs et les étangs reflète en général la présence d'organismes sources proches. Néanmoins, les mouvements d'eau peuvent remettre en suspension l'ADNe précédemment stocké dans les sédiments, et entraîner la détection d'un organisme même si celui-ci n'est plus présent dans l'environnement (Shogren et al., 2017).

En milieu lotique en revanche, les ADNe peuvent être transportés horizontalement sur de longues distances, allant de quelques mètres à des dizaines de kilomètres dans les rivières présentant un fort courant (Deiner & Altermatt, 2014; Nevers et al., 2020; Pont et al., 2018). Quel que soit le milieu considéré, l'ADNe peut aussi être retenu ou adsorbé sur des substrats, mais ces mécanismes sont encore très peu étudiés et leurs implications pour la détection des espèces sont largement méconnues. Les quelques études à ce sujet mettent en évidence une rétention rapide de l'ADNe sur des substrats tels que les sédiments et les biofilms développant sur des pierres (biofilms épilitiques) (Fremier et al., 2019, Shogren et al., 2017). Par ailleurs, il n'est pas impossible que l'ADNe s'adsorbe sur d'autres types de substrats tels que la végétation et les débris de bois. Le transport de l'ADNe fait l'objet d'actives recherches, et les résultats montrent que les facteurs tels que la morphologie du cours d'eau, la vitesse du courant et la saison jouent un rôle déterminant (Thalinger et al., 2021). Des approches de modélisation sont en cours de développement afin de mieux décrire la dispersion des ADNe et d'identifier les points d'échantillonnage optimaux pour détecter la présence des organismes (Andruszkiewicz et al., 2019; Carraro et al., 2020).

### 2.2.3. Persistance et dégradation

Après la question de la distance à laquelle l'ADNe peut être transporté et détecté depuis l'organisme source vient celle de la durée à laquelle il reste détectable. Une fois produit, l'ADNe entame un processus de dégradation qui peut être plus ou moins long selon le compartiment de l'écosystème (eau, sédiments) et les **conditions biotiques et abiotiques du milieu** (pH, température, UVs). Dans la colonne d'eau, l'ADNe peut persister de **quelques jours à plusieurs semaines** (Barnes et al., 2014 ; Pilliod et al., 2014 ; Strickler et al., 2015a). Les auteurs concluent que cette fenêtre de détection relativement courte de l'ADNe offre une vision récente des communautés. À l'inverse, dans les sédiments, les ADNe peuvent être stockés beaucoup plus longtemps que dans la colonne d'eau et être le reflet de communautés plus anciennes. Par exemple, Neslon-Chorney et al., (2019) sont parvenus à reconstruire des populations de poissons vieilles de plus de 140 ans à partir d'ADNe issue de sédiments de lacs. Les mécanismes de préservation de l'ADNe dans ces différents compartiments et leurs intérêts pour la bioindication seront discutés plus en détail dans la section 2.3.

Parmi les **facteurs abiotiques**, les UVs, le pH et la température de l'eau semblent influencer fortement la persistance de l'ADNe (Stewart, 2019). Par exemple, une étude en microcosme montre qu'une température moyenne de l'eau de 5 °C augmente la persistance de l'ADNe de 10 à 53 jours comparé à une température de 30°C (Strickler et al., 2015). Les facteurs biotiques jouent également un rôle clé, comme la présence de micro-organismes pouvant dégrader l'ADN rapidement (Salter, 2018; Zulkefli et al., 2019). En outre, les caractéristiques intrinsèques des molécules d'ADNe sont aussi à considérer, mais le lien entre états des particules et persistance est encore peu exploré. Néanmoins, Mauvisseau et al., (2022) proposent des hypothèses pertinentes à ce sujet.

## 2.3. De l'échantillonnage à la description de communautés biologiques

L'ADNe peut être échantillonné à partir de multiples **matrices environnementales** incluant notamment l'eau, les sédiments, les biofilms épilithiques (Rivera et al., 2021), les fèces, la glace, l'air. L'utilisation d'une ou l'autre de ces matrices dépend souvent des organismes ciblés et de l'objectif scientifique. Par exemple, l'extraction d'ADNe à partir de carottes de glaces sera plutôt utilisée pour retrouver de l'ADNe ancien appartenant à des communautés passées. Dans cette section seront présentées les matrices et méthodes d'échantillonnage utilisées, ou qui pourraient l'être, pour inventorier les communautés biologiques actuelles.

- **Eau**

L'**eau** est la matrice la plus utilisée pour détecter les espèces et les communautés biologiques. La **filtration** de volumes d'eau (typiquement 1-10 L) sur le terrain ou en laboratoire est la méthode la plus courante (Tsuji et al., 2019). Si elle n'est pas effectuée sur le terrain, la filtration doit être entreprise le plus rapidement possible (c'est-à-dire dans les 24 heures) pour garantir une récupération optimale de l'ADN.

Elle nécessite le passage de l'eau à travers une membrane (filtre) qui capture l'ADNe, et permet d'augmenter la sensibilité de détection des taxons par rapport aux méthodes de précipitation et d'ultracentrifugation, restreintes à l'utilisation de faibles volumes d'eau (15–50 ml) (Doi et al., 2017; Piaggio et al., 2014). Pour procéder à la filtration, les procédés et les dispositifs sont très variés (types de filtres, taille de la porosité de filtre), et il n'existe *à priori* pas de consensus sur le matériel et le protocole à utiliser. De plus, la filtration en elle-même est assez contraignante puisqu'elle requiert du matériel de pompage, des dispositifs de filtration encombrant et parfois difficile à transporter sur le terrain. Ces contraintes ont mené des équipes de recherche à développer des solutions de filtration autonome comme des robots filtreurs (Thomas et al., 2020; Yamahara et al., 2019, VigiBOAT; SPYGEN), ou des dispositifs clés en main plus simples à mettre en œuvre (Waterra eDNA Filters, Waterra USA Inc).

- **Substrats biologiques**

D'autres solutions d'échantillonnage ont récemment vu le jour, comme l'utilisation de certains **substrats biologiques** pour collecter l'ADNe de manière **passive**, c'est-à-dire **sans action mécanique de collecte de l'ADNe** comme la filtration par exemple. L'usage de biofilms épilithiques pour collecter l'ADNe passivement a fait l'objet d'une thèse récente (Rivera, 2022). Les biofilms constituent un mélange de bactéries et d'algues unicellulaires, associées à une matrice polysaccharidique. Bien que les mécanismes d'accumulation d'ADNe dans les biofilms soient encore incertains, ils sont probablement liés à l'adsorption des molécules ADNe par interactions ioniques ou à l'utilisation de l'ADNe par les biofilms comme élément structurel (Montanaro et al., 2011). L'ADNe dérivé de macro-organismes s'accumule dans les biofilms, et peut être directement extrait à partir d'un sous-échantillon de biofilm suspendu dans de l'éthanol (Rivera et al., 2022). Dans la même lancée, Mariani et al., (2019) utilisent des éponges marines à partir desquelles ils extraient l'ADNe de macro-organismes marins.

- **Sédiments**

Les **sédiments** sont bien plus concentrés en ADNe que l'eau (Turner et al., 2015). En effet, ils sont connus pour accumuler l'ADNe à leur surface par un mécanisme **d'adsorption**, conférant aux ADNe une durée de vie pouvant être très supérieure à celle de l'ADNe dans l'eau. L'ADN au sens large peut être adsorbé sur divers composants des sédiments tels que l'argile, le quartz et l'hydroxyapatite (Grunenwald et al., 2014, Levy-Booth et al., 2007, Lorenz and Wackernagel, 1987). L'ADN s'adsorbe par le biais de liaisons ioniques faibles, telles que les interactions électrostatiques (Yu et al., 2013). Ces interactions se font majoritairement par le biais de cations inorganiques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+/3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ), qui relie la surface négative des minéraux aux groupements phosphates de l'ADN, eux aussi négatifs (Lorenz et Wackernagel, 1987). Bien que les mécanismes ne soient pas encore clairement compris, la conservation de l'ADN à long terme dans les sédiments serait due, en partie, aux conditions anoxiques réduisant la dégradation de l'ADN par les nucléases (Corinaldesi et al., 2008). L'échantillonnage de sédiments est conduit de préférence dans des lacs profonds, où les sédiments se déposent et ne sont pas constamment brassés. L'extraction d'ADN à partir de carottes sédimentaires profondes est très utilisée dans un contexte de paléo-écologie afin de reconstruire des communautés anciennes (Parducci et al., 2017, Pedersen et al., 2015).

Néanmoins, les couches superficielles des sédiments peuvent contenir des ADN plus récents qui se sont déposés récemment et sont susceptibles de refléter la présence de communautés actuelles, bien que cette utilisation semble moins courante pour détecter les macro-organismes.

### 2.4. Détection des espèces à partir de l'ADNe

Une fois extrait d'une ou plusieurs matrices, l'ADNe est utilisé le plus souvent pour deux objectifs: i) détecter des **taxons cibles** ou ii) détecter **plusieurs taxons simultanément** (Figure 2-3). Dans les deux cas, une étape d'amplification d'un fragment d'ADNe, permettant de le répliquer en milliers de copies afin qu'il soit majoritaire dans un échantillon. Pour cela, la technique d'amplification en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) est utilisée et repose sur le processus de réplication d'un fragment d'ADN par une enzyme, la Taq polymérase. Le fragment ciblé (appelé amplicon) est amplifié grâce à l'utilisation d'amorces, c'est-à-dire des courtes séquences d'ADN, qui sont conçues pour cibler un taxon ou un groupe de taxons en particulier et sont nécessaires à l'initiation de la synthèse de la séquence d'ADN par la Taq polymérase.

#### 2.4.1. Détection de taxons cibles

La **détection d'une espèce cible** à partir d'échantillons d'ADNe est une application courante (Rees et al., 2014), qui se concentre sur un seul taxon d'intérêt. Cette approche utilise des technologies basées sur la PCR précédemment décrite. La **PCR quantitative** (qPCR) ou PCR en temps réel est la plus fréquemment utilisée et permet simultanément d'amplifier l'ADN cible et de quantifier le nombre de copies initiales du gène ciblé dans un échantillon. La quantification s'effectue le plus souvent par l'ajout d'un colorant (SYBR Green) qui fluoresce lorsqu'il se lie à l'ADN double brin. La fluorescence émise est mesurée au cours de l'amplification et permet de mesurer la concentration d'ADN. Des technologies plus performantes ont récemment vu le jour comme la **PCR Digitale en micro-compartiments** (ddPCR), qui permet une quantification absolue de l'ADN à partir d'un échantillon fractionné en micro-gouttelettes. Pour utiliser l'une ou l'autre de ces approches, des amorces spécifiques à un taxon donné sont développées et amplifient un **court fragment de son ADN**, compris entre 50 et 150 paires de bases (pb).

Généralement, des ADN mitochondriaux (ADN-mt) comme le 16S sont ciblés, plutôt que nucléaires (ADN-nu), en raison du nombre élevé de copies par cellule, allouant une probabilité de détection plus élevée des ADN dégradés ou faiblement concentrés comme les ADNe. Ces approches sont particulièrement utilisées dans le domaine de la conservation des milieux aquatiques pour détecter des espèces envahissantes (Ardura et al., 2015, Crane et al., 2021), rares et/ou menacées (Jerde et al., 2011, Mauvisseau et al.,) à partir d'échantillons d'ADNe. Au-delà de la simple détection d'espèces cibles, ces technologies permettent d'étudier les processus liés à l'écologie de l'ADNe comme sa production, sa persistance ou encore les états moléculaires en quantifiant de manière précise la concentration d'ADNe cible. D'autre part, des études récentes mettent en évidence le potentiel de ces approches pour estimer l'abondance et la biomasse des espèces (Doi et al., 2017, Spear et al., 2021), information essentielle dans les programmes de surveillance environnementale.

### 2.4.2. Détection multi-taxons : le metabarcoding de l'ADNe

À la différence des méthodes ci-dessus qui permettent la détection d'une espèce à la fois, le **metabarcoding** permet de **détecter et d'identifier** plusieurs espèces simultanément à partir de l'ADNe extrait d'une matrice environnementale. Cette approche consiste à amplifier par PCR et à séquencer de courts fragments d'ADNe (barcodes, cf. section 1.5.2). Contrairement aux amorces utilisées en détection d'espèces cibles, les amorces utilisées en metabarcoding sont dites « universelles » et permettent d'amplifier plusieurs espèces appartenant à un groupe taxonomique ciblé. Néanmoins, ces amorces doivent être assez sélectives pour limiter l'amplification de groupes taxonomiques non cibles (Marques, 2020). Ainsi, la conception d'amorces pour le metabarcoding constitue un vrai défi (Coissac et al., 2012, Elbrecht & Leese, 2017, Piñol). Différents gènes sont couramment ciblés pour cette application selon les groupes taxonomiques, à savoir le gène *COI* (Cytochrome Oxidase I) pour les animaux (Hebert et al., 2003), les gènes *rbcl* et *matK* pour les embryophytes (plantes) (CBOL Plant Working Group 2009) et *ITS* pour les champignons (Nilsson et al., 2009). Pour les animaux, le *COI* a été proposé, car sa variation permet généralement une discrimination au niveau de l'espèce et il peut être amplifié par PCR à partir de la plupart des animaux. Les bases de données associées comptent désormais des millions de séquences d'ADN vérifiées sur le plan taxonomique. De fait, c'est le gène le plus largement utilisé pour le metabarcoding des animaux, moyennant certaines limites (Deagle et al., 2014, Piper et al., 2019).

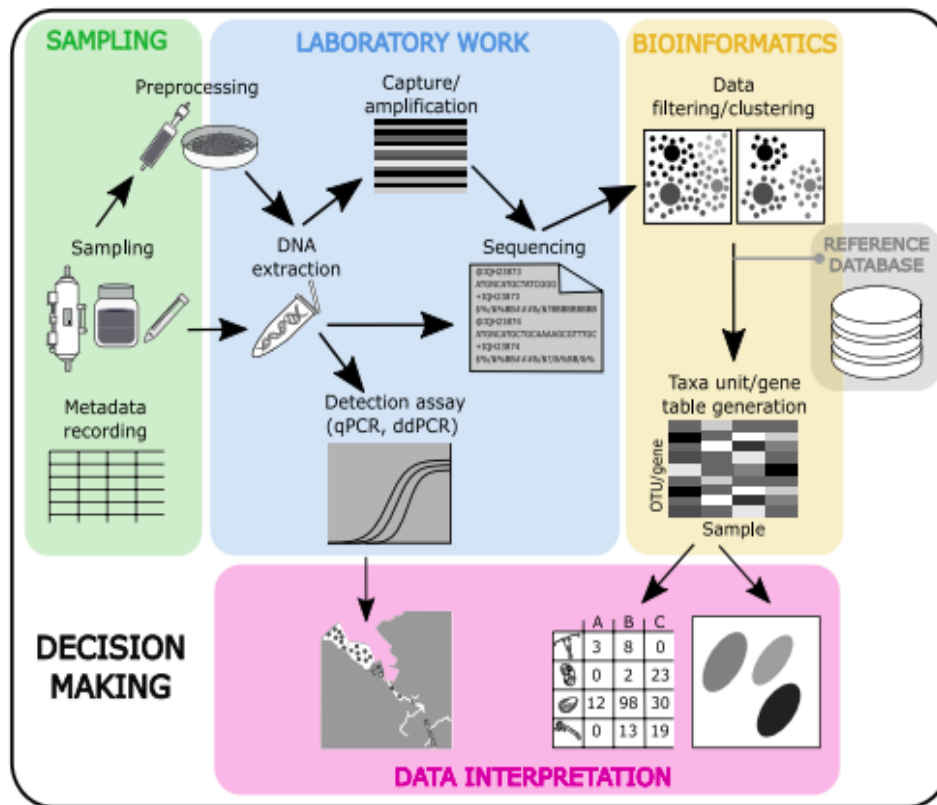


Figure 2-3 : Principales étapes de l'utilisation de l'ADNe pour la détection de communautés biologiques. Après échantillonnage, l'ADNe est soit extrait directement de la matrice naturelle soit cela nécessite une étape de pré-traitement (e.g. tamisage, filtration). L'ADNe extrait peut être utilisé pour détecter des taxons cibles (qPCR, ddPCR) ou séquencé pour décrire des communautés entières. Ensuite, les données sont nettoyées à l'aide d'un traitement bio-informatique avant d'être analysées.

Le séquençage de l'ADNe produit des milliers de lectures (« reads » en anglais) associées à chaque séquence d'ADN. Ces séquences appartiennent aux espèces du groupe taxonomique ciblé. Ces listes de séquences peuvent être « polluées » à la suite, entre autres, d'erreurs de PCR et de séquençage. Ne pouvant être utilisées en l'état, des protocoles d'analyse bio-informatique sont appliqués afin de trier et filtrer les séquences erronées ou de mauvaise qualité. Ensuite, les séquences les plus semblables sont généralement regroupées entre elles sous forme d'OTUs (Operational Taxonomic Units). Les OTUs sont définies comme un groupe de séquences dont l'identité de séquence est supérieure à un seuil donné, souvent fixé à 97 % (Blaxter et al., 2005), et sont assimilés à une espèce.



D'autres méthodes existent et ne sont pas basées sur le regroupement des séquences par un pourcentage d'identité comme par exemple, les Amplicon Sequence Variants (ASV) (Glassman & Martiny 2018). Un ASV est, simplement, une séquence d'ADN unique obtenue après une étape de correction des erreurs de PCR et séquençage (ou « denoising »). Cette approche présente l'avantage de sauvegarder un nombre élevé de séquences, qui diffèrent parfois de quelques nucléotides, et également de comparer les séquences d'une étude à l'autre. *In fine*, les OTUs ou les ASV sont assignés à une espèce (ou taxon) à l'aide d'une base de référence contenant les séquences d'espèces. Si une séquence correspond à une espèce non représentée dans la base de données, il n'est pas possible de lui assigner un nom d'espèce. À la fin de ce processus, une matrice comprenant la liste des taxons avec un nombre de lectures de séquence associées est obtenue.

### 3. Potentiels et défis liés à l'utilisation de l'ADNe

L'échantillonnage et l'analyse de l'ADNe présentent de nombreux avantages (e.g. non-invasif, rapidité, identification jusqu'à l'espèce) et se présentent comme une alternative prometteuse pour la bioindication. Néanmoins, certains défis à la fois fondamentaux et méthodologiques limitent la portée de l'application de l'ADNe pour la détection de communautés bioindicatrices, notamment dans les masses d'eau particulières. Les sections qui suivent explorent plus en détail l'apport de l'ADNe pour le suivi des communautés bioindicatrices et les défis qui lui sont associés.

#### 3.1. Apports de l'ADNe en milieux complexes et dynamiques

L'échantillonnage de l'ADNe par le biais de différentes matrices naturelles (eau, sédiments, biofilms) permettrait **d'accéder à la biodiversité de milieux dans lesquels la bioindication est difficile** dû à leur manque d'accessibilité ou à leurs conditions environnementales particulières. C'est le cas par exemple des habitats qui s'assèchent une partie de l'année (e.g. rivières intermittentes, mares temporaires), des habitats profonds (Brandt, 2020) et de nombreux milieux souterrains difficilement accessibles (Malard et al., 2022, West et al., 2020 voir annexes). Par exemple, certaines matrices naturelles permettraient d'accéder à la biodiversité en période d'assèchements dans les rivières intermittentes par le biais de matrices prélevables même sans écoulement apparent de l'eau (e.g. biofilms, sédiments).

Comme l'ADNe peut être transporté par le courant (section 2.2.2), il pourrait fournir des informations sur les communautés et les écosystèmes avec une **résolution spatio-temporelle plus large**. Ceci offrirait une prise en compte plus intégrative de certains écosystèmes dynamiques, présentant notamment différentes mosaïques d'habitats (e.g. rivières intermittentes). Enfin, l'identification taxonomique plus fine associée au metabarcoding de l'ADNe permettrait de décrire des organismes difficiles à identifier à partir des traits morphologiques (e.g. juvéniles, larves, ou forme de résistance), de distinguer des espèces proches qui sont sous-évaluées en bioindication tout en répondant de manière sensible à différents facteurs de stress. Ainsi, l'ADNe pourrait élargir **l'éventail de taxons bioindicateurs**, en prenant en compte à la fois de nouveaux bioindicateurs et des taxons déjà ciblés en bioindication, mais qui ne sont pas utilisés à leur plein potentiel (e.g. macro-invertébrés). Ceci pourrait permettre notamment de mieux discriminer les différentes sources de perturbations dans les milieux subissant de multiples stress.

### 3.2. Défis limitant l'application de l'ADNe

Depuis plusieurs années, des efforts considérables ont été réalisés pour fiabiliser, intercalibrer et rendre accessibles les méthodes basées sur l'ADN dans leur ensemble, c'est-à-dire la détection des communautés *via* l'ADN « bulk » (ADN extrait à partir d'homogénat des communautés capturées) et l'ADNe (relargué par les organismes dans l'environnement). Des consortiums et groupes de travail internationaux tels que la costAction DNAquanet en Europe (Leese et al., 2018, Weigand et al., 2017, Bohman et al., 2021) et le Western Regional Panel Annual Meeting aux États-Unis ont été mis en place pour intégrer ces méthodes dans les suivis routiniers de bioindication. Ces travaux d'envergure mettent en avant l'énorme potentiel des méthodes basées sur l'ADN pour le suivi des communautés biologiques. Néanmoins on observe une différence assez marquée dans la vitesse de déploiement entre le suivi des communautés par l'ADN « bulk » et l'ADNe. Pour ce dernier, le passage de l'échantillonnage des communautés à une méthode de détection non-invasive et indirecte amène un lot d'incertitudes qui questionnent sur la réelle pertinence de l'ADNe pour la bioindication, en particulier dans les milieux complexes et dynamiques. À cela s'ajoutent des biais et difficultés inhérentes à l'utilisation de l'ADNe, tels que le risque de contaminations, qui sont synthétisés par plusieurs auteurs (Beng et al., 2020, Hansen et al., 2018).

Les défis liés à l'implémentation de l'ADNe pour la bioindication, en particulier dans les milieux complexes et dynamiques sont détaillés ci-après.

### **Défi 1 : Une compréhension partielle de l'écologie de l'ADNe.**

Nous manquons d'une **compréhension claire de l'écologie de l'ADNe** (production, états, persistance, transport). À ce jour, les recherches se sont principalement concentrées autour des vertébrés (en particulier les poissons) et des milieux déjà ciblés par la bioindication comme les étangs et les lacs (e.g. Eichmiller et al., 2014, Hänfling et al., 2016, Lawson Handley et al., 2019), ainsi que les cours d'eau pérennes (e.g. Deiner & Altermatt, 2014; Thalinger et al., 2021). Dans ce contexte, les connaissances acquises sont d'un côté difficilement transférable aux autres groupes biologiques pourtant ciblés par la bioindication, tels que les macro-invertébrés ou les macrophytes, et de l'autre, aux masses d'eau particulières. En effet, il est peu probable que les organismes libèrent des quantités égales d'ADN dans l'environnement et que l'ADN de différentes sources se dégrade à vitesse équivalente, même dans des conditions environnementales similaires. C'est d'ailleurs ce que laissent entrevoir les quelques études à ce sujet qui montrent par exemple que l'ADNe de certains macro-invertébrés est présent en très faible quantité dans le milieu, et semble être sous des états différents de celui des poissons ou des amphibiens (*Daphnia magna*; Moushomi et al., 2018, Zaho et al., 2021). Actuellement, le nombre d'espèces considéré dans ce type d'étude est encore trop peu nombreux pour (i) comprendre les mécanismes de production de l'ADNe et (ii) pour évaluer la capacité de l'ADNe à détecter l'ensemble des groupes biologiques ciblés en bioindication.

### **Défi 2 : Pertinence du signal d'ADNe pour la bioindication.**

En lien direct avec l'écologie de l'ADNe, **la fiabilité et la pertinence du signal spatio-temporel fourni par l'ADNe pour la bioindication sont encore incertaines**. En bioindication, on peut chercher à la fois à estimer les changements de composition des communautés soumises à des perturbations localement (e.g. pollution), et à évaluer l'état global de l'écosystème sur une plus large échelle (en augmentant spatialement l'échantillonnage). En milieux lotiques, si l'ADNe fournit un signal congruent avec les inventaires obtenus par capture des organismes à un niveau local, ceci peut-être plus complexes dans les systèmes lenticques. Dans ces milieux, l'ADNe peut être transporté sur plusieurs kilomètres depuis sa source (section 2.2

.2) et détecté des organismes dans un rayon plus large que le point de prélèvement considéré. De plus, les matrices d'échantillonnage étant de natures très variées (e.g. eau, sédiments, biofilms), elles intègrent probablement un signal d'ADN différent. Par exemple, un échantillon d'eau devrait contenir des **ADNe récemment relargués** par les organismes, et être un bon proxy pour refléter la présence de communautés à **court terme** (i.e. quelques jours à quelques semaines). Cependant, elle peut intégrer des ADNe d'écosystèmes adjacents ou situés plus en amont, ainsi que des ADN exogènes. À l'inverse, les substrats fixés tels que les sédiments et les biofilms sont susceptibles de fournir à la fois une information **spatiale plus locale** et une **résolution temporelle plus large** (de quelques jours à plusieurs centaines de milliers d'années). Dans les milieux présentant des conditions hydrologiques variables comme les rivières intermittentes, ceci rajoute une complexité supplémentaire, car l'ADNe accumulé dans les différentes matrices (sédiments, biofilms) peut être resuspendu après des crues ou le brassage avec le courant, ou encore dégradé lorsque le cours d'eau s'assèche. Néanmoins, la pertinence de l'ADNe pour ce type de milieu, et en particulier dans un cas concret de bioindication (e.g. étude d'impact ou évaluation de l'état écologique) n'a jamais été testée à ma connaissance.

### Défi 3 : Absence de standards pour l'échantillonnage et l'analyse

Malgré la multitude de protocoles d'échantillonnage de l'ADNe développée en eau douce, aucun ne peut actuellement être appliqué à l'ensemble des écosystèmes. En effet, quelle que soit la méthodologie (e.g. filtres disposés sur des entonnoirs, robots filtreurs), la filtration d'eau n'est pas adaptée dans certains environnements où l'eau est par exemple trop turbide pour être filtrée et entraîne une obstruction très rapide des filtres (Kumar et al., 2022, Williams et al., 2017). Le prélèvement d'eau de manière générale et parfois difficile du fait de la configuration du milieu, ou par définition impossible lorsque le cours d'eau est asséché. De plus, les autres matrices d'échantillonnage telles que les sédiments, les biofilms épilithiques ou les éponges ne sont pas toujours disponibles et prélevables selon les milieux. En l'état, ces protocoles semblent sous optimaux pour la bioindication des habitats complexes et dynamiques.

Pour résumer, l'application de l'ADNe à la bioindication se heurte à (i) **un manque de connaissances fondamentales sur l'ADNe et son évolution dans les milieux aquatiques**, et (ii) des **contraintes méthodologiques (en particulier liées à l'échantillonnage) qui entravent l'usage de l'ADNe dans les milieux complexes et dynamiques**.

### 3.3. Les rivières intermittentes : un modèle pour tester l'applicabilité de l'ADNe dans un milieu dynamique

Les rivières intermittentes (RIs) sont des cours d'eau qui cessent de s'écouler ou s'assèchent périodiquement sur un ou plusieurs tronçons. Bien qu'elles soient ignorées des politiques de gestion (Acuña et al. 2014, Skoulikidis et al. 2017), ces rivières représentent plus de la moitié des rivières mondiales (Datry et al., 2014, Messenger et al., 2021). Le nombre et la longueur des RIs sont amenés à s'accroître en réponse au réchauffement climatique et à la demande croissante des besoins en eau (Cigizoglu et al. 2005, Döll & Schmied 2012). Les RIs peuvent présenter une variété de conditions hydrologiques qui évoluent dans le temps et dans l'espace, incluant des habitats lenticques, lotiques et des habitats que l'on peut considérer comme terrestres pendant les phases d'assèchement (Datry et al., 2017).



Figure 3-1: Photos de la rivière de l'Albarine (Ain, France) à différents niveaux d'écoulement. Photos : H. Verdier.

Elles sont affectées, au même titre que les rivières pérennes (qui s'écoulent en permanence), par des impacts anthropiques (pollution, altérations hydromorphologiques, invasions biologiques). La détection de ces impacts dans les RIs constitue un défi, car la fiabilité des méthodes de bioindication est généralement incertaine pour ces systèmes dynamiques, présentant déjà un stress hydrologique (Chiu et al., 2017 ; Stubbington et al., 2018).

Des études récentes montrent que, dans la plupart des cas, les méthodes de bioindication sont inopérantes (Crabot et al., 2020, Soria et al., 2020). En effet, la qualité écologique des cours d'eau intermittents s'appuie généralement sur des méthodes développées pour les systèmes pérennes qui ne prennent pas en compte la biodiversité de ces habitats et leur résistance aux assèchements (e.g. forme de résistance), de même que la variabilité spatio-temporelle des conditions hydrologiques. Ainsi, les RIs apparaissent comme un modèle approprié pour tester la capacité des méthodes basées sur l'ADNe à répondre aux enjeux de la bioindication actuelle : détecter des perturbations anthropiques et évaluer l'état écologique des milieux complexes et dynamiques.

## 4. Objectifs et structure de la thèse

Cette thèse propose de lever certains défis fondamentaux et méthodologiques qui freinent le déploiement de l'ADNe à la bioindication, en mettant l'accent sur les milieux complexes et dynamiques. Les trois principaux objectifs de cette thèse sont : (1) **d'apporter des connaissances fondamentales sur l'ADNe et son écologie**, (2) **de développer un outil d'échantillonnage passif, facile à utiliser et standardisable à un large éventail de milieux aquatiques** et (3) **d'évaluer la capacité de l'ADNe issu de différentes matrices d'échantillonnage à détecter une perturbation anthropique en rivière intermittente**.

La suite de ce manuscrit de thèse se structure en trois chapitres (Chapitre II à IV), correspondant aux trois objectifs précédemment exposés, présentés sous forme d'article. Le manuscrit se termine par un cinquième chapitre de discussion et de perspectives.

**Le chapitre II** est une étude fondamentale réalisée en microcosmes, visant à **quantifier la production et identifier les états des ADNe** relargués dans l'eau par des taxons représentatifs des milieux d'eau douce, éloignés phylogénétiquement. Plus particulièrement, l'objectif de cette expérience est d'investiguer l'influence de paramètres clés à savoir (i) l'effet du taxon ciblé, (ii) l'effet du compartiment génétique d'origine (i.e. mitochondrial ou nucléaire), (iii) le moment d'échantillonnage sur la production d'ADNe, l'état des particules et leur prédominance au sein d'un échantillon d'eau.

Le **chapitre III** présente le développement et le test d'un capteur passif comme outil d'échantillonnage de l'ADNe. Imprimés en 3D à partir d'une résine en hydroxyapatite, les capteurs développés reposent sur la propriété des minéraux à adsorber l'ADN et à le protéger contre la dégradation. Cette étude présente le concept et la fabrication des capteurs, suivi de leur test en microcosmes et en milieux naturels pour capturer de l'ADNe provenant de macro-organismes (i.e. des isopodes d'eau douce). Pour finir, seront discutées leur répliquabilité et les pistes d'amélioration possible.

Le **chapitre IV** est une étude exploratoire *in situ* visant à **appliquer l'ADNe en dans un milieu présentant à la fois des pressions anthropiques (pollutions chroniques) et un stress lié à l'assèchement (rivière intermittence)**. L'objectif est de tester la capacité de plusieurs matrices d'échantillonnage de l'ADNe (capteurs passifs précédemment développés, l'eau, les sédiments) à détecter une perturbation anthropique (pollution) dans une rivière intermittente, et comparer les résultats obtenus avec l'approche conventionnelle de bioindication (morphologie) à partir de communautés d'invertébrés benthiques.

Le **chapitre V** dresse (i) une discussion générale des résultats et leurs implications pour la bioindication, (ii) une conclusion et des recommandations opérationnelles et (ii) des pistes de travail pour approfondir les connaissances sur l'ADNe et son applicabilité.

## 5. Références

- Acuña, V., Datry, T., Marshall, J., Barceló, D., Dahm, C. N., Ginebreda, A., McGregor, G., Sabater, S., Tockner, K., & Palmer, M. A. (2014). Why Should We Care About Temporary Waterways? *Science*, 343(6175), 1080–1081. <https://doi.org/10.1126/science.1246666>
- Altermatt, F., Little, C. J., Mächler, E., Wang, S., Zhang, X., & Blackman, R. C. (2020). Uncovering the complete biodiversity structure in spatial networks: The example of riverine systems. *Oikos*, 129(5), 607–618. <https://doi.org/10.1111/oik.06806>
- AmphibiaWeb. 2022. <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA.
- Andruszkiewicz Allan, E., Zhang, W. G., C. Lavery, A., & F. Govindarajan, A. (2021). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 3(2), 492–514. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>
- Andruszkiewicz, E. A., Koseff, J. R., Fringer, O. B., Ouellette, N. T., Lowe, A. B., Edwards, C. A., & Boehm, A. B. (2019). Modeling Environmental DNA Transport in the Coastal Ocean Using Lagrangian Particle Tracking. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2019.00477>
- Ardura, A., Zaiko, A., Martinez, J. L., Samulioviene, A., Semenova, A., & Garcia-Vazquez, E. (2015). EDNA and specific primers for early detection of invasive species – A case study on the bivalve *Rangia cuneata*, currently spreading in Europe. *Marine Environmental Research*, 112, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.013>
- Attrill, M. J., & Depledge, M. H. (1997). Community and population indicators of ecosystem health: Targeting links between levels of biological organisation. *Aquatic Toxicology*, 38(1), 183–197. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00839-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00839-9)
- Baird, D. J., & Hajibabaei, M. (2012). Biomonitoring 2.0: A new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing: NEWS AND VIEWS: OPINION. *Molecular Ecology*, 21(8), 2039–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05519.x>
- Balian, E. V. (Ed.). (2008). *Freshwater Animal Diversity Assessment*. Springer.
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1819–1827. <https://doi.org/10.1021/es404734p>
- Beng, K. C., & Corlett, R. T. (2020). Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and



- conservation: Opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, 29(7), 2089–2121. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-01980-0>
- Birk, S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., Solimini, A., van de Bund, W., Zampoukas, N., & Hering, D. (2012). Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators*, 18, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.10.009>
- Blackman, R. C., Mächler, E., Altermatt, F., Arnold, A., Beja, P., Boets, P., Egeter, B., Elbrecht, V., Filipe, A. F., Jones, J. I., Macher, J., Majaneva, M., Martins, F. M. S., Murria, C., Meissner, K., Pawlowski, J., Schmidt Yanez, P. L., Zizka, V. M. A., Leese, F., ... Deiner, K. (2019). Advancing the use of molecular methods for routine freshwater macroinvertebrate biomonitoring – the need for calibration experiments. *Metabarcoding and Metagenomics*, 3, 49–57. <https://doi.org/10.3897/mbmg.3.34735>
- Blandin, P. (1986). Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bioindicateurs et Diagnostic Des Systèmes Écologiques*, 17(4), 215–307.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1935–1943. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1725>
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D. W., & de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(6), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>
- Bunn, S. E., & Arthington, A. H. (2002). Basic Principles and Ecological Consequences of Altered Flow Regimes for Aquatic Biodiversity. *Environmental Management*, 30(4), 492–507. <https://doi.org/10.1007/s00267-002-2737-0>
- Cañedo-Argüelles, M., Bogan, M. T., Lytle, D. A., & Prat, N. (2016). Are Chironomidae (Diptera) good indicators of water scarcity? Dryland streams as a case study. *Ecological Indicators*, 71, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.002>
- Carraro, L., Mächler, E., Wüthrich, R., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17337-8>
- Carraro, L., Stauffer, J. B., & Altermatt, F. (2021). How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. *Environmental DNA*, 3(1), 157–172.
- Chiu, M.-C., Leigh, C., Mazor, R., Cid, N., & Resh, V. (2017). Chapter 5.1—Anthropogenic Threats to Intermittent Rivers and Ephemeral Streams. In T. Datry, N. Bonada, & A. Boulton (Eds.), *Intermittent Rivers and Ephemeral Streams* (pp. 433–454). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803835-2.00017-6>
- Cigizoglu, H. K., & Kişi, Ö. (2005). Flow prediction by three back propagation techniques using

- k-fold partitioning of neural network training data. *Hydrology Research*, 36(1), 49–64. <https://doi.org/10.2166/nh.2005.0005>
- Clare, E. L., Economou, C. K., Faulkes, C. G., Gilbert, J. D., Bennett, F., Drinkwater, R., & Littlefair, J. E. (2021). eDNAir: Proof of concept that animal DNA can be collected from air sampling. *PeerJ*, 9, e11030. <https://doi.org/10.7717/peerj.11030>
- Clements, W. H. (1994). Benthic Invertebrate Community Responses to Heavy Metals in the Upper Arkansas River Basin, Colorado. *Journal of the North American Benthological Society*, 13(1), 30–44. <https://doi.org/10.2307/1467263>
- Coissac, E., Riaz, T., & Puillandre, N. (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology*, 21(8), 1834–1847. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05550.x>
- Corinaldesi, C., Beolchini, F., & Dell'anno, A. (2008). Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: Implications for the preservation of gene sequences. *Molecular Ecology*, 17(17), 3939–3951. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03880.x>
- Coste, M., Tison-Rosebery, J., & Delmas, F. (2005). *Flores diatomiques des cours d'eau: Proposition de valeurs limites du Bon Etat pour l'IPS et l'IBD* (p. 23) [Report, irstea]. <https://hal.inrae.fr/hal-02587147>
- Crabot, J., Dolédec, S., Forcellini, M., & Datry, T. (2021). Efficiency of invertebrate-based bioassessment for evaluating the ecological status of streams along a gradient of flow intermittence. *Ecological Indicators*, 133, 108440. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108440>
- Crane, L. C., Goldstein, J. S., Thomas, D. W., Rexroth, K. S., & Watts, A. W. (2021). Effects of life stage on eDNA detection of the invasive European green crab (*Carcinus maenas*) in estuarine systems. *Ecological Indicators*, 124, 107412. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107412>
- Deagle, B. E., Jarman, S. N., Coissac, E., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: Not a perfect match. *Biology Letters*, 10(9), 20140562. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0562>
- Deiner, K., & Altermatt, F. (2014). Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE*, 9(2), e88786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Doi, H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T., & Minamoto, T. (2017). Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, 62(1), 30–39. <https://doi.org/10.1111/fwb.12846>

- Doi, H., Uchii, K., Matsushashi, S., Takahara, T., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2017). Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA. *Limnology and Oceanography: Methods*, *15*(2), 212–218. <https://doi.org/10.1002/lom3.10161>
- Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. *PLOS ONE*, *10*(3), e0122763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122763>
- Döll, P., & Schmied, H. M. (2012). How is the impact of climate change on river flow regimes related to the impact on mean annual runoff? A global-scale analysis. *Environmental Research Letters*, *7*(1), 014037. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/7/1/014037>
- Dudgeon, D. (2010). Prospects for sustaining freshwater biodiversity in the 21st century: Linking ecosystem structure and function. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, *2*(5), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2010.09.001>
- Dudgeon, D. (2019). Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Current Biology*, *29*(19), R960–R967. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.002>
- Eichmiller, J. J., Bajer, P. G., & Sorensen, P. W. (2014). The Relationship between the Distribution of Common Carp and Their Environmental DNA in a Small Lake. *PLoS ONE*, *9*(11), e112611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112611>
- Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment. *Frontiers in Environmental Science*, *5*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2017.00011>
- Elbrecht, V., Vamos, E. E., Meissner, K., Aroviita, J., & Leese, F. (2017). Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, *8*(10), 1265–1275. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12789>
- Elosegi, A., & Sabater, S. (2013). Effects of hydromorphological impacts on river ecosystem functioning: a review and suggestions for assessing ecological impacts. *Hydrobiologia*, *712*(1), 129–143.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, *4*(4), 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Fremier, A. K., Strickler, K. M., Parzych, J., Powers, S., & Goldberg, C. S. (2019). Stream Transport and Retention of Environmental DNA Pulse Releases in Relation to Hydrogeomorphic Scaling Factors. *Environmental Science & Technology*, *53*(12), 6640–6649. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06829>
- Glassman, S. I., & Martiny, J. B. H. (2018). BROADSCALE Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact Sequence Variants versus Operational Taxonomic Units. *MSphere*, *3*(4), e00148–18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00148-18>
- Grunenwald, A., Keyser, C., Sautereau, A. M., Crubézy, E., Ludes, B., & Drouet, C. (2014).

- Adsorption of DNA on biomimetic apatites: Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA. *Applied Surface Science*, 292, 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.12.063>
- Häder, D.-P., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., & Helbling, E. W. (2020). Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of The Total Environment*, 713, 136586. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586>
- Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A. C., & Baird, D. J. (2011). Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *PLoS ONE*, 6(4), e17497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017497>
- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J. F., Casey, K. S., Ebert, C., Fox, H. E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H. S., Madin, E. M. P., Perry, M. T., Selig, E. R., Spalding, M., Steneck, R., & Watson, R. (2008). A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science*, 319(5865), 948–952. <https://doi.org/10.1126/science.1149345>
- 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(13), 3101–3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660>
- Hansen, B. K., Bekkevold, D., Clausen, L. W., & Nielsen, E. E. (2018). The sceptical optimist: Challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and Fisheries*, 19(5), 751–768. <https://doi.org/10.1111/faf.12286>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl\_1), S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Henley, W. F., Grobler, P. J., & Neves, R. J. (2006). NON-INVASIVE METHOD TO OBTAIN DNA FROM FRESHWATER MUSSELS (BIVALVIA: UNIONIDAE). *Journal of Shellfish Research*, 25(3), 975–977. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[975:NMTODF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[975:NMTODF]2.0.CO;2)
- Hynes, H.B.N. (1960) *The Biology of polluted waters*. Liverpool University Press, Liverpool, 202.
- Jackson, M. C., Weyl, O. L. F., Altermatt, F., Durance, I., Friberg, N., Dumbrell, A. J., Piggott, J. J., Tiegs, S. D., Tockner, K., Krug, C. B., Leadley, P. W., & Woodward, G. (2016). Recommendations for the Next Generation of Global Freshwater Biological Monitoring Tools. In *Advances in Ecological Research* (Vol. 55, pp. 615–636). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2016.08.008>
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA: EDNA surveillance of rare aquatic

- species. *Conservation Letters*, 4(2), 150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x>
- Jo, T., Arimoto, M., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019). Particle Size Distribution of Environmental DNA from the Nuclei of Marine Fish. *Environmental Science & Technology*, 53(16), 9947–9956. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02833>
- Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Frigerio, J.-M., Humbert, J.-F., & Bouchez, A. (2014). A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. *Freshwater Science*, 33(1), 349–363. <https://doi.org/10.1086/675079>
- Koehn, J. D., & MacKenzie, R. F. (2004). Priority management actions for alien freshwater fish species in Australia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38(3), 457–472. <https://doi.org/10.1080/00288330.2004.9517253>
- Kolkwitz und M. Marsson: Ökologie der pflanzlichen Saprobien. (1908). *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 26(7), 505–519. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1908.tb06722.x>
- Kopf, R. K., Finlayson, C. M., Humphries, P., Sims, N. C., & Hladyz, S. (2015). Anthropocene Baselines: Assessing Change and Managing Biodiversity in Human-Dominated Aquatic Ecosystems. *BioScience*, 65(8), 798–811. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv092>
- Kumar, G., Farrell, E., Reaume, A. M., Eble, J. A., & Gaither, M. R. (2022). One size does not fit all: Tuning eDNA protocols for high- and low-turbidity water sampling. *Environmental DNA*, 4(1), 167–180. <https://doi.org/10.1002/edn3.235>
- Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. (2016). Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 16(6), 1401–1414. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12522>
- Lawson Handley, L., Read, D. S., Winfield, I. J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., Hahn, C., Blackman, R., Wilcox, R., Donnelly, R., Szitenberg, A., & Hänfling, B. (2019). Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England's largest lake. *Environmental DNA*, 1(1), 26–39. <https://doi.org/10.1002/edn3.5>
- Lawton, J. H. (1999). Are There General Laws in Ecology? *Oikos*, 84(2), 177–192. <https://doi.org/10.2307/3546712>
- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., Hart, M. M., Powell, J. R., Klironomos, J. N., Pauls, K. P., Swanton, C. J., Trevors, J. T., & Dunfield, K. E. (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(12), 2977–2991. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020>
- Li, J., Lawson Handley, L. J., Harper, L. R., Brys, R., Watson, H. V., Di Muri, C., Zhang, X., & Hänfling, B. (2019). Limited dispersion and quick degradation of environmental DNA in fish ponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA*, 1(3), 238–250. <https://doi.org/10.1002/edn3.24>

- Lodge, D. M., Turner, C. R., Jerde, C. L., Barnes, M. A., Chadderton, L., Egan, S. P., Feder, J. L., Mahon, A. R., & Pfrender, M. E. (2012). Conservation in a cup of water: Estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA: NEWS AND VIEWS: PERSPECTIVE. *Molecular Ecology*, 21(11), 2555–2558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05600.x>
- Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1987). Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), 2948–2952. <https://doi.org/10.1128/AEM.53.12.2948-2952.1987>
- Malard, F., Verdier, H., Konecny-Dupré, L., Eme, D., Douady, C. J., & Lefébure, T. (2022). *Subterranean species inventory in the molecular era*. 9.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., ... Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), Article 7057. <https://doi.org/10.1038/nature03959>
- Mariani, S., Baillie, C., Colosimo, G., & Riesgo, A. (2019). Sponges as natural environmental DNA samplers. *Current Biology*, 29(11), R401–R402. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.031>
- Markert, B. A., Breure, A. M., & Zechmeister, H. G. (2003). *Bioindicators and Biomonitors*. Elsevier.
- Martellini, A., Payment, P., & Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Research*, 39(4), 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.012>
- Marzin, A. (2013). *Ecological assessment of running waters using bio-indicators: Associated variability and uncertainty*. 203.
- Marzin, A., Delaigue, O., Logez, M., Belliard, J., & Pont, D. (2014). Uncertainty associated with river health assessment in a varying environment: The case of a predictive fish-based index in France. *Ecological Indicators*, 43, 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.02.011>
- Mauvisseau, Q., Harper, L. R., Sander, M., Hanner, R. H., Kleyer, H., & Deiner, K. (2022). The Multiple States of Environmental DNA and What Is Known about Their Persistence in Aquatic Environments. *Environmental Science & Technology*, 56(9), 5322–5333. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07638>
- Mauvisseau, Q., Kalogianni, E., Zimmerman, B., Bulling, M., Brys, R., & Sweet, M. (2020). eDNA-based monitoring: Advancement in management and conservation of critically endangered killifish species. *Environmental DNA*, 2(4), 601–613. <https://doi.org/10.1002/edn3.92>
- Merkes, C. M., McCalla, S. G., Jensen, N. R., Gaikowski, M. P., & Amberg, J. J. (2014). Persistence of DNA in Carcasses, Slime and Avian Feces May Affect Interpretation of

- Environmental DNA Data. *PLOS ONE*, 9(11), e113346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113346>
- Ministère de la Transition Écologique et de la Cohésion des territoires - Ministère de la Transition Énergétique, 2021. <https://www.ecologie.gouv.fr/gestion-leau-en-france>
- Mondy, C. P., Villeneuve, B., Archaimbault, V., & Usseglio-Polatera, P. (2012). A new macroinvertebrate-based multimetric index (I2M2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators*, 18, 452–467. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.12.013>
- Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., & Arciola, C. R. (2011). Extracellular DNA in Biofilms. *The International Journal of Artificial Organs*, 34(9), 824–831. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000051>
- Moushomi, R., Wilgar, G., Carvalho, G., Creer, S., & Seymour, M. (2019). Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of *Daphnia magna* mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. *Scientific Reports*, 9(1), 12500. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48984-7>
- Nelson-Chorney, H. T., Davis, C. S., Poesch, M. S., Vinebrooke, R. D., Carli, C. M., & Taylor, M. K. (2019). Environmental DNA in lake sediment reveals biogeography of native genetic diversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 17(6), 313–318. <https://doi.org/10.1002/fee.2073>
- Nevers, M. B., Przybyla-Kelly, K., Shively, D., Morris, C. C., Dickey, J., & Byappanahalli, M. N. (2020). Influence of sediment and stream transport on detecting a source of environmental DNA. *PLOS ONE*, 15(12), e0244086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244086>
- Niemi, G. J., & McDonald, M. E. (2004). Application of Ecological Indicators. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 89–111.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., & Kristiansson, E. (2009). The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters*, 296(1), 97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01618.x>
- Ogram, A., Sayler, G. S., & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7(2), 57–66. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X)
- Ormerod, S. J., Dobson, M., Hildrew, A. G., & Townsend, C. R. (2010). Multiple stressors in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 55(s1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02395.x>
- Parducci, L., Bennett, K. D., Ficetola, G. F., Alsos, I. G., Suyama, Y., Wood, J. R., & Pedersen, M. W. (2017). Ancient plant DNA in lake sediments. *New Phytologist*, 214(3), 924–942. <https://doi.org/10.1111/nph.14470>

- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 29(22), 4258–4264. <https://doi.org/10.1111/mec.15643>
- Pedersen, M. W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., Sarkissian, C. D., Haile, J., Hellstrom, M., Spens, J., Thomsen, P. F., Bohmann, K., Cappellini, E., Schnell, I. B., Wales, N. A., Carøe, C., Campos, P. F., Schmidt, A. M. Z., Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Orlando, L., & Willerslev, E. (2015). Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1660), 20130383. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0383>
- Péguin, M. (2013). > *Les écosystèmes forestiers* > *Les écosystèmes marins et côtiers* > *Les écosystèmes urbains* > *Les écosystèmes montagnards* > *Les agroécosystèmes*. 24.
- Piaggio, A. J., Engeman, R. M., Hopken, M. W., Humphrey, J. S., Keacher, K. L., Bruce, W. E., & Avery, M. L. (2014). Detecting an elusive invasive species: A diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 14(2), 374–380. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12180>
- Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, 131–144. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 109–116. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159>
- Piñol, J., Mir, G., Gomez-Polo, P., & Agustí, N. (2015). Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 819–830. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12355>
- Piper, A. M., Batovska, J., Cogan, N. O. I., Weiss, J., Cunningham, J. P., Rodoni, B. C., & Blacket, M. J. (2019). Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *GigaScience*, 8(8), giz092. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz092>
- Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civade, R., Jean, P., Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H., & Dejean, T. (2018). Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports*, 8(1), 10361. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>
- Postel, S. and Richter, B.D. (2003) *Rivers for Life: Managing Water for People and Nature*. Island Press, Washington DC.
- Postel, S.L. and Carpenter, S.R. (1997) *Freshwater Ecosystem Services*. In: Daily, G., Ed., *Nature's Services*, Island Press, Washington DC, 195-214.



- Qadri, R., & Faiq, M. A. (2020). Freshwater Pollution: Effects on Aquatic Life and Human Health. In H. Qadri, R. A. Bhat, M. A. Mehmood, & G. H. Dar (Eds.), *Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation* (pp. 15–26). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8277-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8277-2_2)
- Rahel, F. J. (2004). *Unauthorized Fish Introductions: Fisheries Management of the People, for the People, or by the People?* 14.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Gough, K. C. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450–1459. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 94(3), 849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Reyjol, Y., & Spyrtatos, V. (2011). *Perspectives en vue du 2e cycle DCE – Eaux de surface continentales*. 31.
- Rivera, S. (2022). Biofilms aquatiques : capteurs de l'ADN environnemental et révélateurs de la biodiversité des milieux aquatiques.
- Rivera, S. F., Rimet, F., Vasselon, V., Vautier, M., Domaizon, I., & Bouchez, A. (2022). Fish eDNA metabarcoding from aquatic biofilm samples: Methodological aspects. *Molecular Ecology Resources*, 22(4), 1440–1453. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13568>
- Rivera, S. F., Vasselon, V., Mary, N., Monnier, O., Rimet, F., & Bouchez, A. (2021). Exploring the capacity of aquatic biofilms to act as environmental DNA samplers: Test on macroinvertebrate communities in rivers. *Science of The Total Environment*, 763, 144208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144208>
- Rodriguez-Ezpeleta, N., Morissette, O., Bean, C. W., Manu, S., Banerjee, P., Lacoursière-Roussel, A., Beng, K. C., Alter, S. E., Roger, F., Holman, L. E., Stewart, K. A., Monaghan, M. T., Mauvisseau, Q., Mirimin, L., Wangensteen, O. S., Antognazza, C. M., Helyar, S. J., de Boer, H., Monchamp, M.-E., ... Deiner, K. (2021). Trade-offs between reducing complex terminology and producing accurate interpretations from environmental DNA: Comment on “Environmental DNA: What’s behind the term?” by Pawlowski et al., (2020). *Molecular Ecology*, 30(19), 4601–4605. <https://doi.org/10.1111/mec.15942>
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Zinger, L., Kinziger, A., Bik, H. M., Bonin, A., Coissac, E., ... & Narum, S. (2021). Biodiversity monitoring using environmental DNA. *Molecular ecology resources*, 21(5), 1405-1409.
- Salter, I. (2018). Seasonal variability in the persistence of dissolved environmental DNA (eDNA) in a marine system: The role of microbial nutrient limitation. *PLOS ONE*, 13(2), e0192409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192409>

- Schinegger, R., Trautwein, C., Melcher, A., Schmutz, S., 2012. Multiple human pressures and their spatial patterns in European running waters. *Water and Environment Journal* 26 (2), 261–273.
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., von Gunten, U., & Wehrli, B. (2006). The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science*, 313(5790), 1072–1077. <https://doi.org/10.1126/science.1127291>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Shogren, A. J., Tank, J. L., Andruszkiewicz, E., Olds, B., Mahon, A. R., Jerde, C. L., & Bolster, D. (2017). Controls on eDNA movement in streams: Transport, Retention, and Resuspension. *Scientific Reports*, 7(1), 5065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05223-1>
- Shu, L., Chen, S., Li, P., & Peng, Z. (2022). Environmental DNA Metabarcoding Reflects Fish DNA Dynamics in Lentic Ecosystems: A Case Study of Freshwater Ponds. *Fishes*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/fishes7050257>
- Skoulikidis, N. T., Sabater, S., Datry, T., Morais, M. M., Buffagni, A., Dörflinger, G., Zogaris, S., del Mar Sánchez-Montoya, M., Bonada, N., Kalogianni, E., Rosado, J., Vardakas, L., De Girolamo, A. M., & Tockner, K. (2017). Non-perennial Mediterranean rivers in Europe: Status, pressures, and challenges for research and management. *Science of The Total Environment*, 577, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.147>
- Smith, L. (2003). *Biodiversity monitoring using environmental DNA: Can it detect all fish species in a waterbody and is it cost effective for routine monitoring?* 111.
- Snelder, T., Datry, T., Lamouroux, N., Larned, S., Eric, S., Pella, H., & Catalogne, C. (2013). Regionalization of patterns of flow intermittence from gauging station records. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, 10. <https://doi.org/10.5194/hessd-10-1511-2013>
- Søndergaard, M., & Jeppesen, E. (2007). Anthropogenic impacts on lake and stream ecosystems, and approaches to restoration. *Journal of applied ecology*, 44(6), 1089–1094.
- Soria, M., Gutiérrez-Cánovas, C., Bonada, N., Acosta, R., Rodríguez-Lozano, P., Fortuño, P., Burgazzi, G., Vinyoles, D., Gallart, F., Latron, J., Llorens, P., Prat, N., & Cid, N. (2020). Natural disturbances can produce misleading bioassessment results: Identifying metrics to detect anthropogenic impacts in intermittent rivers. *Journal of Applied Ecology*, 57(2), 283–295. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13538>
- Spear, M. J., Embke, H. S., Krysan, P. J., & Vander Zanden, M. J. (2021). Application of eDNA as a tool for assessing fish population abundance. *Environmental DNA*, 3(1), 83–91. <https://doi.org/10.1002/edn3.94>
- Steffan, R. J., Goksøyr, J., Bej, A. K., & Atlas, R. M. (1988). Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(12), 2908–2915.

<https://doi.org/10.1128/aem.54.12.2908-2915.1988>

- Stewart, K. A. (2019). Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation*, 28(5), 983–1001. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01709-8>
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015a). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85–92.
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015b). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>
- Stubbington, R., Chadd, R., Cid, N., Csabai, Z., Miliša, M., Morais, M., Munné, A., Pařil, P., Peřić, V., Tziortzis, I., Verdonschot, R. C. M., & Datry, T. (2018). Biomonitoring of intermittent rivers and ephemeral streams in Europe: Current practice and priorities to enhance ecological status assessments. *Science of The Total Environment*, 618, 1096–1113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.137>
- Suding, K. N., Gross, K. L., & Houseman, G. R. (2004). Alternative states and positive feedbacks in restoration ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.10.005>
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press.
- Tachet, H., Philippe, R., Bournaud, M., & Usseglio-Polatera, P. (2002). *Invertébrés D'eau Douce. Systematique, Biologie, Ecologie*.
- Thalinger, B., Kirschner, D., Pütz, Y., Moritz, C., Schwarzenberger, R., Wanzenböck, J., & Traugott, M. (2021). Lateral and longitudinal fish environmental DNA distribution in dynamic riverine habitats. *Environmental DNA*, 3(1), 305–318. <https://doi.org/10.1002/edn3.171>
- Thomas, A. C., Tank, S., Nguyen, P. L., Ponce, J., Sinnesael, M., & Goldberg, C. S. (2020). A system for rapid eDNA detection of aquatic invasive species. *Environmental DNA*, 2(3), 261–270. <https://doi.org/10.1002/edn3.25>
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012). Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLOS ONE*, 7(8), e41732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>
- Tsuji, S., & Shibata, N. (2021). Identifying spawning events in fish by observing a spike in environmental DNA concentration after spawning. *Environmental DNA*, 3(1), 190–199. <https://doi.org/10.1002/edn3.153>
- Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., & Yamanaka, H. (2019). The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1(2), 99–108.

<https://doi.org/10.1002/edn3.21>

- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), 676–684. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206>
- Turner, C. R., Uy, K. L., & Everhart, R. C. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 183, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017>
- UICN France (2013). Panorama des services écologiques fournis par les milieux naturels en France - volume 2.3 : les écosystèmes urbains. Paris, France.
- Van Looy, K., Tormos, T., & Souchon, Y. (2014). Disentangling dam impacts in river networks. *Ecological Indicators*, 37, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.10.006>
- Vasselon, V. (2017). *Barcoding et bioindication: Développement du metabarcoding des diatomées pour l'évaluation de la qualité des cours d'eau*. 298.
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., & Melillo, J. M. (1997). Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science*, 277(5325), 494–499. <https://doi.org/10.1126/science.277.5325.494>
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S. E., Sullivan, C. A., Liermann, C. R., & Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), Article 7315. <https://doi.org/10.1038/nature09440>
- Wasson, J. G., Malavoi, J. R., & Maridet, L. (1998). *Impacts écologiques de la chenalisation des rivières* (Vol. 14). Editions Quae.
- West, K. M., Richards, Z. T., Harvey, E. S., Susac, R., Grealy, A., & Bunce, M. (2020). Under the karst: Detecting hidden subterranean assemblages using eDNA metabarcoding in the caves of Christmas Island, Australia. *Scientific Reports*, 10(1), 21479. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78525-6>
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Gulf Professional Publishing.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Lowe, W. H., & Schwartz, M. K. (2015). Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Conservation Genetics Resources*, 7(3), 639–641. <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0465-z>
- Williams, K. E., Huyvaert, K. P., & Piaggio, A. J. (2017). Clearing muddied waters: Capture of environmental DNA from turbid waters. *PLOS ONE*, 12(7), e0179282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179282>
- Yamahara, K. M., Preston, C. M., Birch, J., Walz, K., Marin, R., Jensen, S., Pargett, D., Roman, B., Ussler, W., Zhang, Y., Ryan, J., Hobson, B., Kieft, B., Raanan, B., Goodwin, K. D., Chavez, F. P., & Scholin, C. (2019). In situ Autonomous Acquisition and Preservation of Marine Environmental DNA Using an Autonomous Underwater Vehicle. *Frontiers in*

*Marine Science*, 6, 373. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00373>

- Yu, W. H., Li, N., Tong, D. S., Zhou, C. H., Lin, C. X. (Cynthia), & Xu, C. Y. (2013). Adsorption of proteins and nucleic acids on clay minerals and their interactions: A review. *Applied Clay Science*, 80–81, 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.06.003>
- Zhao, B., van Bodegom, P. M., & Trimbos, K. (2021). The particle size distribution of environmental DNA varies with species and degradation. *Science of The Total Environment*, 797, 149175. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149175>
- Zulkefli, N. S., Kim, K.-H., & Hwang, S.-J. (2019). Effects of Microbial Activity and Environmental Parameters on the Degradation of Extracellular Environmental DNA from a Eutrophic Lake. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijerph16183339>

## 6. Annexe I

Macrophytes			
Cours d'eau	IBMR	Indice biologique macrophytique en rivière	NF T90-395 (2003-10-01). Qualité de l'eau – Détermination de l'indice biologique macrophytique en rivière (IBMR) NF EN 14184 (avril 2014). Qualité de l'eau – Guide pour l'étude des macrophytes aquatiques dans les cours d'eau
Plans d'eau	IBML	Indice biologique macrophytique lacustre	NF EN 15460 (2008-02-01). Qualité de l'eau – Guide pour l'étude des macrophytes dans les lacs XP T90-328 Décembre 2010. Qualité de l'eau – Échantillonnage des communautés de macrophytes en plans d'eau FD T90-728 Décembre 2017. Aide à l'application de la norme XP T90-328:2010
DIATOMÉES			
Cours d'eau	IBD	Indice biologique diatomées	NF T90-354 (Avril 2016). Qualité de l'eau – Échantillonnage, traitement et analyse de Diatomées benthiques en cours d'eau et canaux. Cette norme a remplacé celle de même indice de décembre 2007 portant sur la « Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD) ». NF EN 15708 (2010-01-01). Qualité de l'eau – Guide pour l'étude, l'échantillonnage et l'analyse en laboratoire du phytobenthos dans les cours d'eau peu profonds NF EN 13946 (2014-04-12). Qualité de l'eau – Guide pour l'échantillonnage en routine et le prétraitement des diatomées benthiques de rivières et de plans d'eau. A remplacé la norme de juillet 2003, qui ne portait que sur les rivières NF EN 14407 (2014-04-26). Qualité de l'eau – Guide pour l'identification et le dénombrement des échantillons de diatomées benthiques de rivières et de lacs . A remplacé la norme d'octobre 2004, qui ne portait que sur les rivières
ADN	-	-	FD CEN/TR 17245 (T90-878). Décembre 2018. Rapport technique pour l'échantillonnage en routine de diatomées benthiques dans les rivières et les plans d'eau adapté pour les analyses en metabarcoding FD CEN/TR 17244 (T90-879). Décembre 2018. Rapport technique relatif à la gestion des codes barres Diatomées
Phytoplancton			
Cours d'eau et plans d'eau	IPLAC	Indice Phytoplancton Lacustre	NF EN 15204 (2006-12-01). Qualité de l'eau – Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl) NF EN 16698 (2015-11-14). Qualité de l'eau – Lignes directrices sur l'échantillonnage quantitatif et qualitatif du phytoplancton dans les eaux intérieures XP T90-719 Septembre 2017. Qualité de l'eau – Échantillonnage du phytoplancton dans les eaux intérieures
Invertébrés			
Cours d'eau	MPCE(I2M2)	Macro-invertébrés petits cours d'eau - Indice Invertébrés Multi-Métriques	NF T90-388 (décembre 2020). Qualité de l'eau – Analyse d'échantillons contenant des macro-invertébrés de cours d'eau, canaux et plans d'eau – Qualité de l'eau – Traitement au laboratoire d'échantillons contenant des macro-invertébrés de cours d'eau. Cette norme homologuée a remplacé la norme expérimentale XP T90-388 de juin 2010 GA T90-788 (2015-03-01) : Qualité de l'eau – Guide d'application de la norme expérimentale XP T90-388 (Traitement au laboratoire d'échantillons contenant des macro-invertébrés de cours d'eau). NF T90-333 (Septembre 2016). Qualité de l'eau – Prélèvement des macro-invertébrés aquatiques en rivières peu profondes». Cette norme homologuée a remplacé la norme expérimentale XP T90-333 (2009-09-01) GA T90-733 (2012-03-01). Qualité de l'eau – Guide d'application de la norme expérimentale XP T90-333:2009 (prélèvement des macro-invertébrés aquatiques en rivières peu profondes)
	MGCE-I2M2	Macro-invertébrés grands cours d'eau - Indice Invertébrés Multi-Métriques	XP T90-337 (2019). Prélèvements des macro-invertébrés aquatiques en rivières profondes et canaux
	IBGN	Indice Biologique Globale Normalisé	NF T90-350 (2004-03-01). Qualité de l'eau – Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN). Cette méthode d'échantillonnage n'est pas utilisée en réseaux DCE, mais l'indice lui-même sert au rapportage DCE, pour le 1er et le 2ème cycle. GA T90-374 (2006-12-01). Qualité de l'eau – Guide d'application de la norme NF T90-350:2004, IBGN (Détermination de l'indice biologique global normalisé)
Sous-écoulements des cours d'eau	-	-	NF EN 16772 Juin 2016. Qualité de l'eau – Lignes directrices relatives aux méthodes d'échantillonnage des invertébrés dans la zone hyporhéique de rivières.
Plans d'eau	IML	Indice macroinvertébrés lacustres	Indice Macroinvertébrés Lacustres (IML) - Guide technique 2022
Poissons			
Cours d'eau	IPR	Indice poissons rivière	NF T90-344 (2004-05-01, révisée 2011-07-01). Qualité de l'eau – Détermination de l'indice poissons rivière (IPR). XP T90-383 (2008-05-01). Qualité de l'eau – Échantillonnage des poissons à l'électricité dans le cadre des réseaux de suivi de peuplements de poissons en lien avec la qualité des cours d'eau. NF EN 14011 (2003-07-01). Qualité de l'eau – Échantillonnage des poissons à l'électricité.
Plans d'eau	IIL	Indice ichtyologique lacustre	NF EN 14757 (2005-11-01) – T90-366. Qualité de l'eau – Échantillonnage des poissons à l'aide de filets maillants
Estuaires	-	-	NF T90-701 (2021-07-01) – Qualité de l'eau – Échantillonnage au chalut à perche des communautés de poissons dans les estuaires. Remplace la XP de mars 2011.

Tableau 6-1: Indices biotiques utilisés pour la bioindication.



# Chapitre II

## Aspects fondamentaux : production et états de l'ADNe

---



## 1. Résumé

Détecter des organismes aquatiques par l'ADNe qu'ils émettent dans l'environnement requiert des connaissances sur « l'écologie » de l'ADNe, à savoir son taux de production, son état et sa taille (intra ou extra-cellulaire), sa persistance et son transport. Jusqu'à présent, les recherches se sont concentrées essentiellement sur les vertébrés et leur ADNe mitochondrial, rendant ces résultats difficilement transférables aux autres groupes biologiques comme les macro-invertébrés, pourtant essentiels en bioindication. En effet, il est probable que les caractéristiques des particules d'ADNe varient fortement entre les espèces aquatiques et les compartiments génétiques, avec des conséquences directes sur la détection des espèces. Ce chapitre, présenté sous la forme d'un article qui sera prochainement soumis dans la revue *Environmental DNA*, se propose d'étudier deux paramètres clés liés à l'écologie de l'ADNe : **la production** (origine et quantité) et **les états** (caractéristiques physiques) des particules émises dans l'eau.

Par le biais d'une expérience en microcosmes, nous avons comparé la concentration d'ADNe mitochondrial et nucléaire et l'état des particules émises par quatre taxons aquatiques éloignés phylogénétiquement : des poissons zèbre, des têtards de grenouille verte, des isopodes et des mollusques. Des échantillons d'eau ont été prélevés à différents temps après l'ajout des organismes dans les microcosmes (après 7, 14 et 21 jours), puis filtrés à travers une série de filtres à porosité décroissante (allant de 0,2 à 8  $\mu\text{m}$ ). Cette méthode permet de séparer les particules d'ADNe par leur taille en les piégeant sur des filtres, et permet d'inférer indirectement l'état des particules. Par exemple, on peut supposer que des particules d'ADNe piégées sur le filtre à 8  $\mu\text{m}$  sont plutôt de grandes tailles, et correspondent probablement à des cellules entières ou morceaux de tissus détachés des organismes (ADNe intracellulaire). Nous avons quantifié l'ADNe récolté fraction de taille par qPCR ciblant un gène nucléaire (ITS2) et un gène mitochondrial (16S).

Les résultats montrent que le taux de production et la taille des particules d'ADNe varient fortement entre les taxons, selon le compartiment génétique ciblé et, dans une moindre mesure, avec le moment d'échantillonnage. Ainsi, la production d'ADNe semblerait liée à des facteurs plus complexes que l'abondance et la densité d'organismes dans l'eau, tels que le métabolisme ou la physiologie des organismes.

En effet, à biomasse équivalente, les isopodes ont produit des quantités nettement inférieures (jusqu'à 1000 fois moins) à celles des autres taxons étudiés (mollusque, poisson, amphibien). Toutefois, en ciblant l'ADNe d'origine nucléaire, les quantités d'ADNe sont plus importantes et pourraient fournir une meilleure détection de ces taxons. Nous avons également observé une variabilité temporelle de la concentration des particules de l'ADNe et de leur état, en particulier avec l'ADNe d'origine nucléaire. En effet, nous avons observé une accumulation de petites particules d'ADNe au cours du temps. Ceci indique un lien complexe entre états, origine génomique (nucléaire ou mitochondriale) et persistance des particules d'ADNe dans l'environnement. Mis ensemble, ces résultats conduisent à repenser la manière d'échantillonner et d'analyser les données relatives à l'ADNe, en particulier pour les organismes qui libèrent de l'ADN en très petites quantités et tailles de particules, comme les isopodes.

## 2. Effet de l'espèce, du compartiment génétique et du temps sur la concentration et l'état des particules d'ADNe

**Titre en anglais : Concentration and particle size distribution of eDNA varies with species and organelles**

Héloïse Verdier<sup>1,2,3</sup>, Lara Konecny-Duprè<sup>1</sup>, Maïlys Gauthier<sup>1</sup>, Juliette Tariel-Adam<sup>1</sup> Tristan Lefébure<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France

<sup>2</sup> Eurofins Hydrobiologie France, Rue Lucien Cuenot, 54521 Maxéville, France

<sup>3</sup> INRAE, UR-Riverly, Centre de Lyon-Villeurbanne, 5 rue de la Doua CS70077, 69626 VILLEURBANNE Cedex, France

## 2.1. Abstract

Analysis of eDNA production and particle size distribution (PSD) is essential to understand the origin, state and dynamics of eDNA molecules in aquatic ecosystems. To date, research has focused on vertebrates and their mitochondrial eDNA. However, it is likely that the characteristics of eDNA molecules vary greatly between species and genetic compartments, with direct consequences for species detection. Using an indoor tank experiment, we compared the rate of mitochondrial and nuclear eDNA production and PSD of four distinct aquatic taxa (zebrafish, tadpole, isopod and mollusc). The tank water was sampled repeatedly and filtered through a series of filters with decreasing porosity. We quantified mitochondrial and nuclear eDNA at each size fraction by qPCR targeting a nuclear gene (ITS2) and a mitochondrial gene (16S). We found that the rate of production and the size of DNA particles varied greatly between taxa, possibly linked to functional traits and genetic compartments. We also observed temporal variability in the concentration and PSD of eDNA, particularly when targeting nuclear eDNA. These results lead to a rethinking of how to sample and analyse eDNA data, particularly for organisms that release eDNA in very small quantities and particle size such as isopods.

## 2.2. Introduction

Aquatic macro-organisms release DNA molecules into their environment, which are termed environmental DNA (eDNA). About a decade ago, eDNA sampling and analysis emerged as a non-invasive and sensitive approach to infer the presence of species (Ficetola et al., 2008; Jerde et al., 2011). Rapid methodological development in the field including sampling and extraction protocols, and analytical technologies (i.e. high-throughput sequencing, quantitative PCR and droplet digital PCR) have democratised the use of eDNA to study biodiversity. In freshwater ecosystems, eDNA has been frequently sampled from water to detect rare, threatened or invasive species (Biggs et al., 2015; Takahara et al., 2013; Thomsen et al., 2012) and to describe whole communities (Deiner et al., 2017). As the list of successful applications continues to grow, important international efforts have recently been made to standardise eDNA-based methods (Bruce et al., 2021) and integrate them into monitoring frameworks (Leese et al., 2018; Loeza-Quintana et al., 2020; Pilliod et al., 2019).

Despite its expanding use, we lack fundamental knowledge about the ecology of eDNA - its release, state, transport and persistence in an ecosystem (Barnes & Turner, 2016). These processes control the amount of eDNA at a given time and location, and ultimately determine our ability to use an eDNA signal to infer the presence of a given species. So far, studies have mainly focused on the transport (Deiner & Altermatt, 2014; Fremier et al., 2019; Jane et al., 2015; Shogren et al., 2017) and persistence (Barnes et al., 2014; Harrison et al., 2019; Sansom & Sassoubre, 2017) of eDNA in relation to environmental conditions. Water eDNA molecules can be transported from a few meters from its source to several kilometers, and persist from hours to a month (Sansom & Sassoubre, 2017; Seymour et al., 2018; Tsuji et al., 2017). While transport and persistence were found to be correlated with environmental factors (e.g. hydromorphology, season, Troth et al., 2021), these studies also suggested that eDNA itself is a mixture of complex and heterogeneous molecules (Shogren et al., 2019).

eDNA production and states, i.e. the physical forms of eDNA molecules after being shed by organisms, are two fundamental aspects in understanding and interpreting eDNA signals. Together with the rate of degradation, the rate of eDNA production determines the amount of DNA of a given species in the ecosystem. It has been established that eDNA production covaries with organism biomass (Maruyama et al., 2014) and is influenced by environmental factors such as temperature (Jo, Murakami, et al., 2019; Lacoursière-Roussel et al., 2016). The production of eDNA is often estimated on a global level without taking into account the possible co-production and co-existence of different states and forms of eDNA molecules. Conceptually, eDNA is a pool of DNA molecules of varying states ranging from intracellular DNA (e.g. contained in tissues or cells) to extracellular DNA (e.g. organellar DNA, single or double stranded DNA fragments; (Mauvisseau et al., 2022).

Depending on their state, eDNA particles may have different structure, size and weight, and thus specific spatio-temporal dynamics (Harrison et al., 2019; Jo, Arimoto, et al., 2019; Nagler et al., 2018). For example, heavier intracellular eDNA molecules could rapidly settle to the bottom of the water column and become undetectable (Turner et al., 2014). Conversely, smaller particles such as mitochondria or free DNA fragments could be further subject to dispersion. Finally, the persistence of eDNA molecules in the environment depends on their states once produced. For example, membrane-protected eDNA particles (e.g. mitochondria or cells) remain intact longer than eDNA in free forms such as extracellular fragments (Harrison et al., 2019).

Overall, these results demonstrate the importance of improving the fundamental knowledge of eDNA states to understand their spatio-temporal dynamics for application in routine biomonitoring (Jo et al., 2021).

One way to study the state of eDNA is to analyse eDNA particle size distribution (PSD). By sequentially filtering a volume of water through membranes with decreasing pore size, eDNA molecules are separated by size and then quantified. From these estimates, we can then infer the PSD as a proxy of eDNA states (i.e. proportion of intracellular, organellar or extracellular). So far, eDNA PSD analyses have been mostly done on teleosteans (Barnes et al., 2021; Jo, Arimoto, et al., 2019; Turner et al., 2014; Wilcox et al., 2015) and show a similar pattern between teleostean species. Although eDNA particles are present in different states and cellular structures, particles between 1-10  $\mu\text{m}$  or larger predominate. This suggests that teleostean eDNA is mainly in intracellular form (i.e. tissue or whole cells). However, due to many biological differences –biomass, metabolism, respiration, reproduction, ...–, it is possible that other aquatic taxa release eDNA at different concentrations and states. Moushomi et al. (2019) were the first to analyse eDNA PSD for an organism different than a fish: the cladocera *Daphnia* (*Daphnia magna* Strauss 1820). They found that *Daphnia* eDNA particles were smaller than those obtained with teleostean, suggesting that the eDNA PSD may vary extensively between taxa. To test this hypothesis, Zhao et al., (2021) analysed the eDNA PSD and their degradation for three aquatic taxa simultaneously (a fish, a snail and daphnia) and concluded that the three taxa release eDNA in different PSD. Altogether, these first results show that the PSD is highly taxa-dependent and reinforces the need to conduct similar experiments with other organisms with contrasting anatomies and physiologies.

Most eDNA PSD analyses have only considered mitochondrial DNA (mt-DNA). Historically, mt-DNA has been widely used in DNA-based approaches due to i) its presence in multiple copies per cell, increasing the probability of mt-DNA detection and ii) the large amount of mt-DNA sequences in databases especially for macroorganisms (e.g. MitoFish; Iwasaki et al., 2013), increasing the chance of taxonomic affiliation in metabarcoding studies. However, some authors suggested that using nuclear markers can increase the yield and the detectability of eDNA, and therefore be very useful to detect eDNA at very low concentration (i.e. < 100 target DNA copies/reaction; Ellison et al., 2006). For example, Jo et al. (2019) showed that nuclear DNA (nu-DNA) was more concentrated at a certain eDNA particle size than mt-DNA and allowed better detection of Jack Mackerel.

Although nu-DNA showed promising results, its production and states are probably very different from mt-DNA and further investigation is needed to evaluate its potential (Foran, 2006; Minamoto et al., 2017). Altogether, the joint analysis of nu- and mt-eDNA production and PSD for a diverse set of aquatic taxa is warranted to propose robust and sensitive eDNA biomonitoring tools.

We conducted a tank experiment to explore the state of nuclear and mitochondrial eDNA released by taxonomically distant species over time. To do this, we selected four model taxa with contrasting lifestyles and physiologies: zebrafish (*Danio rerio*), a tadpole (*Rana ridibunda*), an aquatic snail (*Physa acuta*) and an isopod (*Asellus aquaticus*). We sequentially filtered water samples at three sampling times (after 7, 14 and 21 days) with filters of decreasing pore size (8 µm - 1.2 µm - 0.6µm - 0.2µm) and precipitated the filtered sample to recover eDNA particles below 0.2 µm. We quantified eDNA from each size fractions by targeting a mitochondrial gene (16S) and a nuclear gene (ITS2) by quantitative PCR (qPCR). We hypothesised that taxa, genetic compartment (mt-eDNA or nu-eDNA) and sampling timing influence i) the eDNA concentration and ii) the eDNA particle size distribution.

## 2.3. Materials and methods

### 2.3.1. Model species

To explore the influence of taxa, genetic compartment and sampling timing on eDNA production and PSD, we conducted an indoor tank experiment at the University of Lyon 1 (69, France), from November to December 2021. We chose four freshwater species easy to maintain in laboratory conditions with contrasted physiology, leading probably to different eDNA production and PSD: adult zebrafish (*Danio rerio*), green frog tadpoles (*Rana ridibunda*), snail (*Physa acuta*) and isopods (*Asellus aquaticus*). Zebrafish and tadpoles were purchased on specialised farms, the Plateau de Recherche Expérimentale de Criblage *In Vivo* (IGFL, France) and François production (Pierrelate, France), respectively. Snails and isopods were sampled in October 2021, from two freshwater ponds located in an urban area (45 °81'28" N, 4 °96'48" E, 700 m<sup>2</sup> and 45 °78'01" N, 4 °86'79" E, 440 m<sup>2</sup>, France, respectively). In each species, we chose individuals with equivalent sizes to limit variation in eDNA release due to biomass. Animals were acclimated to laboratory conditions during seven days prior to the experiment.

### 2.3.2. Experimental setup

For each taxa, three tank experiments were simultaneously run as replicates. A tank contained one taxa only for a total of 12 tanks (Fig. 2-1). The fish tanks and tadpole tanks were placed in the same climate controlled-room, on a platform dedicated to the breeding of vertebrates (ACSED, France) while snails and isopods were kept in two other separate climate-controlled rooms (University of Lyon, 69, France). Each glass tank (25 x 20 x 40 cm) contained 20 L of osmotic water, oxygenated with aquarium bubblers and with a constant temperature of  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  for zebrafish,  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  for tadpoles and  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (mean  $\pm$  SD) for snails and isopods and a 12 h daylight cycle. As the taxa have very different biomass per individual, we calculated for each taxon the density needed to reach an equivalent biomass between the tanks. The density of individuals were: 10 individuals per fish tank, 20 individuals per tadpoles tank, 100 individuals per snails tank and 150 individuals in isopods tank. This experiment was approved by the Comité en expérimentation animale de l'université Claude Bernard Lyon I (CEEA-55, agreement no. DR2020-34v2).

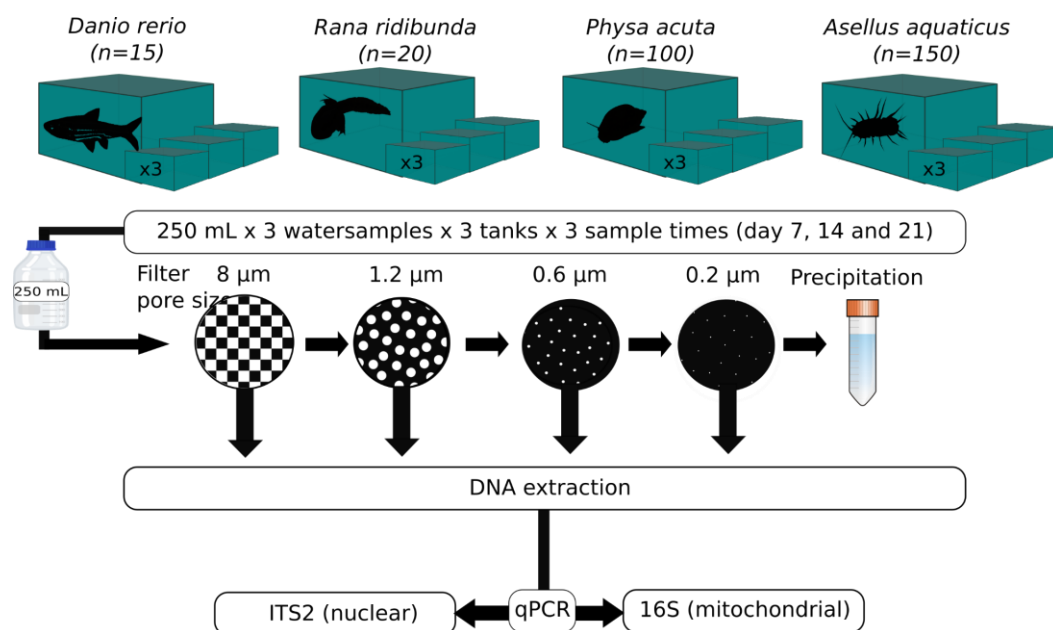


Figure 2-1: Experimental design



### 2.3.3. eDNA sampling

We collected eDNA from the tanks at three repeated sampling times: 7 days, 14 days and 21 days after the start of the experiment. As the eDNA concentration is known to peak during the first few days of animal acclimation (Maruyama et al., 2014; Sansom & Sassoubre, 2017), the first sampling was performed on day 7 in order to reach the eDNA concentration at equilibrium. Then, since eDNA is a molecule sensitive to degradation, performing three sampling times allowed us to estimate the repeatability of eDNA quantification and PSD analysis. At each time point, we collected three 250 mL water samples per tank from the top to the bottom of the water column with a Pipet-Aid® controller (Poly Labo, Paul Block & Cie, France) and single-used serological pipettes. Water volumes within tanks were kept constant by adding 750 mL of osmotic tap water after each sample collection. Water samples were transferred in 500 mL glass sterilised bottles. Immediately after sampling, water samples were filtered in a laminar flow hood (Noroit, H-BOX, France) at the ACSED platform (University of Lyon, France) using a glass vacuum filtration device (Merck Millipore, Germany). Water samples were sequentially filtered on filters with four decreasing porosities (8, 1.2, 0.6 and 0.2 µm µm pore size, MCE Membrane, Merck Millipore, Germany). Filters were placed into 5 mL LoBind® eppendorf tubes and stored at -80 °C until extraction. A volume of 14 mL of the remaining water fraction filtered at 0.2 µm was directly precipitated by adding 35 mL of 96% ethanol, 1.4 mL of 3 M sodium acetate and 10 µL of glycogen in 50 mL falcon tubes. The tubes were incubated for three days at -80 °C.

### 2.3.4. eDNA extraction

DNA from filters was extracted using a modified protocol of the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen™ DNA Blood and Tissue kit). Briefly, 500 µL of ATL buffer and 40 µL of proteinase K were added into each 5 mL tubes containing filters, vortexed 15 sec and incubated at 56 °C in a shaking water bath (Mettler GmbH + Co.KG, WB 14, Schwabach, Germany) at 150 rpm for 48 hours. After incubation, 400 µL of AL buffer and 400 µL of ethanol 96% were added into the tubes and vortexed 15 sec. Next steps were done following manufacturer's recommendations. The precipitated samples, after incubation at -80 °C, were centrifuged at 1200 rpm for 35 minutes at 4 °C. The pellets obtained were resuspended in 100 µL of 1 X TE buffer and extracted with a commercial kit (Qiagen™ DNA Blood and Tissue kit). Extracted DNA samples were placed at -4 °C before quantification.

### 2.3.5. Prevention of contamination

Before the experiment, tanks, sampling and filtration material (e.g. glass bottles, filtration devices) were decontaminated with 5% bleach ( $\pm 2\%$ ), rinsed with osmosis water followed by a 15-min ultraviolet light (UVs) treatment. The species were placed in different rooms and the tanks were spaced 50 cm apart and covered with aluminium paper to protect the water from evaporation, and punctured using sterilised tweezers for aeration. Individuals were fed each day with non-animal food to control for potential eDNA input resulting from feeding. Excess food was removed 30 minutes after feeding with nets decontaminated with 5% bleach. Finally, extraction procedure from filters and precipitates was carried out in a flow-hood reserved to very low DNA concentration and decontaminated with 5% bleach and followed by a 15-min UVs treatment.

### 2.3.6. Negative controls

To trace potential contamination, we have set up four types of contamination controls: 1) experimental controls corresponding to four glass tanks containing osmotic water without target eDNA and placed in each climate-controlled room, 2) filtration and precipitation controls corresponding to sterile water that was filtered and precipitated with the same equipment and protocols than eDNA samples, 3) extraction controls corresponding to filters extracted with a commercial kit (Blood and Tissue kit, Qiagen) without having been in contact with water, 4) quantification controls corresponding to wells without DNA in qPCR plates.

### 2.3.7. Primer design and qPCR quantification

Quantitative PCR was used to quantify the eDNA released from each taxa, genetic compartment and time replicates. Species-specific primers were designed to amplify the nuclear (ITS2) and the mitochondrial (16S) genes of *D. rerio*, *R. ridibunda*, *P. acuta* and *A. aquaticus* (Table 2-1). Target genetic regions were selected based on i) the high genetic variability between species, ii) the possible presence of multiple copies within a cell and iii) the availability of genomic data on the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The amplification specificity of the primers was tested *in silico* using primer-BLAST (NCBI) and using an alignment of closely related sequences in NCBI.

The primer pairs were tested in qPCR for cross amplification using genomic DNA extracted from tissue samples (1 ng/μL) from target and non-target species in the experiment. The final primer sequences and concentrations, DNA targets, and primer annealing temperatures are shown in Table 2-1. The qPCR reaction volume was 10 μL consisting of 1X SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), 0.5 μM of primers and 2 μL of DNA. All samples including DNA, positive and negative controls were run in triplicate in 96 well-plates on a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). qPCR cycle started with an incubation at 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 10 sec and an annealing/extension step at 64 °C or 55 °C for 20 sec before a final melt curve from 65-95 °C (0.5 °C increments). Each qPCR plate included a seven-fold dilution series of the purified DNA amplicon as standard, at a concentration between 0 and 2.6 ± 0.5 ng/μL quantified by a QuBit 3.0 assay.

Taxa	Gene	Sequence (5'-3')	Amplicon length (bp)	Annealing T°C
<i>Rana ridibunda</i>	16S	F-AAGTTTAACGGCCGCGGTACCC R-ATCAGTTTCACTGATTGGAGAAAGG	125	64 °C
<i>Rana ridibunda</i>	ITS2	F-GGTACCCCGGTCTGACCCTC R-GCAGCCCGTACGGCTAGGCC	89	64 °C
<i>Danio rerio</i>	16S	F-GAAGACCCTTTGGAGCTTAAGG R-GAGGTTGTTTTTACTCCGTGG	125	64 °C
<i>Danio rerio</i>	ITS2	F-CACCGTCTCTCGACCCGTGG R-GGTCAGACCCACCGGCAGCC	111	64 °C
<i>Physa acuta</i>	16S	F-CCTTTCTATTGACACTAAAAGTGG R-CTAGTCCAACATCGAGGTCAC	118	55 °C
<i>Physa acuta</i>	ITS2	F-ACTAAATCAATCGAGCTCGTC R-GCTTGGACTTGAAACCACGG	104	64 °C
<i>Asellus aquaticus</i>	16S	F-GGTTTAAATGGCTGCAGTATCC R-CTTGTGTAATAAAAAGCCTACCTC	110	64 °C
<i>Asellus aquaticus</i>	ITS2	F-AGCTAGTAAACGGTTAAGGC R-CTACGACCCAAACGGCTTACG	108	64 °C

Tableau 2-1 :Species-specific primers sets for amplification of 16S and ITS2 gene in qPCR.

### 2.3.8. Data conversion and analysis

We hypothesised that taxa, genetic compartment and sampling time influence i) eDNA production and ii) particle size distribution. To test these two hypotheses, we converted the amount of DNA per qPCR reaction (in ng/2 $\mu$ L of reaction) to a number of eDNA copies per litre of tank water. This standardised unit is widely used for eDNA analysis and allows comparison of values between studies. Negative detections (NA) in any of the qPCR replicates were assigned a concentration of zero (Ellison et al., 2006). The DNA concentrations were then averaged over the triplicate qPCR measurements.

#### *(a) eDNA concentration*

To investigate the hypothesis that taxa, genetic compartment and sampling time influence the total concentration of eDNA, we summed the number of eDNA copies collected at all size fractions per water sample. This gives a total number of copies/L of tank water. The influence of the taxa, genetic compartment and sampling time on the eDNA concentration was tested using a linear mixed effects model (LMM) with the `lmer` function from the R package `lme4` and `lmerTest`. We fitted a model with taxa, genetic compartment and sampling time as fixed effects and tank replicates as random effects. We log<sub>10</sub> transformed the eDNA copy number to meet the normality assumption of the residuals. We used the functions of the 'performance' package to assess the quality of the model and reported the model selection procedure in the appendix. We tested the significance of each factor using likelihood ratio tests (LRT) between the models with and without the tested variable. The effect size of each parameter was measured using the 'eta\_sq' from the `ejstats` package, which gives the proportion of variance associated with each main effect and interaction effect (partial eta squared,  $\eta^2_p$ , Levine TR, Hullett CR, 2002). Finally, we performed pairwise post hoc comparisons using the 'emmeans' function (`emmeans` package, Lenth, 2019) to examine the differences between genetic compartments for each species.

*(b) Particle size and their frequency*

To investigate the hypothesis that taxa, genetic compartment and sampling time affect the PSD of eDNA, we used a multinomial baseline-category logit mixed effects model (MLMM) on the number of eDNA copies in each particle size fraction (i.e. 5 fractions: <0.2] - 0.2 - ]0.6 - 1.2] - >=8 ) using the 'mblogit' function in the 'mclgfit' R package (Elff, 2020). MLMM models belong to the category of generalised linear models and determine the probability that the data (here an eDNA particule) belongs to one of the groups (here one of the 5 particle size fraction) depending on one or more independent variables (here species, genetic compartment and sampling time).

In a MLMM model the probability that an eDNA particule  $i$  falls into the fraction  $j$  is:

$$\pi_{ij} = \begin{cases} \frac{\exp(\alpha_{j0} + \alpha_{j1}x_{1i} + \dots + \alpha_{jr}x_{ri})}{1 + \sum_{k>1} \exp(\alpha_{k0} + \alpha_{k1}x_{1i} + \dots + \alpha_{kr}x_{ri})} & \text{for } j > 1 \\ \frac{1}{1 + \sum_{k>1} \exp(\alpha_{k0} + \alpha_{k1}x_{1i} + \dots + \alpha_{kr}x_{ri})} & \text{for } j = 1 \end{cases}$$

Where  $j=1$  defines the baseline category, and the coefficients  $\alpha$  are used to describe the impact of the independent variables on  $\pi$ . The model can then be expressed in log-odds relative to the baseline:

$$\ln \frac{\pi_{ij}}{\pi_{i1}} = \alpha_{j0} + \alpha_{j1}x_{1i} + \dots + \alpha_{jr}x_{ri}$$

The best MLMM model selection was determined using the Akaike information criterion (Akaike, 1974). All plots were made with the ggplot2 package (Wickham, 2016) and all analyses were conducted using R (v 4.0.3).

## 2.4. Results

### 2.4.1. Outliers and qPCR assay performance

Most individuals survived for the duration of the experiment, although 60% of snail individuals died in one tank at the beginning of the experiment. In this tank, we quantified an abnormally high eDNA copy number (about ten times more) compared to the average DNA copy number in other tank replicates. We excluded this data from the following analysis. In all qPCR analysis, the R<sup>2</sup> values, slope, Y-intercept, and PCR efficiency (%) of the calibration curves were  $0.98 \pm 0.02$ ,  $-3.49 \pm 0.2$ ,  $-0.48 \pm 1.02$ ,  $95.3 \pm 5.6$  (mean  $\pm$  SD) for mt-eDNA and  $0.99 \pm 0.004$ ,  $-3.23 \pm 0.2$ ,  $2.07 \pm 1.06$ ,  $105.1 \pm 9.8$  for nu-eDNA. Despite the high qPCR efficiencies and previous specificity tests, we have detected a specificity problem of the primers amplifying the ITS2 gene of *Danio rerio*. Indeed, we observed multiple peaks (i.e. misaligned from the main target DNA peak) on the melting curve at Ct values below 30. This indicates a phenomenon of cross-amplification of non-target DNA that we were unable to resolve despite our efforts to design more specific primer pairs without success (i.e. over 15 primer pairs tested). As this specificity problem can lead to a significant bias in the eDNA quantity estimates, we ran two models, with and without the ITS2 data from *Danio rerio*. As the model findings were similar between the two models, we kept the *Danio rerio* data and discussed these results with caution.

### 2.4.2. Contaminations control

No contamination was observed in all qPCR blanks. However, we observed a low level of contamination (i.e. positive detection of target species) in 7 over 22 of the extraction blanks (max = 32, mean = 5, sd = 9 copies). This contamination represents less than 0.14% of the average number of copies quantified in the tanks containing organisms (i.e. between  $5 \times 10^3$  and  $4 \times 10^5$  eDNA copies/L). As the extraction blanks were processed at the same time and in the same flow hood as the DNA samples, it is possible that they were contaminated by splashing microdroplets under the hoods. However, the contamination levels are too low to influence our results. In the negative control tanks (i.e. containing osmotic water without organisms and with food) placed next to the tanks containing organisms, positive detections occurred sporadically with varying intensities, depending on the species and marker used.

The amphibian and mollusc control tanks showed a very low level of contamination: an average of 5 nu-eDNA copies/L and 25 mt-eDNA copies/L in the amphibian control tank, and 45 mt-eDNA copies/L and 23 nu-eDNA copies/L in the mollusc control tank. The average contamination level was higher in the isopod control tanks (410 copies of nu-eDNA/L) and in the zebrafish control tanks (15 363 copies of nu-eDNA/L) representing 8% and 14% of the average eDNA concentration in tanks containing organisms, respectively. In the latter case, contamination increased with the duration of the experiment and was mostly associated with filter pore size 0.6 and 1.2  $\mu\text{m}$ , and with the quantification of the nuclear gene. This result illustrates the problem of specificity of the primer pairs for the ITS2 *Danio rerio* gene described in section 2.4.1, which probably amplify non-targeted eDNA.

### 2.4.3. eDNA production

Two factors, the type of taxa and genetic compartment, significantly influenced the production of eDNA (LMM,  $p < 0.01$ ; Figure 2-2 and Table 2-2), while the sampling time had no significant effect (LRT,  $\chi^2(3) = 5.13$ ,  $p = .08$ ). First, the concentration of mt-eDNA varied between taxa from  $10^1$  to  $10^5$  copies/L of water: isopods ( $10$  to  $10^3$  copies/L), snails ( $10^3$  to  $10^4$  copies/L), fish ( $10^3$  to  $10^4$  copies/L) and amphibians ( $10^4$  to  $10^5$  copies/L). Second, the concentration of nu-eDNA was 2.5 to 5.5 times higher than that of mt-eDNA, except for amphibians where there was little variation in DNA copy number between the two genetic compartments (mt-eDNA =  $4.4 \times 10^5$ , nu-eDNA =  $4.3 \times 10^5$  averaged over the three sampling times and tank replicates). The LMM model revealed that taxa type ( $F(3) = 62.8$ ,  $p < .001$ ,  $\eta^2 p = .96$ , CI [0.88, 1.00]) has the largest effect on eDNA concentration, followed by genetic compartment ( $F(1) = 37$ ,  $p < .001$ ,  $\eta^2 = .16$ , CI [0.09, 1.00]).

Third, although the effect of sampling timing is not significant in the selected model, it becomes significant when we add the interaction terms between time and species ( $F(6) = 8.9$ ,  $p < .001$ ,  $\eta^2 = .03$ , CI [0.00, 1.00]). However, the model with interaction presents a problem of collinearity (VIF = 47.25) and non-normality of the residuals (Shapiro-Wilk test,  $p = .03$ ) which limits its interpretation. Overall, these results showed a weak effect of time which depends on the taxa: the eDNA concentration increase for isopods (from 65 to 4530 copies/L on average over the three tank replicates), decreased slightly over time (e.g. molluscs and teleosteans) or remain relatively stable as for amphibians (Fig. 2-2).

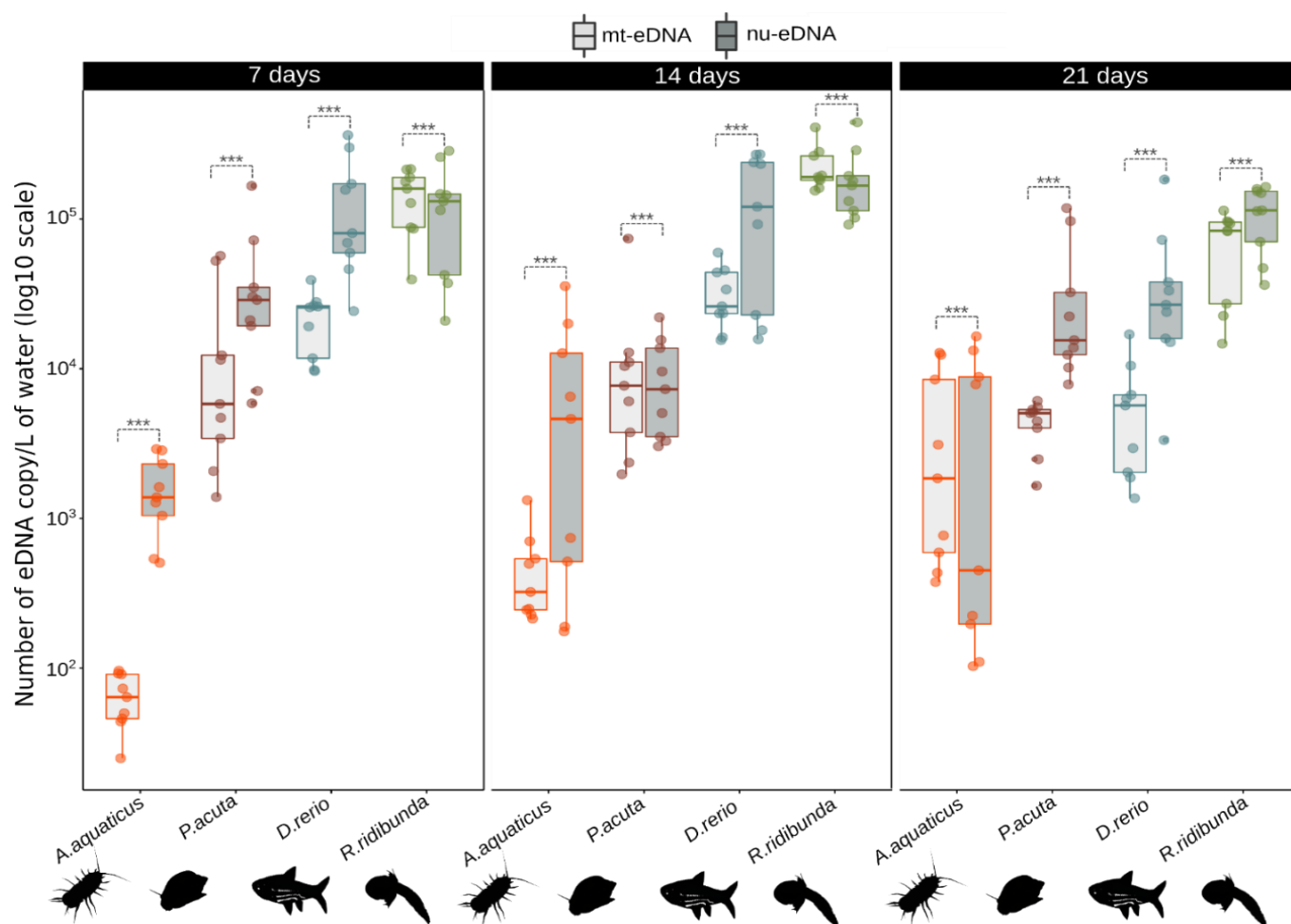


Figure 2-2: Number of mt-eDNA and nu-eDNA copies (eDNA copy/L of water in log scale) per species and sampling times (after 7, 14 and 21 days). Each point represents one water sample of one tank. The colours represent a species (orange = *Asellus aquaticus*, purple = *Physa acuta*, blue = *Danio rerio*, green = *Rana ridibunda*). The boxplots with the light grey fill represent mt-DNA and those with the dark grey fill represent nu-DNA.



Parameters	Df	Estimates	Confidence Interval	t	P
(Intercept)	13	2.64	2.4 – 2.9	19.98	<b>&lt; 0.001</b>
<b>Species</b>					
<i>Physa acuta</i>	8	1.13	0.84 – 1.42	6.83	<b>&lt; 0.001</b>
<i>Danio rerio</i>	8	1.59	1.3 – 1.9	9.6	<b>&lt; 0.001</b>
<i>Rana ridibunda</i>	8	2.19	1.9 – 2.5	13.25	<b>&lt; 0.001</b>
<b>Gene</b>					
Nuclear	201	0.43	0.29 – 0.57	6.085	<b>&lt; 0.001</b>
<b>Sampling time</b>					
14 days	201	0.14	-0.04 – 0.31	1.562	0.12
21 days	201	-0.06	-0.23 – 0.12	-0.637	0.52

Tableau 2-2: Results of the LMM model testing the effect of species, genetic compartment and sampling time on the global eDNA production per species and genetic marker (after log10 transformation). *Note:* Species, genetic compartment and time were added as fixed effects while the tank replicates were added as random effects. The model intercept is the species *Asellus aquaticus*, mt-eDNA and sampling time at 7 days. p-values below 5% are in bold.

#### 2.4.4. eDNA particle size distribution

We found that the eDNA particle size distribution was strongly dependent on taxa, genetic compartments and sampling times. Following the AIC, the best multinomial model was then incorporating the effect of these 3 variables and their interactions (Table 2-2). For mt-eDNA, we observed a shared pattern consisting of very low frequency of eDNA particles at small size fractions (< 0.2  $\mu\text{m}$ ) followed by an increase in the frequency of larger eDNA particles (i.e. size fraction greater than 0.2 $\mu\text{m}$ , Fig.2-4). Despite this general trend, we observed marked differences in eDNA concentration by size fraction between species. Snails and tadpoles release more than 50% of their mt-eDNA in size fractions larger than 8  $\mu\text{m}$ , whereas isopods and fishes release more than 50% of their mt-eDNA in size fractions between 0.2 and 1.2  $\mu\text{m}$  (Fig.2-3), with little variation between sampling time. When targeting nu-eDNA, we observed a different pattern with a much higher frequency of eDNA particles in the small size fractions (0.2  $\mu\text{m}$  and below), especially for isopods which release more than 80% of their eDNA at size fractions below 0.6  $\mu\text{m}$ . Regarding temporal changes, the amount of eDNA in small size fractions (< 0.2  $\mu\text{m}$ ) tends to increase with the duration of the experiment for all taxa, in particular for nu-eDNA.

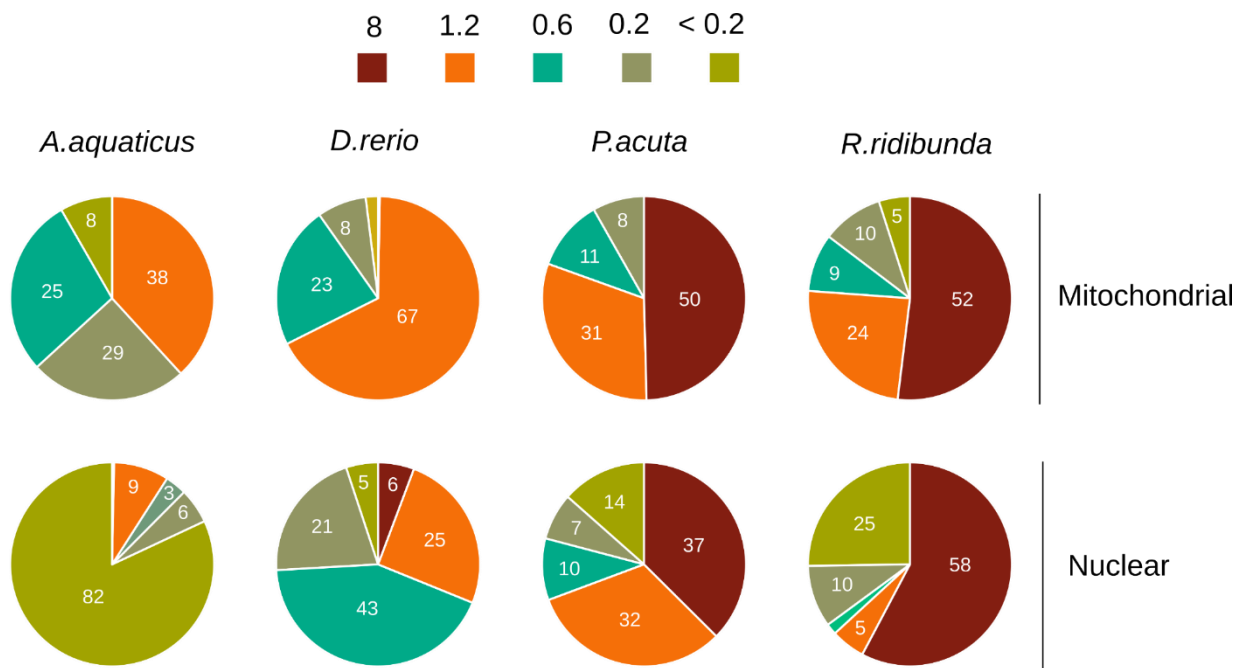


Figure 2-3: Pie chart showing the percentage of eDNA copies per particle size class, per species and per genetic compartment averaged over the three sampling times.

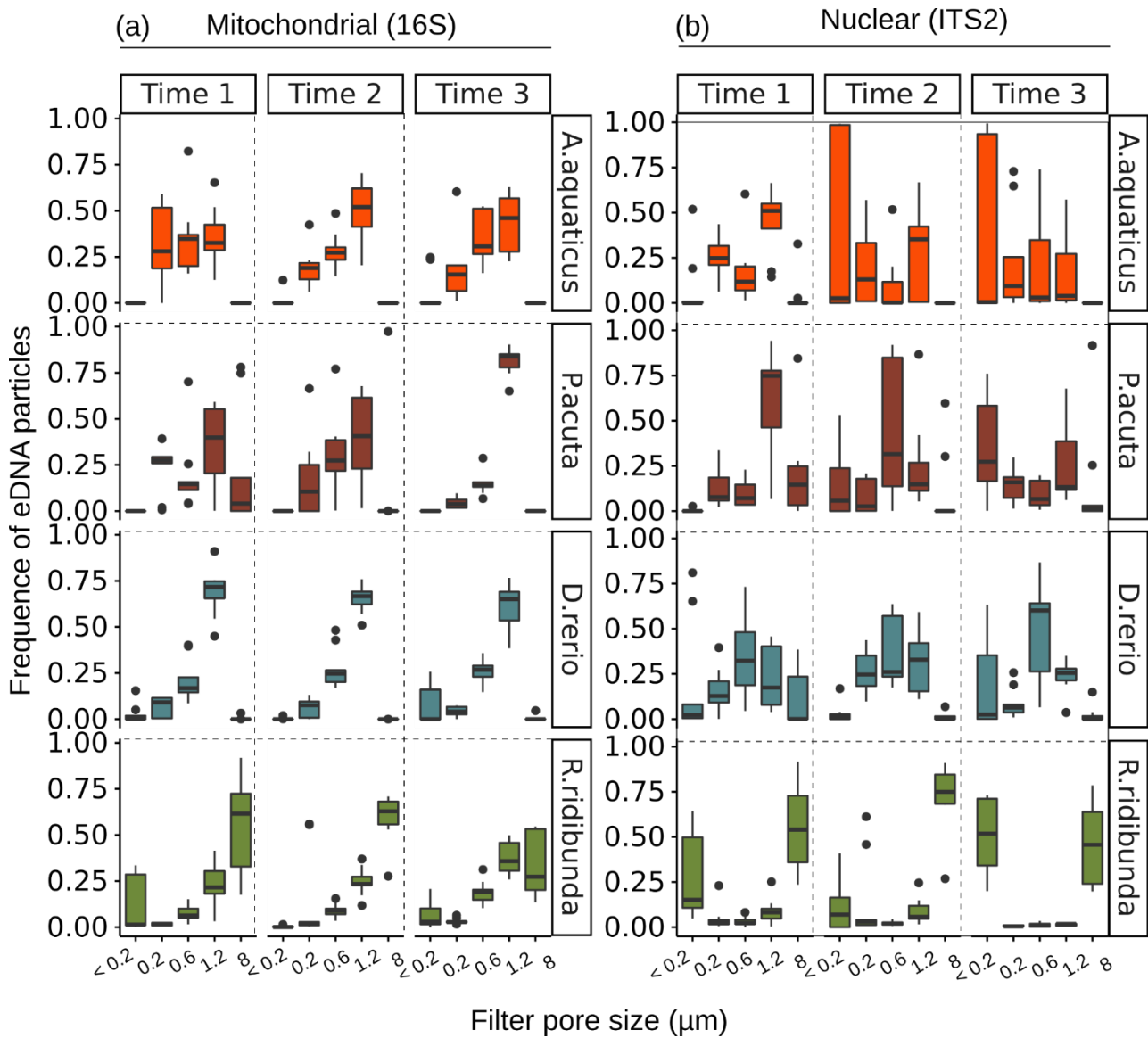


Figure 2-4: Frequency of nu-eDNA and mt-eDNA copies per particle size class (< 0.2 to 8 μm), per species and per sampling timing (Time 1,2 and 3). Note: eDNA particle counts have been transformed into frequency to allow a better graphical representation.

Tableau 2-3 : Effects of taxa, genetic marker, sampling time and their interactions on the probability that eDNA particles belong to a size fraction given by the multinomial model. The reported coefficients are log odds, i.e. the relative probability that a particle falls into a given size fraction compared to the baseline size fraction which is here the first size fraction (f1, < 0.2 µm). The independent variables are species, marker, and time. The intercept model is fit for *Danio rerio* (danio), the mitochondrial particles (mito) and for the first sampling time (t0). The impact of a change in an independent variable is then given by its influence on the log odds, its significance (\*\*\*) = p < 0.001; \*\* = p < 0.01; \* = p < 0.05), and its standard error in parenthesis. For example, the odds of a mitochondrial zebrafish particle at t0 to fall in the second fraction (f2) relative to f1 is exp(0.112)=1.12; it is therefore about as likely to sample a f1 than a f2 particle. If we switch to *Asellus*, the same odds now becomes exp(0.112+3.674)=44.08; it is now much more likely to sample a f2 than a f1 particule, with this time a highly significant parameter. If two different parameters are changed compared to the intercept levels, it is then necessary to also include their interactions.

Parameters	f2/f1	f3/f1	f4/f1	f5/f1
(Intercept)	0.112*** (0.012)	1.477*** (0.011)	2.568*** (0.010)	-2.248*** (0.029)
species: asellus/danio	3.674*** (0.046)	1.958*** (0.050)	1.784*** (0.045)	-4.390 (14.217)
species: physa/danio	10.972*** (0.384)	8.892*** (0.384)	9.557*** (0.384)	15.285*** (0.385)
species: rana/danio	-1.797*** (0.013)	-1.847*** (0.011)	-1.881*** (0.011)	4.019*** (0.029)
marker: nucl/mito	0.519*** (0.013)	0.240*** (0.011)	-1.456*** (0.011)	2.557*** (0.029)
time: t1/t0	4.216*** (0.015)	3.628*** (0.015)	3.608*** (0.014)	2.089*** (0.015)
time: t2/t0	1.214*** (0.016)	2.714*** (0.012)	2.813*** (0.011)	-0.780*** (0.014)
species: asellus/danio x marker: nucl/mito	-2.993*** (0.032)	-2.922*** (0.035)	-1.142*** (0.031)	3.137 (14.217)
species: physa/danio x marker: nucl/mito	-6.755*** (0.378)	-5.930*** (0.378)	-5.173*** (0.378)	-9.064*** (0.379)
species: rana/danio x marker: nucl/mito	-1.258*** (0.013)	-2.387*** (0.012)	-0.678*** (0.012)	-3.267*** (0.029)
species: asellus/danio x time: t1/t0	-7.088*** (0.040)	-5.959*** (0.043)	-6.107*** (0.036)	-17.612 (40.670)
species: physa/danio x time: t1/t0	-7.211*** (0.070)	-4.886*** (0.070)	-6.407*** (0.070)	-5.269*** (0.070)
species: rana/danio x time: t1/t0	0.778*** (0.010)	-0.454*** (0.010)	-0.486*** (0.009)	0.922*** (0.011)
species: asellus/danio x time: t2/t0	-3.754*** (0.042)	-5.058*** (0.046)	-5.695*** (0.041)	-14.445 (23.528)
species: physa/danio x time: t2/t0	-5.569*** (0.069)	-6.765*** (0.069)	-6.047*** (0.069)	-4.667*** (0.070)
species: rana/danio x time: t2/t0	-0.681*** (0.014)	-1.650*** (0.011)	-2.024*** (0.010)	0.422*** (0.013)
marker: nucl/mito x time: t1/t0	-1.841*** (0.013)	-2.167*** (0.013)	-1.899*** (0.012)	-2.128*** (0.011)
marker: nucl/mito x time: t2/t0	-2.188*** (0.013)	-2.408*** (0.011)	-2.650*** (0.009)	-0.846*** (0.006)

## 2.5. Discussion

### 2.5.1. eDNA concentration varies across taxa and genetic compartment

We showed that the eDNA concentration in water samples varied strongly across taxa. Despite being at same biomass, fish and tadpoles were the two taxa releasing the highest amount of eDNA, regardless of the targeted genetic compartment and with values close to those reported in the literature ( $10^4$  and  $10^5$  copies/L-1 ; (Klymus et al., 2015; Maruyama et al., 2014c; Sassoubre et al., 2016). Although a positive relationship between eDNA concentration and organism biomass and/or abundance has been described (Harrison et al., 2019; Jo et al., 2020), our results show that at this very broad taxonomic scale eDNA concentration is likely to be a very poor predictor of biomass variations. As compiled by Rourke et al., (2022) for teleostean, biomass and abundances are frequently correlated with eDNA concentration, but other biotic factors such as stress, metabolism, development stages, reproduction and diet were also frequently found to play a significant role. As we compare more and more distantly related taxa, it is likely that the biomass factor becomes less relevant compared to other biotic factors. In our experiment, tadpoles released the largest amount of eDNA, between 1 and 2 magnitudes more than other species. This eDNA could originate from the mucus secreted in large quantities in amphibians, especially under stressful conditions such as modifications in ionic conditions and temperature changes (Bernabò et al., 2013). It is possible that the microcosm conditions favoured high excretion of mucus and eDNA. In addition, the juvenile stage could promote eDNA excretion through cell turnover, as has been shown with bluegill sunfish (Maruyama et al., 2014).

Isopods showed the lowest rate of eDNA production in our experiment, between 3 to 4 magnitude lower than other taxa and despite the high density of organisms (150 individuals/tank). These results corroborate those of Andruszkiewicz Allan et al., (2021) who found that the rate of eDNA release from marine grass shrimp (*Palaemon spp.*) in microcosms was also very low compared to a marine teleostean (*Fundulus heteroclitus*) and jellyfishes (*Aurelia aurita* and *Chrysaora spp.*). As all arthropods, isopods have a chitinous exoskeleton which can potentially limit the release of eDNA compared to molluscs, fish and tadpoles.

Although on average the rate of eDNA production in isopods is low, we observed peaks in eDNA concentrations (up to  $10^5$  copies/L at 14 and 21 days, Fig 2-2). This suggests that isopods may excrete eDNA in pulses during moulting, in contrast to the possibly more constant release of eDNA by other organisms. The eDNA-based detection of these organisms may therefore be more challenging because it is more dependent on the timing of sampling. Further research is needed to analyse the temporal dynamics of eDNA production by arthropods and the factors that influence it.

The concentrations of nu-eDNA were significantly higher than those of mt-eDNA for the majority of taxa (isopods, molluscs and teleosteans). This result corroborates those found in the literature (Jo, Murakami, et al., 2019; Moushomi et al., 2019) and can be explained by several factors. First, eDNA relative copy numbers could be the byproduct of cellular copy numbers. As suggested by Minamoto et al. (2017) and Dysthe et al., (2018), the nuclear gene targeted in our study (the ITS2 gene) might be present at a higher genomic copy number per cell than the mitochondrial gene (16S gene). However, this is unlikely given the high number of mitochondria and mitochondrial genome per cell compared to the number of ribosomal DNA genes (rDNA) in eukaryotes. For example, in adult zebrafish, cells contain about 5500 mitochondrial genomes (Artuso et al., 2012). A simple similarity search (discontiguous megablast) of a rDNA human gene (Genbank U13369.1:3657-12969) on the zebrafish genomes gives 34 hits of at least 1kb. qPCR estimates of the number of 18S rDNA gene (also part of the rDNA gene) give slightly higher estimates in a range of 60 to 327 copy number per genome with important variations across tissues and ages (zebrafish adults have around 50 copies of the 18S rDNA, (Tao et al., 2020). The number of mitochondrial genomes per cell and the number of rDNA gene per nuclear genomes is variable across taxa, but, at least for zebrafish, the difference in the gene copy number does not explain the excess of nu-eDNA compared to mt-eDNA.

Second, thanks to its double membrane, mt-eDNA is likely to be less sensitive to degradation than mt-eDNA, a factor which could ease its release into the environment, its extraction yield, and its subsequent qPCR detection (Moushomi et al., 2019). That being said, not all species showed higher nu-eDNA concentrations compared to mt-eDNA indicating that this is not a universal pattern. For example, for the species *Rana ridibunda*, the concentrations of mitochondrial and nuclear eDNA were similar. Although the reason why and when nu-eDNA tends to be found at high concentration is not yet well understood, the use of nuclear rDNA genes appears to be a promising prospect for a more sensitive detection of aquatic organisms (Minamoto et al., 2017, Dysthe et al., 2018), particularly for rare species or those releasing low amounts of eDNA such as isopods. Unfortunately, the genomic databases contain very few nuclear rDNA genes (including ITS sequences), which is challenging to design specific primers or perform taxonomic assignment.

### 2.5.2. eDNA particle size distribution vary according to taxa and, genetic compartment

Taxa and genetic compartment are major factors controlling the eDNA particle size distribution. For all species when targeting their mt-eDNA, we observed a common general pattern: very few small eDNA mt-eDNA particles ( $< 0.2\mu\text{m}$ ) with an increasing frequency of large particles. This pattern is consistent with those found by the few studies on the mt-eDNA PSD of teleostean species (i.e. Zebrafish, Common Carp, Brook Trout) and on a snail (*Lymnaea stagnalis*). These results confirm the hypothesis that mt-eDNA from water samples is rather in the form of large particles corresponding to tissues, whole cells, or even agglomerated in faeces. Even though the mt-eDNA PSD was relatively stable compared to the nu-eDNA one, we observed differences among taxa. In particular, we noted an absence of large particles ( $> 10\ \mu\text{m}$ ) in fish and isopods tanks. This finding could be due to biological reasons or technical biases. Firstly, it is possible that these taxa don't release large eDNA particles. As isopods probably release their DNA during moulting as seen in the previous section, it is possible that the main source of their eDNA is already fragmented epithelial cells, explaining why most of their eDNA particles are between 0.6 and 1.2  $\mu\text{m}$ .

The PSD of nu-eDNA showed a completely different pattern to that of mt-eDNA. We observed a taxa-specific particle size distribution, with an overall higher frequency of small eDNA particles, especially in the isopod tanks. In contrast to mt-eDNA, there was a low frequency of large nu-eDNA particles. These results are contradictory to those of Jo et al (2019) who quantified the ITS1 of Japanese Jack Mackerel individuals (*Trachurus japonicus*) and found that most nu-eDNA are between 3 and 10  $\mu\text{m}$ . This can be explained partly by the different sampling times chosen in our study and those of Jo and collaborators. Since we sampled after 7 days, eDNA particles may have started degrading and producing a high frequency of small particles. Another difference with mt-DNA is that nu-eDNA particle frequencies are more variable among replicates. Overall this suggests that mt-eDNA and nu-eDNA particles are released in different states by organisms and have different degradation dynamics in water. The higher variability suggests that nu-eDNA PSD are unstable and perhaps that their distribution in the water column is more heterogeneous. Among the technical reasons, the variations could be due to the amplification step. ITS genes can vary between individuals of the same species in animals (Chu et al., 2001), which could lead to mismatches between primers and eDNA sequences of target organisms. Further investigations are needed to understand the origin of these differences between the PSD of nu-eDNA and mt-eDNA.

### 2.5.3. Effect of sampling time on eDNA concentration and particle sizes

Because the mechanisms of degradation are complex, choosing the sampling time to study eDNA in microcosms is challenging. Our initial objective was to estimate the production and states of eDNA at an equilibrium state between eDNA production and degradation, to approximate what would be found in the natural environment. Since eDNA is very sensitive to degradation, we chose 3 sampling times spaced in time to estimate the replicability of our experiment (after 7, 14 and 21 days). We observed that regardless of the sampling time, the models conclude that there is an effect of taxon and genetic compartment on both eDNA concentration and particle size distribution. However, we were also able to observe a small effect of time which was difficult to model, and often interacted with species and genetic compartment. For example, eDNA concentration increases in isopod tanks with time, decreases in molluscs and fish tanks or remains stable over time in tadpole tanks. Regarding the particle size distribution, we observe an increase in the frequency of small particles with time, especially in isopod tanks.



These temporal variations could be due in part to the replacement of water in the tanks every 7 days, although this effect should be negligible given the small volumes (700 mL replaced out of 20 L of water). It is also possible that temperature had an effect on eDNA concentration by stimulating microbial activity in the tanks. Indeed, the most significant decrease in eDNA concentration occurred in the zebrafish tanks (Fig. 2-2), with the highest water temperature (28°C). An experiment with shorter time steps is needed to better understand the dynamics of eDNA.

## 2.6. Conclusion

This study provides important information on the characteristics of macrobial eDNA, and in particular eDNA from invertebrates, which has been overlooked until now. We have shown that the mechanisms of eDNA production and degradation and the states of eDNA particles are complex and depend largely on the taxa considered and the gene targeted. The use of smaller pore filters than those recommended by some studies (Zaiko et al., 2022) and the targeting of a nuclear gene should allow better detection of some aquatic macro-organisms, especially those with an exoskeleton. We draw attention to the need for a thorough understanding of the ecology of eDNA and its different states in order to consider standardisation of eDNA-based methods.

## Acknowledgements

This work was supported by the French Biodiversity Agency (OFB), the National Technology Research Association (ANRT) and the company Eurofins Hydrobiologie France. This work was realised thanks to the support of the Graduate School H<sub>2</sub>O'Lyon (ANR-17-EURE-0018) and Université de Lyon (UdL) as part of the programme "Investissements d'Avenir" run by Agence Nationale de la Recherche (ANR). We acknowledge Loïc Teulier for its advice about zebrafish cultivation and its help to write the ethical project. We thank the ACSED platform, in particular Angeline Clair, Laetitia Averty and Julie Ulmann, for taking care of the animals during the experiment and for access to their equipment. We also acknowledge the DTAMB platform (Université Claude Bernard Lyon 1) for access to their equipment. Thanks to Dr. Matthew Barnes, Dr. Taylor Wilcox and Dr. Laurent Gueguen for their advice on data processing and analysis.

## Author contributions

HV and TL designed the experiment, developed the qPCR assays and methods for eDNA sampling and extraction, collected, processed, performed data analysis and wrote the paper. LK and MG greatly helped to develop the qPCR assay, to sample, filtrate and precipitate water samples and extract eDNA.

## 3. References

Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716–723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>

Andruszkiewicz Allan, E., Zhang, W. G., C. Lavery, A., & F. Govindarajan, A. (2021). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 3(2), 492–514. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>

Artuso, L., Romano, A., Verri, T., Domenichini, A., Argenton, F., Santorelli, F. M., & Petruzzella, V. (2012). Mitochondrial DNA metabolism in early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(7), 1002–1011. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.03.019>

Barnes, M. A., Chadderton, W. L., Jerde, C. L., Mahon, A. R., Turner, C. R., & Lodge, D. M. (2021). Environmental conditions influence eDNA particle size distribution in aquatic systems. *Environmental DNA*, 3(3), 643–653. <https://doi.org/10.1002/edn3.160>

Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>

Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic

Systems. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1819–1827.  
<https://doi.org/10.1021/es404734p>

Bernabò, I., Bonacci, A., Coscarelli, F., Tripepi, M., & Brunelli, E. (2013). Effects of salinity stress on *Bufo balearicus* and *Bufo bufo* tadpoles: Tolerance, morphological gill alterations and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase localization. *Aquatic Toxicology*, 132–133, 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.019>

Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R. A., Foster, J., Wilkinson, J. W., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P., & Dunn, F. (2015). Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029>

Bruce, K., Blackman, R., Bourlat, S. J., Hellström, A. M., Bakker, J., Bista, I., Bohmann, K., Bouchez, A., Brys, R., Clark, K., Elbrecht, V., Fazi, S., Fonseca, V., Hänfling, B., Leese, F., Mächler, E., Mahon, A. R., Meissner, K., Panksep, K., ... Deiner, K. (2021). A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. Pensoft Publishers. <https://doi.org/10.3897/ab.e68634>

Chu, K. H., Li, C. P., & Ho, H. Y. (2001). The First Internal Transcribed Spacer (ITS-1) of Ribosomal DNA as a Molecular Marker for Phylogenetic and Population Analyses in Crustacea. *Marine Biotechnology*, 3(4), 355–361. <https://doi.org/10.1007/s10126001-0014-5>

Deiner, K., & Altermatt, F. (2014). Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE*, 9(2), e88786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>

Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant

communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895.  
<https://doi.org/10.1111/mec.14350>

Dysthe, J. C., Franklin, T. W., McKelvey, K. S., Young, M. K., & Schwartz, M. K. (2018). An improved environmental DNA assay for bull trout (*Salvelinus confluentus*) based on the ribosomal internal transcribed spacer I. *PLOS ONE*, 13(11), e0206851.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206851>

Elff M (2022). *\_mclgit: Multinomial Logit Models, with or without Random Effects or Overdispersion\_*. R package version 0.9.4.2, <<https://CRAN.R-project.org/package=mclgit>>.

Ellison, S. L., English, C. A., Burns, M. J., & Keer, J. T. (2006). Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-33>

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425.  
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>

Foran, D. R. (2006). Relative Degradation of Nuclear and Mitochondrial DNA: An Experimental Approach\*. *Journal of Forensic Sciences*, 51(4), 766–770.  
<https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00176.x>

Fremier, A. K., Strickler, K. M., Parzych, J., Powers, S., & Goldberg, C. S. (2019). Stream Transport and Retention of Environmental DNA Pulse Releases in Relation to Hydrogeomorphic Scaling Factors. *Environmental Science & Technology*, 53(12), 6640–6649. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06829>

Harrison, J. B., Sunday, J. M., & Rogers, S. M. (2019). Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1915), 20191409.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1409>

Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, T. P., Sado, T., Mabuchi, K., Takeshima, H., Miya, M., & Nishida, M. (2013). MitoFish and MitoAnnotator: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Accurate and Automatic Annotation Pipeline. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2531–2540. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst141>

Jane, S. F., Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Schwartz, M. K., Lowe, W. H., Letcher, B. H., & Whiteley, A. R. (2015). Distance, flow and PCR inhibition: EDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), 216–227. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12285>

Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA: EDNA surveillance of rare aquatic species. *Conservation Letters*, 4(2), 150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x>

Jo, T., Arimoto, M., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019). Particle Size Distribution of Environmental DNA from the Nuclei of Marine Fish. *Environmental Science & Technology*, 53(16), 9947–9956. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02833>

Jo, T., Arimoto, M., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2020). Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.1002/edn3.51>

Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019). Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution*, 9(3), 1135–1146. <https://doi.org/10.1002/ece3.4802>

Klymus, K. E., Richter, C. A., Chapman, D. C., & Paukert, C. (2015). Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and

silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation*, 183, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.020>

Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB (2017). “lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models.” *Journal of Statistical Software*, **82**(13), 1–26. doi: 10.18637/jss.v082.i13.

Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. (2016). Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 16(6), 1401–1414. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12522>

Leese, F., Bouchez, A., Abarenkov, K., Altermatt, F., Borja, Á., Bruce, K., Ekrem, T., Čiampor, F., Čiamporová-Zařovičová, Z., Costa, F. O., Duarte, S., Elbrecht, V., Fontaneto, D., Franc, A., Geiger, M. F., Hering, D., Kahlert, M., Kalamujić Stroil, B., Kelly, M., ... Weigand, A. M. (2018). Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action. In *Advances in Ecological Research* (Vol. 58, pp. 63–99). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2018.01.001>

Lenth R (2022). *\_emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means\_*. R package version 1.7.3, <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.

Levine, T. R., & Hullett, C. R. (2002). Eta squared, partial eta squared, and misreporting of effect size in communication research. *Human Communication Research*, 28(4), 612-625.

Loeza-Quintana, T., Abbott, C. L., Heath, D. D., Bernatchez, L., & Hanner, R. H. (2020). Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys (PISCeS)—Advancing collaboration and standardization efforts in the field of eDNA. *Environmental DNA*, 2(3), 255–260. <https://doi.org/10.1002/edn3.112>

Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., & Minamoto, T. (2014a). The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. *PLoS ONE*,

9(12), e114639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114639>

Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., & Minamoto, T. (2014b). The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. *PLoS ONE*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114639>

Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., & Minamoto, T. (2014c). The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. *PLoS ONE*, 9(12), e114639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114639>

Mauvisseau, Q., Harper, L. R., Sander, M., Hanner, R. H., Kleyer, H., & Deiner, K. (2022). The Multiple States of Environmental DNA and What Is Known about Their Persistence in Aquatic Environments. *Environmental Science & Technology*, 56(9), 5322–5333. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07638>

Minamoto, T., Uchii, K., Takahara, T., Kitayoshi, T., Tsuji, S., Yamanaka, H., & Doi, H. (2017). Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Ecology Resources*, 17(2), 324–333. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12586>

Moushomi, R., Wilgar, G., Carvalho, G., Creer, S., & Seymour, M. (2019). Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of *Daphnia magna* mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48984-7>

Nagler, M., Insam, H., Pietramellara, G., & Ascher-Jenull, J. (2018). Extracellular DNA in natural environments: Features, relevance and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(15), 6343–6356. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9120-4>

Pilliod, D. S., Laramie, M. B., MacCoy, D., & Maclean, S. (2019). Integration of eDNA-Based Biological Monitoring within the U.S. Geological Survey's National Streamgauge Network. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 55(6), 1505–

1518. <https://doi.org/10.1111/1752-1688.12800>

Rourke, M. L., Fowler, A. M., Hughes, J. M., Broadhurst, M. K., DiBattista, J. D., Fielder, S., Wilkes Walburn, J., & Furlan, E. M. (2022). Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4(1), 9–33. <https://doi.org/10.1002/edn3.185>

Sansom, B. J., & Sassoubre, L. M. (2017). Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates to Model Freshwater Mussel eDNA Transport in a River. *Environmental Science & Technology*, 51(24), 14244–14253. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05199>

Sassoubre, L. M., Yamahara, K. M., Gardner, L. D., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2016). Quantification of Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates for Three Marine Fish. *Environmental Science & Technology*, 50(19), 10456–10464. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03114>

Seymour, M., Durance, I., Cosby, B. J., Ransom-Jones, E., Deiner, K., Ormerod, S. J., Colbourne, J. K., Wilgar, G., Carvalho, G. R., de Bruyn, M., Edwards, F., Emmett, B. A., Bik, H. M., & Creer, S. (2018). Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-017-0005-3>

Shogren, A. J., Tank, J. L., Andruszkiewicz, E., Olds, B., Mahon, A. R., Jerde, C. L., & Bolster, D. (2017). Controls on eDNA movement in streams: Transport, Retention, and Resuspension. *Scientific Reports*, 7(1), 5065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05223-1>

Shogren, A. J., Tank, J. L., Egan, S. P., Bolster, D., & Riis, T. (2019). Riverine distribution of mussel environmental DNA reflects a balance among density, transport, and removal processes. *Freshwater Biology*, 64(8), 1467–1479.



<https://doi.org/10.1111/fwb.13319>

Takahara, T., Minamoto, T., & Doi, H. (2013). Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *PLoS ONE*, 8(2), e56584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056584>

Tao, B., Lo, L. J., Peng, J., & He, J. (2020). RDNA subtypes and their transcriptional expression in zebrafish at different developmental stages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 529(3), 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.196>

Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., Orlando, L., & Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA: SPECIES MONITORING BY ENVIRONMENTAL DNA. *Molecular Ecology*, 21(11), 2565–2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>

Troth, C. R., Sweet, M. J., Nightingale, J., & Burian, A. (2021). Seasonality, DNA degradation and spatial heterogeneity as drivers of eDNA detection dynamics. *Science of The Total Environment*, 768, 144466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144466>

Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T., & Yamanaka, H. (2017). Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLOS ONE*, 12(4), e0176608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176608>

Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), Article 7. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206>

Utilisations de l'ADN environnemental pour la surveillance et l'évaluation biologiques des écosystèmes aquatiques. (2020). 80.

Wickham, H. (2016). Data Analysis. In H. Wickham (Ed.), *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (pp. 189–201). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_9)

Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Lowe, W. H., & Schwartz, M. K. (2015). Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Conservation Genetics Resources*, 7(3), 639–641. <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0465-z>

Zaiko, A., von Ammon, U., Stuart, J., Smith, K. F., Yao, R., Welsh, M., Pochon, X., & Bowers, H. A. (2022). Assessing the performance and efficiency of environmental DNA/RNA capture methodologies under controlled experimental conditions. *Methods in Ecology and Evolution*, 13(7), 1581–1594. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13879>

Zhao, B., van Bodegom, P. M., & Trimbos, K. (2021). The particle size distribution of environmental DNA varies with species and degradation. *Science of The Total Environment*, 797, 149175. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149175>

# Chapitre III

## Optimisation et test d'un outil d'échantillonnage de l'ADNe : capteurs passifs en hydroxyapatite imprimés en 3D

---

Diverses méthodes peuvent être utilisées pour collecter l'ADNe en milieux aquatiques. Mais sont souvent contraignantes ou difficilement applicables à l'ensemble des écosystèmes. Ces inconvénients entravent la standardisation d'une méthode d'échantillonnage fiable et applicable pour des suivis réglementaires de communautés bioindicatrices. Pour tenter d'outrepasser ces limites, le deuxième objectif de cette thèse est de développer des capteurs passifs à ADNe, applicable à un large éventail d'écosystèmes, simple à utiliser et standardisable. La conception de ces capteurs se base sur la propriété de certains minéraux, en particulier l'hydroxyapatite (Hap) à collecter passivement les fragments d'ADN libres dans l'eau par adsorption et le protéger contre la dégradation. Ces capteurs ont été imprimés en 3D à partir d'une résine en hydroxyapatite. Ce chapitre présente succinctement les caractéristiques du matériau choisi, et les principaux mécanismes d'adsorption de l'ADN mis en jeu. Puis, il présentera une étude visant à tester la capacité des capteurs à collecter de l'ADN en conditions contrôlées et naturelles. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Molecular Ecology* en février 2022 (lien doi : <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13604>).

## 1. Résumé

Certains minéraux sont connus pour leurs propriétés d'adsorption de biomolécules telles que l'ADN. C'est le cas de l'hydroxyapatite, un minéral composé principalement de phosphate de calcium, pouvant adsorber de l'ADN sur sa surface et ralentir nettement sa dégradation une fois adsorbé (Brundin et al., 2013; Okazaki et al., 2001). De fait, l'HAp est couramment utilisée sous forme de poudre pour la séparation et l'élution d'acides nucléiques en colonnes chromatographiques (Yu et al., 2008). Plusieurs mécanismes semblent intervenir dans l'adsorption de l'ADN sur l'hydroxyapatite, bien qu'ils ne soient pas encore totalement compris. L'ADN est constitué de groupements phospho-diesters chargés négativement. À pH neutre, l'ADN est attiré électrostatiquement par les charges positives présentes sur la surface des minéraux (interaction attractive) et repoussé par les charges négatives (répulsive) comme sur certaines argiles. Les groupements phospho-diesters négatifs de l'ADN forment des liaisons avec les groupements ioniques présents en surface de l'hydroxyapatite, pouvant être de nature très variée : interactions électrostatiques, échange de cations, liaisons hydrogènes ou encore des ponts cationiques (Douarche et al., 2008, Yu et al., 2013). Toutefois, il semblerait que les fragments d'ADN libres s'adsorbent (i) aux groupements positifs de l'HAp ( $\text{Ca}^{2+}$ , Figure 1-1) ou (ii) aux groupements négatifs (dont les groupements phosphates) *via* des cations inorganiques présents en solution (e.g.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Certaines interactions entre l'ADN et la surface peuvent être très stables (Mauvisseau et al., 2022) donnant lieu à une adsorption prolongée de l'ADN sur la surface, malgré l'évolution des conditions ioniques dans l'eau.

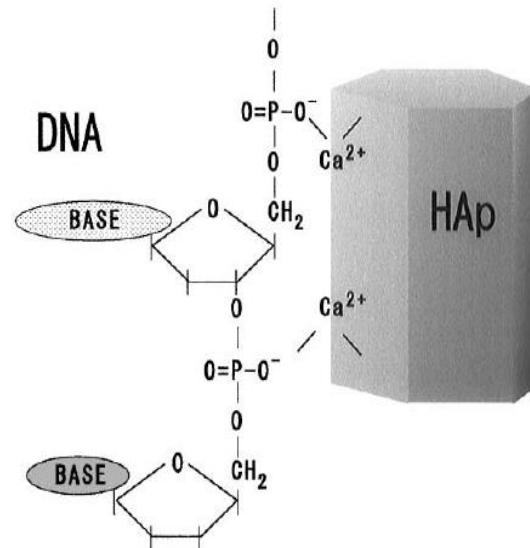


Figure 1-1: Schéma présentant une des interactions d'adsorption possible entre l'ADN et l'hydroxyapatite. Figure tirée de Brundin et al., (2013)

En plus de ces propriétés d'adsorption, l'HAp est très utilisée dans le domaine médical pour sa constitution proche des os humains, qui en font un matériau de choix pour la conception d'implants prothétiques. Dans cette utilisation, l'HAp est utilisée sous forme de résine, qui est ensuite imprimée en 3D selon la forme de l'implant souhaitée. Dans cette thèse, nous imprimons des capteurs à partir de cette même résine en HAp et testons leur capacité à collecter l'ADNe issu d'organismes vivants en milieu aquatique. Après une phase de développement méthodologique (e.g. optimisation de la forme des capteurs, développements de protocoles), les capteurs ont été testés en conditions contrôlées et en milieux naturels. Les résultats montrent que des capteurs en hydroxyapatite sont capables de collecter des ADN de nature variés (ADN de synthèse, ADN extrait d'organismes ou ADNe issus d'organismes vivants), rapidement (24 heures), et avec des rendements similaires aux méthodes conventionnelles (filtration d'eau). Malgré le fort potentiel des capteurs, un important problème de répliquabilité a été mis en évidence et nécessite des recherches supplémentaires pour parvenir à un outil d'échantillonnage fiable et standardisable.

## 2. Développement de capteurs passifs en hydroxyapatite pour l'échantillonnage de l'ADNe en milieu aquatique

**Titre en anglais :** Passive sampling of environmental DNA in aquatic environments using 3D-printed hydroxyapatite samplers

Héloïse Verdier<sup>(1,2,3)</sup>, Lara Konecny-Dupre<sup>(1)</sup>, Christophe Marquette<sup>(4)</sup>, Helen Reveron<sup>(6)</sup>, Solène Tadier<sup>(6)</sup>, Laurent Grémillard<sup>(6)</sup>, Amélie Barthès<sup>(2)</sup>, Thibault Datry<sup>(3)</sup>, Agnès Bouchez<sup>(5)</sup>, and Tristan Lefébure<sup>(1)</sup>.

<sup>1</sup> Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France

<sup>2</sup> Eurofins Hydrobiologie France, Rue Lucien Cuenot, 54521 Maxéville, France

<sup>3</sup> INRAE, UR-Riverly, Centre de Lyon-Villeurbanne, 5 rue de la Doua CS70077, 69626 VILLEURBANNE Cedex, France

<sup>4</sup> 3d.FAB, Univ Lyon, Université Lyon1, CNRS, INSA, CPE-Lyon, ICBMS, UMR 5246, 43, Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

<sup>5</sup> INRAE, USMB, UMR CARRETEL, 75bis av. de Corzent, 742000 Thonon les Bains, France

<sup>6</sup> Univ Lyon, INSA Lyon, UCBL, CNRS, MATEIS UMR 5510, 69621 Villeurbanne, France

## 2.1. Abstract

The study of environmental DNA released by aquatic organisms in their habitat offers a fast, non-invasive and sensitive approach to monitor their presence. Common eDNA sampling methods such as water filtration and DNA precipitation are time consuming, require difficult-to-handle equipment and partially integrate eDNA signals. To overcome these limitations, we created the first proof of concept of a passive, 3D-printed and easy-to-use eDNA sampler. We designed the samplers from hydroxyapatite (HAp samplers), a natural mineral with a high DNA adsorption capacity. The porous structure and shape of the samplers were designed to optimise DNA adsorption and facilitate their handling in the laboratory and in the field. Here we show that HAp samplers can efficiently collect genomic DNA in controlled set-ups, but can also collect animal eDNA under controlled and natural conditions with yields similar to conventional methods. However, we also observed large variations in the amount of DNA collected even under controlled conditions. A better understanding of the DNA-hydroxyapatite interactions on the surface of the samplers is now necessary to optimise the eDNA adsorption and to allow the development of a reliable, easy-to-use and reusable eDNA sampling tool.

**Key-words:** DNA adsorption, Environmental DNA, Hydroxyapatite, Passive sampling, 3D-printing



### 3. Introduction

At a time of unprecedented threats on freshwater biodiversity (Dudgeon et al., 2006; Reid et al., 2019), it is crucial to develop rapid, accurate and minimally invasive tools to monitor aquatic ecosystems. About a decade ago, methods based on the sampling of environmental DNA (eDNA) were proposed as a revolutionary way to survey aquatic macro-organisms (Deiner et al., 2017). Macro-organisms release DNA in their environment through different processes (e.g. faeces, excretion, shedding cells, gametes) and this extra-organismal eDNA can take different forms (tissues, cells, organites, nucleo-proteic complexes ...). The direct sampling of eDNA coupled with molecular analysis methods such as next generation sequencing (Shokralla et al., 2012) or targeted approaches such as quantitative polymerase chain reaction (qPCR) (Langlois et al., 2020) allow the detection and identification of aquatic species while overcoming organism capture. Although eDNA offers many promising applications, several methodological challenges remain (Beng & Corlett, 2020).

eDNA sampling is one of the most challenging steps in eDNA-based approaches. Several families of methods exist to sample eDNA from water: precipitation, centrifugation or active filtration, the latter being the most commonly used (Tsuji et al., 2019). Within each method family, there are a multitude of possible strategies (e.g. volume of the water sample, field or laboratory processing, choice of equipment and DNA extraction kits) that vary according to the ecosystem studied, the target species and the downstream analysis (Deiner et al., 2015). However, all these sampling methods are time-consuming, require human intervention and specialised equipment. For example, the filtration of a large volume of water requires pumping systems and filtration funnels which are expensive and difficult to handle. In addition, given the complex dynamics of eDNA in aquatic environments (i.e. pulsed emission, transport, retention, degradation), a single filtered or precipitated water sample will provide a snapshot that is likely to be poorly integrative of the overall eDNA signals (Spear et al., 2015).

Passive eDNA sampling appears as a promising and simple solution to overcome challenges associated with conventional methods. Passive eDNA sampling can be defined as the use of natural or artificial substrates that can collect eDNA passively, without human intervention. Substrates such as marine sponges (Mariani et al., 2019), biofilms (Rivera et al., 2021) and filters immersed directly in water (Bessey et al., 2021) have been used successfully to collect eDNA from aquatic systems. Recently, Kirtane and colleagues (Kirtane et al., 2020) have shown that montmorillonite and coal-based mineral powders can be used as passive eDNA samplers in aquatic environments. As a result of good DNA capture and preservation capacity (up to 200 µg genomic DNA per g) (Gardner & Gunsch, 2017), sediments and commercial mineral powders may very well be more integrative eDNA substrates than methods based on a single water sample. Yet, these substrates are difficult to deploy in the environment, particularly in aquatic systems.

In this study, we developed 3D-printed passive eDNA samplers made of pure hydroxyapatite (HAp), a calcium phosphate mineral naturally present in bones. Due to its biocompatibility in bone contact (Yetgin, 2013), synthetic HAp is widely used in 3D-printing for the manufacture of prosthetic implants (Kattimani et al., 2016). In addition to its clinical benefits, HAp has been used since the 1990s in chromatography for its ability to adsorb biomolecules such as DNA (del Valle et al., 2014; Okazaki et al., 2001). The mechanism involved is thought to be a binding between the phosphate groups of the extracellular DNA and the positively charged calcium groups of the hydroxyapatite surface (Brundin et al., 2013). Coupling the use of 3D-printing and DNA adsorption properties of HAp allows the creation of an object whose shape and composition are optimised for eDNA sampling. In this paper, we described the development of hydroxyapatite samplers (HAp samplers) and tested their ability to sample eDNA in fresh waters.

Our objectives were to (i) quantify the HAp samplers DNA adsorption and desorption capacity, (ii) assess the range of DNA fragment size sampled, (iii) quantify the repeatability of DNA sampling across several cycles of use of the HAp samplers, and (iv) evaluate the samplers capacity to recover eDNA in microcosms and under natural conditions.

## 3.1. Materials and methods

### 3.1.1. 3D-printed HAp samplers design

#### A. Raw material and printing setup

A photopolymerizable organic resin (3D Mix, 3DCeram Company, HAP, Bonnac-la-Côte, France) containing 40-60% (w/v) of hydroxyapatite powder ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , stoichiometric hydroxyapatite), a synthetic calcium phosphate with Ca/P atomic ratio of 1.67, was the raw material used to fabricate the samplers. The samplers were built from this hydroxyapatite-enriched resin using a 3D stereolithographic printer (CERAMAKER C900, 3DCeram Company, with 55 mW laser power and 100  $\mu\text{m}$  layer thickness). Two prototypes of HAp samplers were produced: a first test prototype (P1) corresponding to 10 pieces cut from a 3D-printed mesh with (Fig. 3-1A) to test the concept and the material, and a second prototype (P2) printed in 25 copies (Fig. 3-1B) with a higher ratio porosity/surface and an optimised design for laboratory and field manipulations. P1 prototypes have an exposed surface of 240  $\text{mm}^2$  and a macroporosity of 500  $\mu\text{m}$  in diameter. P2 has a total surface of 480  $\text{mm}^2$  and a macroporosity of 400  $\mu\text{m}$  in diameter.

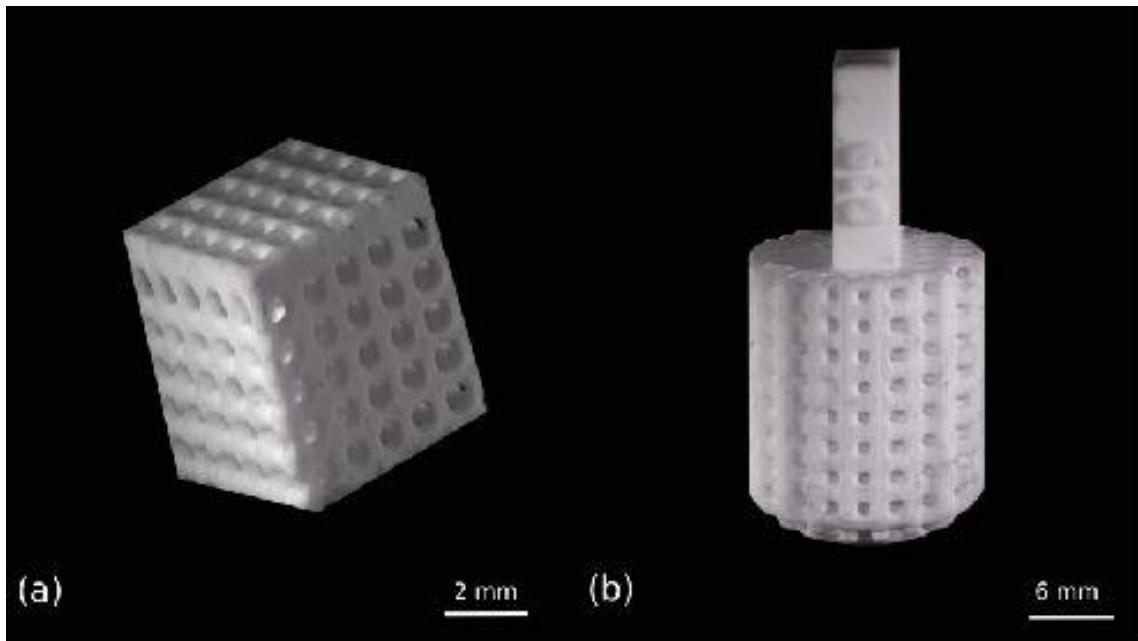


Figure 3-1 : Images of 3D-printed hydroxyapatite samplers prototype P1 (a) and P2 (b) obtained with a confocal microscope (objective x0.5, LEICA Z16 APO, camera LEICA DMC5400).

### B. Debinding and sintering steps

Once printed, cleaned with a solvent (Ceracleaner, 3DCeram Company, Bonnac-la-Côte, France) and dried, the HAp samplers underwent debinding and then sintering steps. Debinding aims at removing all organic components (in particular the organic resin) and was conducted in a conventional oven following the thermal cycle described in Table 3-1. Sintering aims at consolidating the samplers by densifying them (creation of necks and reduction of the porosity between the individual ceramic particles) (Rahaman, 2017), and is achieved by a thermal treatment at higher temperature (1 °C/min up to 1150 °C, 60 min. at 1150 °C, followed by a second step at 3 °C/min up to 1250 °C, 60 min at 1250 °C, finally cooling to room temperature at 3 °C/min). After these steps, no organic components remain and the samplers are made of pure HAp as confirmed by X-ray diffraction (XRD). However, sintering is accompanied by a ~15% linear shrinkage corresponding to a ~30% decrease of the surfaces of HAp samplers after printing.

Tableau 3-1: Process parameters for debinding HAp samplers.

Step	Temperature (°C)	Heating rate (°C/min)	Dwell (min)
1	20-200	0.2	120
2	200-300	0.1	120
3	300-380	0,1	120
4	380-550	0.1	120
5	550-950	1	0
6	950-20	2	-

### 3.1.2. Expected DNA recovery from HAp samplers

We used the term “DNA recovery” to define the quantity of DNA adsorbed and desorbed from the HAp samplers. A first estimation of the maximum DNA recovery ( $DNA_{max}$ ) can be obtained by hypothesising that a single layer of DNA molecules would bind on the HAp surface of the samplers. According to equation 1, the number of DNA molecules that can adsorb to the surface is obtained by dividing the exposed surface ( $S_e$ ) of a sampler ( $P1 = 240 \text{ mm}^2$ ,  $P2 = 480 \text{ mm}^2$ ) by the surface of a DNA base pair ( $S_d = 6.46 \cdot 10^{-10} \text{ mm}^2$ ). The surface of a DNA base pair was calculated according to Mandelkern *et al* (1981) (diameter = 2 nm, length = 3.4 nm). The number of DNA molecules per sampler is then divided by Avogadro's constant ( $NA = 6.02214076 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ) to give the number of DNA moles per sampler. The number of moles of DNA is then divided by the molar mass of a DNA base pair ( $W = 650 \text{ daltons}$ ) to obtain the total mass of DNA that can bind to a sampler.

$$DNA_{max} = (S_e/S_d)/N_A \times W$$

**Equation 1**

According to Equation 1, DNA recovery should be correlated with the surface area of the sampler. Being smaller, P1 has a theoretical recovery capacity of 400 ng of DNA per sampler, while P2 has a capacity of 800 ng. Because they are based on a simplistic interaction model, these estimates are likely to be biased, but they will serve as a first estimation to calibrate several experiments of this study.

### 3.1.3. Protocol of DNA adsorption and desorption

The HAp sampler DNA adsorption and desorption protocol was composed of 5 steps (Fig. 3-2). First, HAp samplers were decontaminated before each experiment by a thermal treatment in air at 550 °C for 3 hours (Thermolyne model 30400 furnace), a procedure typically used to decontaminate glassware. Second, DNA is adsorbed to the HAp samplers by immersing them in an aqueous solution (varying composition upon the present study) containing DNA. Third, samplers are transferred to Eppendorf tubes and centrifuged for 1 minute at 3000 rpm to dry them. Fourth, samplers are washed with 1 mL of sterile ultrapure water. Finally, DNA is desorbed from the samplers by immersing them in 1 mL of 0.1 M phosphate buffer pH 8 (Grunenwald et al., 2014), vortexed for 30 seconds and incubated at room temperature for 1 hour.

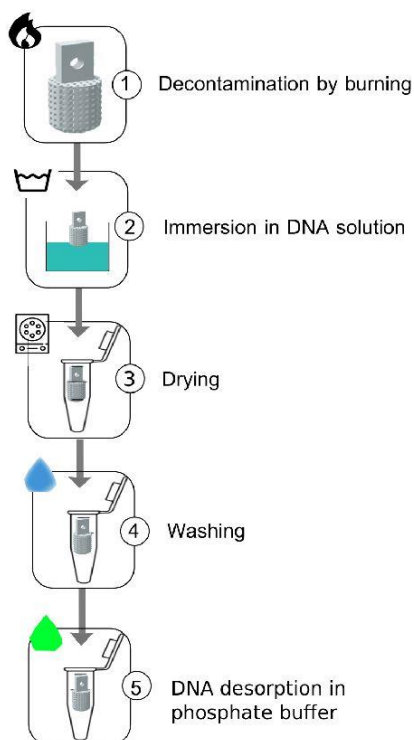


Figure 3-2: DNA adsorption and desorption protocol.

### 3.1.4. DNA sampling experiments by HAp samplers

#### A. Experiment 1: capacity of DNA adsorption and desorption of fragments of various sizes

We hypothesised that HAp samplers adsorb free DNA fragments and that longer fragments, having more adsorption sites, were preferentially adsorbed. To test this, we performed a DNA sampling experiment with concentrated DNA fragments of various sizes (i.e. using a DNA size marker). After decontamination, a first batch of six HAp samplers (three P1 and three P2) were incubated in tubes (one sampler/tube) containing 2 mL of a solution of long DNA fragments at 1 ng/ $\mu$ L ( $\lambda$  DNA / BstEII Digest, 1260-8450 bp). A second batch of six HAp samplers was incubated in tubes containing 2 mL of a solution of shorter DNA fragments at 1 ng/ $\mu$ L (PCR 20 bp Low Ladder, 20-2000 bp).

Initial DNA concentration in both solutions was verified by QuBit® (High Sensitive assay kit, range: 0.001 to 100 ng/μL) quantification before the experiment ( $1 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 0.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). All samplers were incubated for 17 hours on a rotary shaker (IKA Roller 6 Digital, 40 rpm). After 17 hours of incubation, 10 μL of supernatants in each tube was taken to quantify residual DNA and HAp samplers were removed from the DNA solutions using sterile forceps. The DNA was desorbed from the samplers according to the protocol in section 2.3.3. The supernatant aliquots and desorbed DNA solutions were stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  prior to analysis.

#### B. Experiment 2: repeatability

A quantification of repeatability was conducted to test whether HAp samplers can be reused after several cycles of use. A cycle of use is defined here as a thermic treatment phase followed by a DNA adsorption and desorption phase. For this purpose, five P1 prototypes and 25 P2 prototypes of HAp samplers were incubated in 5 mL of a concentrated solution of DNA size marker ( $\lambda$ DNA/BstEII Digest 1260-8450 bp) at a concentration of  $2.88 \pm 0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$  on a rotary shaker (Roller 10 Digital IKA) for 17 hours. This experiment was carried out three times in a row (hereafter called experiments A, B and C) under strictly identical conditions, at room temperature ( $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) with decontamination through thermic treatment between each use. After incubation, HAp samplers were removed from the DNA solution with sterile clamp, washed and DNA was released with 1 mL of 0.1 M phosphate buffer pH 8 according to the protocol section 2.3.3. 20 μL of supernatants was taken to quantify residual DNA. We added a DNA degradation control corresponding to three tubes containing the DNA marker solutions with no HAp sampler. We quantified DNA in the supernatant at the beginning and end of each experiment to calculate a DNA percentage loss (e.g. due to degradation, adsorption to plastic tubes) (Gaillard & Strauss, 1998) and estimate the exact amount of DNA adsorbed by the samplers. DNA samples (in supernatants and desorbed from samplers) were stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  prior to analysis.



### C. Experiment 3: eDNA sampling experiment in microcosm

*Asellus aquaticus*, a small freshwater isopod, was used as a target organism to test the capacity of the HAp samplers to collect eDNA in microcosm. *A. aquaticus* is a relevant model because it is easy to rear under laboratory conditions and can survive for several days without feeding, which is an advantage for avoiding exogenous contamination in eDNA experiments. In addition, macroinvertebrates received less attention than fish and amphibians in eDNA-based studies, and the demonstration that eDNA-based tools work on these organisms is essential (Mächler et al., 2014). Last, we have access to genomic resources for this species and related species allowing us to design species-specific primers. Forty individuals of *A. aquaticus* sampled from a natural pond (Lyon, France) in April 2019 were divided into eight glass microcosms (five individuals / microcosm) containing 500 mL of synthetic water (Peltier & Weber, 1985) (Fig. 3-3). Positive controls correspond to microcosms where we injected genomic DNA (final microcosm at 1 ng/mL) extracted from a pool of 10 *A. aquaticus*. After 24 hours of *A. aquaticus* acclimatisation, the two prototypes of HAp samplers were incubated in microcosms (1 sampler / microcosm) for 24 hours. All microcosms were placed in a cold room at 18 °C, spaced 0.5 m apart and covered to limit the risk of contamination. The organisms were not fed during the experiment to reduce the amount of allochthonous DNA. After incubation, the HAp samplers were removed from the microcosms using sterile forceps. At the same time, a 14 mL water sample was taken from each microcosm to compare the amount of *A. aquaticus* eDNA obtained using a conventional method (i.e. eDNA precipitation) with the amount of DNA collected by HAp samplers. Directly after the experiment, DNA from HAp samplers was desorbed according to section 1.3. of the protocol and purified (Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ gel and PCR cleaning kit) to avoid potential inhibition of the downstream qPCR by the phosphate buffer (see next section), following the manufacturer's recommendations. DNA from the water samples was precipitated by adding 35 mL of 96% ethanol, 1.4 mL of 3 M sodium acetate and 10 µL of glycogen in 50 mL falcon tubes.

After three days of incubation at -80 °C, the tubes were centrifuged at 1200 rpm for 35 minutes at 4 °C. The pellets obtained were resuspended in 50 µL of 1 X TE buffer and extracted with a commercial kit (Qiagen™ DNA Blood and Tissue kit). Precipitated DNA and DNA desorbed from HAp samplers were stored at -20 °C prior to analysis.

#### D. Experiment 4: eDNA sampling experiment *in situ*

To test the ability of HAp samplers to sample eDNA in natural conditions, an experiment was conducted on August 27, 2021 in a freshwater pond located in an urban area where a population of *A. aquaticus* is present (Lyon, France). Environmental DNA sampling was carried out at nine locations in the pond. At each location, a P2 HAp sampler was placed at an average depth of 20 cm from the water column, attached with a fishing line perpendicular to the surface and incubated for 24 hours. Upon collection of the samplers, a 1 L sample of water was collected using sterile bottles from all nine locations to compare the amount of eDNA obtained using a conventional sampling method, here filtration. Immediately after collection, water samples were filtered in a laminar flow hood (Noroit, H-BOX, France) at the University of Lyon using a vacuum filtration manifold (ThermoScientific™, Nalgene®) and 47-mm nitrocellulose filters (0.45 µm pore size, MCE Membrane, Merck Millipore, Germany) placed in disposable single-use filter funnels (Thermo Fisher Nalgene™).

Instead of precipitation, filtration was chosen to increase the volume of sampled water hence increasing the probability of detection of the targeted species (Hinlo et al., 2017; Piggott, 2016; Spens et al., 2017). After filtration, all filters were placed into 5 mL LoBind® eppendorf tubes and stored at -20 °C until extraction. DNA from filters was extracted using a modified protocol of the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen™ DNA Blood and Tissue kit). Briefly, 500 µL of ATL buffer and 40 µL of proteinase K were added into 5 mL tubes containing filter membranes and incubated at 56 °C with shaking for 24 hours. After incubation, 400 µL of AL buffer and 400 µL of ethanol 96% were added in tubes. Next steps were done following the manufacturer's recommendations. After 24 hours of exposure, the HAp samplers were removed from the pond and DNA was desorbed following the protocol detailed in section 1.3 and purified (Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ gel and PCR cleaning kit) following the manufacturer's protocol. Desorbed DNA from HAp samplers and filtered DNA from water samples were stored at -20 °C until quantification.

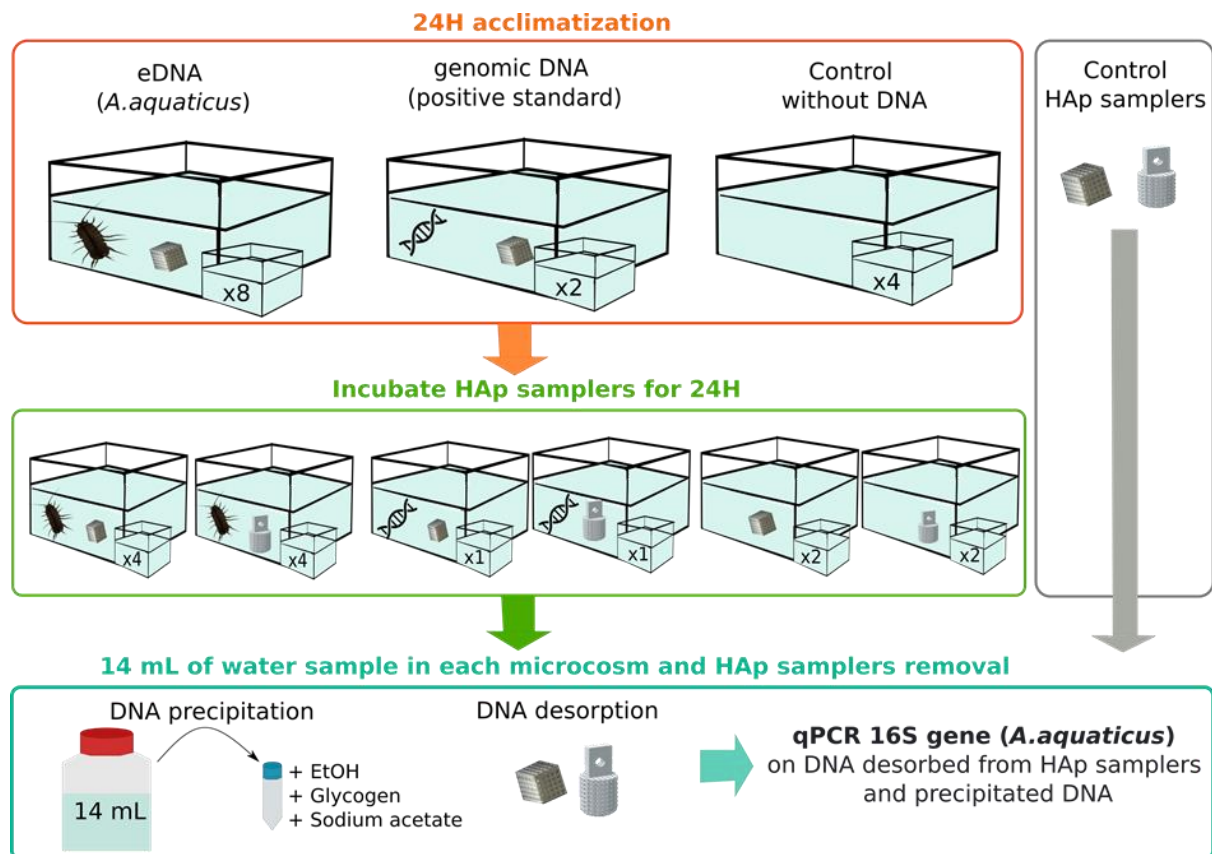


Figure 3-3: Experimental design (experiment 3) testing the efficiency of HAp samplers to recover eDNA from *Asellus aquaticus* in microcosms compared to a conventional sampling method (precipitation).

### 3.1.5. Negative controls and contamination tracing

Concentrated DNA (i.e. DNA marker and genomic DNA) and eDNA samples were processed separately in dedicated laminar flow hoods and with specific equipment. All equipment such as pipettes, filtration material and consumables were decontaminated before each use with a decontamination solution (DNA AWAY®, ThermoScientific™, France) followed by a 15-min ultraviolet light (UV) treatment. Forceps, glass bottles and glass microcosms were immersed for 1 hour in a 5% bleach solution, rinsed with sterilised water and were autoclaved before use.

To trace potential contamination, we have set up four types of contamination controls throughout each experiment: 1) initial controls (control HAp samplers) corresponding to DNA directly desorbed from HAp samplers without incubation in DNA solution, 2) experimental controls corresponding to microcosms or tubes containing water without target DNA in which the samplers are incubated and the water is precipitated or filtered, 3) extraction controls corresponding to filters extracted with a commercial kit (Blood and Tissue kit, Qiagen) without having been in contact with water, 4) quantification controls corresponding to wells without DNA in qPCR and fluorescence plates.

### 3.1.6. DNA quantification and analysis

#### A. Quantification of DNA size marker

In the first experiment testing DNA recovery of various DNA fragments, we quantified total DNA desorbed from HAp samplers and residual DNA in supernatants by fluorescence using a QuBit® 3.0 fluorometer (Invitrogen). We used the dsDNA BR kit (broad range, range: 0.2 to 1000 ng/μL) according to the manufacturer's protocol. The results are reported in ng/μL. DNA bands profiles were visualised using a Fragment Analyzer (Agilent Technologies). For the second experiment (repeatability), desorbed DNA from the HAp samplers and residual DNA in supernatants were also measured by fluorescence (excitation at 480 nm and emission at 520 nm) but using an Infinite M200 Pro microplate fluorometer (TECAN, Switzerland) to allow the parallel analyses of many samples (96 samples per reading). A QuantiFluor® dsDNA kit was used according to the manufacturer's protocol, with a DNA sample volume of 10 μL and 190 μL of working solution. A five-fold dilution series (1500-0 ng/μL) of standard DNA (Lambda DNA Standard, 100 ng/μL) was used to build the standard curve and calculate the sample DNA concentration in ng/μL. The results are reported in percentage of recovered DNA (i.e. DNA adsorbed and desorbed). All DNA samples and controls were quantified in duplicates.

## B. Quantitative PCR assay for *A. aquaticus* eDNA

For experiments testing eDNA sampling by HAp samplers in microcosms and *in situ*, quantitative PCR (qPCR) was used to quantify the amount of *A. aquaticus* eDNA. We designed a pair of primers to specifically amplify a 110 bp fragment of the mitochondrial 16S gene of *A. aquaticus* (5' GGTTTAAATGGCTGCAGTATCC 3', 5' CTTGTGTAATAAAAAGCCTACCTC 3'). The amplification specificity of the primers was tested *in silico* using primer-BLAST function (NCBI) and assessed experimentally through PCR and electrophoresis gel analysis on a closely related species (*Proasellus meridianus*). The qPCR reaction volume was 10  $\mu$ L consisting of 1X SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), 0.5  $\mu$ M of primers and 2  $\mu$ L of DNA. The qPCR assays were run in 96 well plates on a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) in duplicate for experiment 3, as we had a limited amount of DNA material, and in triplicate for experiment 4. qPCR cycle started with an incubation at 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 10 sec and an annealing/extension step at 64 °C for 20 sec before a final melt curve from 65-95 °C (0.5 °C increments). For the microcosm experiments (experiment 3), the qPCR plates included a single seven-fold dilution series of the purified 16S *A. aquaticus* amplicons between  $2.5 \times 10^{10}$  and  $2.5 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L as quantified by a QuBit 3.0 assay. As we expected very low levels of *A. aquaticus* eDNA in the pond (experiment 4), qPCR plates were run with a single seven-fold dilution series of purified 16S amplicons with a copy number ranging from  $2.5 \times 10^7$  and  $2.5 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L. In both qPCR analysis, the  $R^2$  values and PCR efficiency (%) of the calibration curves were 0.99 and  $101.5 \pm 0.1$  (mean  $\pm$  SD).

## C. Limit of detection and quantification

The limit of detection (LOD) was determined as the lowest DNA concentration at which there is 95% of detection across replicates and the limit of quantification (LOQ) as the lowest concentration at which the coefficient of variation is below 35% (Klymus et al., 2019). LOD and LOQ were determined via a 4-fold serial dilution of a 16S *A. aquaticus* amplicon from  $2.5 \times 10^3$  to 2.5 DNA copies/ $\mu$ L. Each dilution was run in 18 qPCR replicates. The LOQ was  $2.5 \times 10^3$  and the LOD  $2.5 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L.

### 3.1.7. Statistical analysis

Wilcoxon tests were performed in DNA sampling experiments to test three null hypotheses: (1) HAp samplers recover a similar amount of DNA whether incubated in a solution of short or long DNA fragments, (2) both prototypes of HAp samplers recover a similar amount of DNA, (3) the amount of eDNA recovered by HAp samplers is similar to that of two conventional eDNA sampling methods (i.e. precipitation, filtration). In the repeatability experiment, a Fisher exact test was performed to test whether the number of failed recovery was homogeneous between experiments A, B and C. Linear mixed-effect models (LMMs) were used to test the influence of the prototype version and of the experiment timing (experiment 2). These models were fitted with the restricted maximum likelihood method using the package nlme (Pinheiro et al., 2021). We tested significance of experiment timing and prototype version using likelihood ratio tests (LRT) between the models with and without the tested variable. Plots were made with the ggplot2 package (Wickham et al., 2016) and all analyses were conducted using R (v 4.0.3).

## 3.2. Results

### 3.2.1. Experiment 1: DNA adsorption and desorption of various fragment sizes

We first tested the capacity of the HAp samplers to collect DNA using concentrated DNA solution. To also test whether DNA fragment size influences DNA adsorption on HAp samplers, we exposed them to two DNA size marker solutions at the same concentration containing a pool of either medium to long (1260-8450 bp) or short to medium DNA fragments (20-2000 bp). After 17 hours of exposure to the samplers, DNA concentrations in the supernatants were significantly reduced or too low to be quantified for both solutions and prototypes (Table 3-2). The concentrations of DNA recovered by the HAp samplers were similar whether incubated in the solution containing the longer or the shorter fragments (Wilcoxon test,  $p = 0.31$ ). Regarding prototypes, P2 samplers recovered significantly more DNA than P1 samplers regardless of the solution in which they were incubated (Wilcoxon test,  $p = 0.04$ ).

Tableau 3-2: DNA concentration in supernatants and recovered from six P1 and six P2 HAp samplers (three replicates per marker solution) measured by QuBit ®.

HAp-samplers	DNA marker	Residual DNA in supernatants after 17h (ng/μL)	DNA desorbed from HAp samplers (ng/μL)
P1-A	short	0.105	0.2
P1-B	short	ND	0.215
P1-C	short	0.183	0.153
P2-A	short	ND	0.677
P2-B	short	ND	0.567
P2-C	short	ND	0.551
P1-D	long	0.062	0.52
P1-E	long	ND	0.88
P1-F	long	ND	0.087
P2-D	long	ND	0.89
P2-E	long	0.053	0.774
P2-F	long	0.061	0.554

Examination of the DNA band profiles (Fig. 3-4, bottom panel), despite a slight size shift between the control profile and the DNA desorbed from the HAp samplers, showed that the P1 and P2 HAp samplers recovered all the DNA fragments from both markers. The relative intensity among fragments was preserved except for the DNA fragments above 5000 bp which were less concentrated after the desorption. Following the manufacturer (Agilent, personal communication), the observed size shift is likely to be due to the buffer solution being of different composition and concentration between the control ladder solution (TE buffer) and the HAp samplers DNA desorption solution (phosphate buffer).

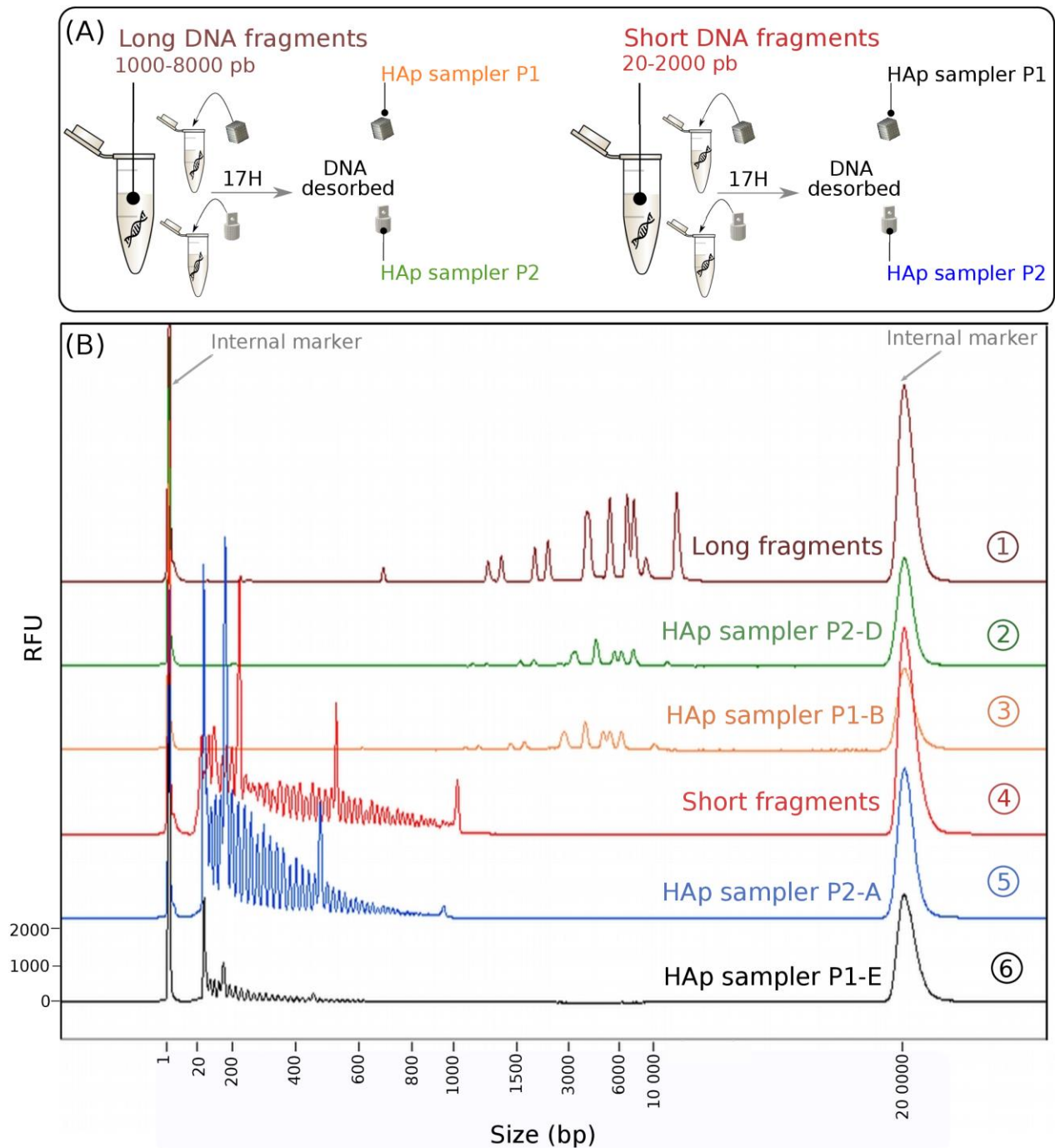


Figure 3-4 : (A) experiment 1 layout, (B) electropherograms of the long and short DNA fragments desorbed from the HAp samplers. The most concentrated DNA replicates were selected to get a clearer description of the fragment distribution (P1-B, P1-E, P2-A, P2-D, Table 2). As standards, the curves 1 and 4 represent the profile of the initial DNA markers. The horizontal axis represents the size of DNA fragments in bp, and the vertical axis represents fluorescence. The left-most (1 bp) and right-most (20 000 bp) peaks are internal markers.



### 3.2.2. Experiment 2: Repeatability of HAp samplers over time

A repeatability experiment was conducted to test the hypothesis that HAp samplers can be reused and that their recovery efficacy is stable after several cycles of use. We performed three consecutive cycles of use (experiment A, B and C), each composed of a decontamination, DNA adsorption and desorption steps. The percentage of DNA recovered (adsorbed and desorbed) by the samplers was lower in experiment A compared to experiments B and C, with an average of 8%, 17% and 15%, respectively (Fig. 3-5). Experiment A showed a disproportion of samplers (18 out of 30, against 0 for experiment B and C) which failed to recover any DNA compared to the other experiments (Fisher exact test,  $p < 1E-10$ ). Nonetheless, while not associated with any experiment in particular, the percentage of DNA recovered was highly variable. The coefficient of variation of the proportion of recovered DNA was on average 65% considering all the samplers and 34% when excluding the samplers which failed to recover any DNA. After removing the samplers which failed to recover any DNA, we tested the influence of the experiment and prototype on the percentage of DNA recovered using a linear mixed-effect model with experiments (A, B and C) and sampler prototypes (P1 or P2) as the fixed effects, and samplers as random effect on the intercept. The experiment had no significant effect on the percentage of DNA recovered (LRT, experiment :  $\chi_{df=2}^2 = 1.16, p = 0.28$ ). While P2 samplers prototype recover more DNA than P1, the effect is not significant (LRT, sampler prototype:  $\chi_{df=1}^2 = 4.96, p = 0.08$ ).

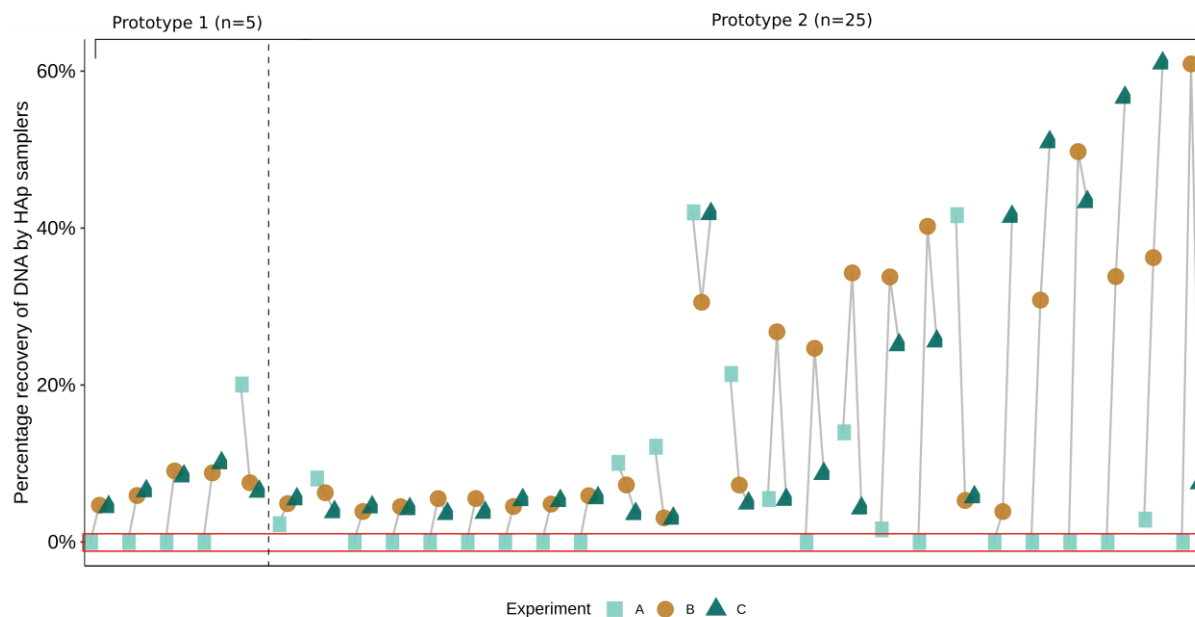


Figure 3-5: Percentage of DNA recovered by two prototypes (P1 and P2) of HAp samplers in three consecutive experiments (A, B and C). Five P1 and 25 P2 samplers are sorted according to their DNA recovery variance. Samplers that recovered no DNA are in the red box.

If we exclude the results of the first experiment, when looking at the relationship between residual DNA in the supernatant and DNA recovered by the HAp samplers (Fig. 3-6), we can delimit three types of sampler behaviour: (1) a group of 13 samplers with low adsorption capacities as demonstrated by a low DNA recovery (< 20%) and a high proportion of DNA remaining in the supernatant (>30%); (2) a group of 7 samplers with high adsorption and desorption capacities (recovery > 20%, supernatant < 30%); (3) and a group of 5 samplers which adsorbed most of the DNA but did not desorb it (supernatant < 30%, recovery < 20%). For this last group, an alternative explanation could be that in these tubes DNA degraded or was adsorbed on the plastic tubes instead of the samplers. By quantifying residual supernatant DNA at the beginning and at the end of each experiment in three tubes without samplers, we estimated the average percentage of DNA loss at 25% ( $\pm 4.5\%$ ) which is too low to explain the behaviour of this third group of sampler.

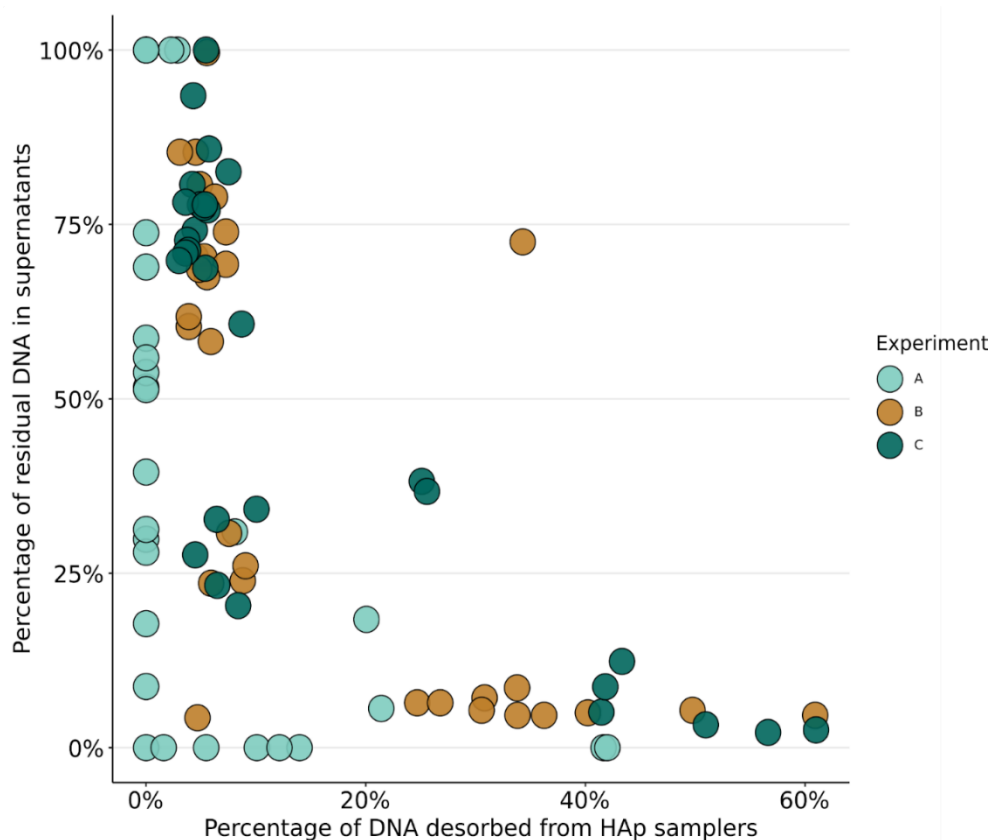


Figure 3-6: Relationship between DNA desorbed from HAp samplers and residual DNA in supernatants (%) in three consecutive experiments (A, B and C). The lines connect the same sampler used in experiments B and C.

### 3.2.3. Experiment 3: eDNA sampling in microcosms

We deployed the HAp samplers in microcosms containing isopods (*Asellus aquaticus*) to test their ability to recover eDNA in comparison to a conventional sampling method (here precipitation). In a microcosm with no organisms, we observed low levels of DNA that were similar or slightly above the amount of DNA observed in control samplers that were not immersed in a microcosm (Fig. 3-7). This is indicative of a slight level of cross-contamination between microcosms.

We therefore determined, for each sampling method, a 16S rDNA copy number below which we cannot distinguish between a contamination and a positive result (blank limit, LOB), which is more appropriate in this context than the previously calculated LOD and LOQ. The LOB was  $7 \times 10^7$  copies for HAp samplers and  $10 \times 10^7$  copies for precipitation. Using concentrated genomic DNA as a positive control, the samplers recovered up to  $2.4 \times 10^{10}$  DNA copies/sampler, one magnitude more than with precipitation. In the microcosms that contained isopods, the amount of 16S eDNA molecules was above the LOB in seven HAp samplers and in four precipitated water samples out of the eight replicates. The number of 16S eDNA molecules recovered was similar between precipitated water samples and HAp samplers (Wilcox-test,  $p = 0.35$ ).

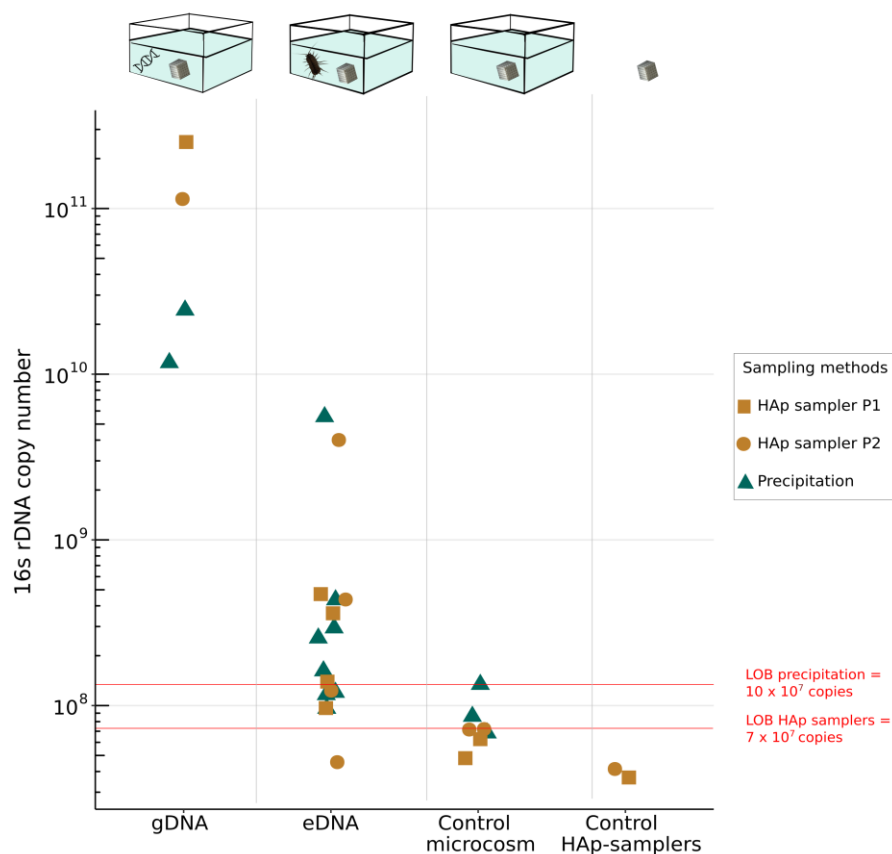


Figure 3-7 : Number of copies (in log scale) of *A. aquaticus* 16S rDNA recovered by the two HAp prototypes (P1 = triangle, P2 = circle) and in precipitated water samples (blue triangle) after 24 hours of incubation in microcosm containing *A. aquaticus* genomic DNA u

### 3.2.4. Experiment 4: *in situ* eDNA sampling

We tested the ability of nine HAp samplers to recover isopod eDNA under natural conditions by immersing them for 24 hours in a freshwater pond that is inhabited by a population of *A. aquaticus*. We compared the amount of DNA recovered from the samplers with that obtained by the filtration of nine 1 L samples of water. Despite the very low levels of eDNA amplified (i.e. below the limit of detection;  $2.5 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ), *A. aquaticus* was detected by seven HAp samplers replicates and in three filtered water samples out of the nine samples (Fig. 3-8). On average over the nine replicates, HAp samplers recovered a higher amount of DNA than filtration (samplers = 6 DNA copies, filtration = 15 DNA copies). Detections of target DNA at lower copy numbers than the LOD are common in eDNA studies due to the low DNA concentrations of the target species in natural environments (i.e.  $< 100$  target copies/reaction; Ellison et al., 2006). Here, we assume that the detections are true positives because 1) all samples amplified below 40 cycles (Ct), 2) the melting curve was uniform (without additional peaks) and 3) no amplifications of the targeted species occurred in any of the negative controls including filtration and extractions control (Klymus et al., 2020).

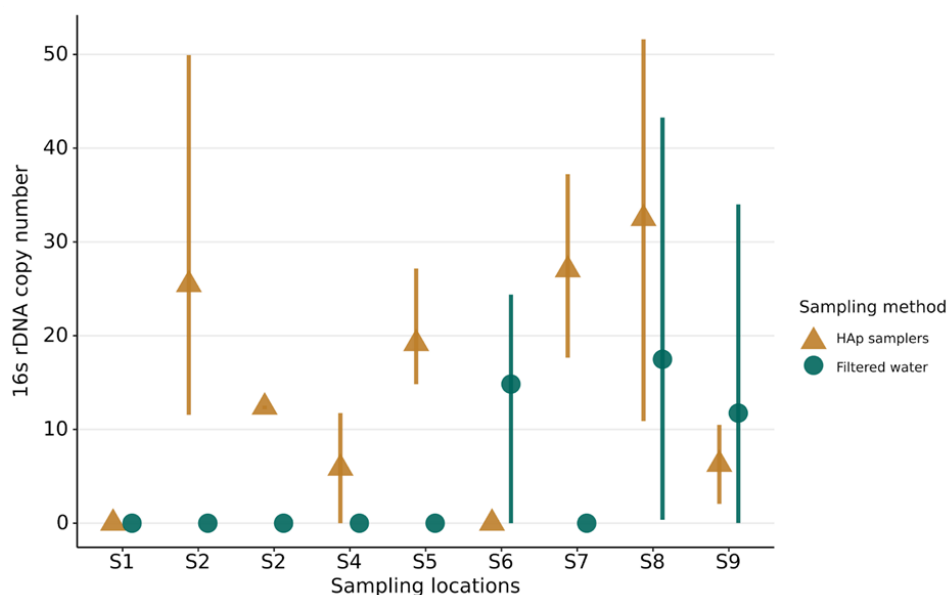


Figure 3-8: Number of copies of *A. aquaticus* eDNA recovered from HAp samplers P2 (orange triangles) and in 1 L filtered water samples (blue circles). Sampling locations in the pond are ranging from S1 to S9. Each point represents the average number of DNA copies over three qPCR measurements per sample, and the vertical bar represents the lowest and highest estimates.

### 3.3. Discussion

#### 3.3.1. HAp samplers recover DNA fragments of various sizes

Using genomic DNA, we validated the concept of passive HAp samplers and their capacity to recover free DNA fragments of various sizes. In only 17 hours, HAp samplers recovered up to 890 ng in experiment 1 and 1750 ng in experiment 2, which is well above the theoretical maximum quantity we estimated (400 ng for P1 and 800 ng for P2 samplers) using a projection of a DNA monolayer on the surface of the samplers (section 2.3.2). As we predicted, P2 samplers recovered more DNA than P1 samplers during our experiments. These results confirm the high binding affinity between DNA and hydroxyapatite (del Valle et al., 2014; Okazaki et al., 2001), which increase with the HAp mass (Brundin et al., 2013) and suggest that more than one layer of DNA molecules can bind to the HAp surface. Depending on physical parameters such as the microstructure of the surface and the number and size of porosities, DNA molecules can be deposited in different ways on the surface of minerals (Paget et al., 1992).

For example, Khanna et al. (1998) found that DNA molecules predominantly adsorb to the edges of clays, and that one end of a DNA fragment could bind when the other end is unbound and extends outwards. So far, DNA adsorption mechanisms have been described on mineral powders or soil particles but remain to be studied on 3D-printed hydroxyapatite surfaces (James Cleaves et al., 2011; Yu et al., 2013). Further experiments are needed to accurately quantify the maximum adsorption capacity of a HAp sampler and to characterise the surface parameters (e.g. microstructure, porosities) that influence DNA adsorption. While we hypothesised that longer DNA fragments would be preferentially adsorbed due to a greater number of binding sites, we found no clear evidence that longer fragments were preferentially adsorbed on the HAp samplers. On the contrary, the examination of DNA band profiles (Fig. 3-4) suggests that DNA fragments above 5000 bp are less well adsorbed or desorbed of the HAp sampler surface.

This is consistent with what is observed on soil particles where smaller DNA fragments (< 3 Kb) or those with lower molecular weights are adsorbed more easily than longer fragments (> 7 Kb, Franchi et al., 1999; Ogram et al., 1994). This is explained by an exclusion phenomenon of long DNA fragments in the interstices of the mineral, as well as a difference in the diffusion coefficient between small and long DNA fragments (Ogwada & Sparks, 1986; Yu et al., 2013). As the geometry and microstructure of our HAp samplers differ widely from soil particles, the adsorption processes are certainly very different, explaining why we did not find a strong effect of DNA fragment size. A sampling method that is not strongly biased toward a given range of fragment sizes, or even favours short DNA fragments, is a real advantage for eDNA sampling. eDNA is a complex mixture of genetic material ranging from cells to more or less degraded free DNA fragments (Wilcox et al., 2015). Free DNA fragments may predominate in certain types of environments (e.g. acidic) (Seymour et al., 2018) and may be of different sizes depending on their level of degradation. While free DNA adsorbs to the HAp samplers, it remains to be tested whether other forms of eDNA such as proteo-nucleic complexes or even larger particles can also be sampled.

### 3.3.2. Environmental DNA sampling

Our experiments demonstrated that HAp samplers can sample animal eDNA passively in fresh waters. In controlled and natural conditions, at least 80% of the sampler replicates successfully detected *A. aquaticus* eDNA, after only 24 hours of immersion. Given the low biomass of these small isopods which, unlike large organisms commonly used in eDNA-based studies (e.g. fish, amphibians; Jo et al., 2020; Maruyama et al., 2014), are likely to release very small amounts of eDNA, and given the short experiment duration, this overall high rate of detection demonstrates the high sensitivity of HAp samplers to detect isopods. Although HAp samplers are a promising and simple option for target organism detection, additional field experiments are needed to validate HAp samplers efficiency in other ecosystems (e.g. rivers) to describe whole communities using metabarcoding.

The efficiency of HAp samplers was comparable or higher to that obtained with conventional methods used in our study (precipitation and filtration). While the eDNA recovery efficiency of the HAp samplers was similar to DNA precipitation in microcosms, it was higher than filtration in the pond experiment. As filtration is based on sampling a volume of water at a specific time window, it could miss pulse inputs of eDNA (e.g. molts, gametes). Another explanation could be that since eDNA degrades rapidly in lentic systems, as has been shown with fish eDNA (Li et al., 2019), the eDNA could be mainly in extracellular and degraded form and pass through the filters. As the HAp samplers remain in the water longer, they accumulate extracellular DNA over time, and are more likely to catch a weak and temporary eDNA signal. In addition, one of the characteristics of minerals and in particular hydroxyapatite, is to accumulate DNA and protect it from degradation (Pietramellara et al., 2009). DNA adsorbed on mineral surfaces can remain in place for several days or more (Brundin et al., 2013; Cai et al., 2006). Further investigations need to be carried out to assess the residence time of eDNA on the sampler.

### 3.3.3. Repeatability issues

Although HAp samplers show a great potential for DNA sampling, repeatability appears to be a concerning issue. HAp samplers showed extreme variability in DNA recovery among strictly identical conditions (Experiment 2). Given the numerous samplers that did not recover any DNA during the first but did recover DNA at the later experiments (Fig. 3-5), one might have expected that DNA recovery could improve with cycle of use. Nonetheless, no significant difference between the two later experiments was found. Furthermore, by simultaneously monitoring the residual DNA and the desorbed DNA, we were able to determine that this unexplained variability is the result of two variable mechanisms which may act independently: a variable DNA adsorption rate and a variable desorption rate.

Ignoring the first experiment (Fig. 3-6, Exp2.A), 7 samplers adsorbed and desorbed DNA, 13 did not adsorb DNA and 5 adsorbed DNA but partially desorbed it during the two remaining experiments (Fig. 3-6, Exp2.B,C). To our knowledge, there is no literature reporting an uncoupling between adsorption and desorption rates. However, Pietramellara et al. (2009) found that DNA can be partially desorbed from clay surfaces because the bonds between the DNA molecules and the surface are of different nature, which results in different degrees of strength.



Depending on the strength of the bond, some DNA molecules might be hard to desorb. Although electrostatic interactions between the negative charges of the DNA and the surface is the main mechanism of DNA adsorption on hydroxyapatite (Okazaki et al., 2001; S. Yetgin, 2013), other mechanisms are possible such as hydrophobic interaction and OH-bonding (Douarche et al., 2008).

The DNA/surface interactions strongly depend on the physico-chemical properties of the sampler surface and the solution in which the binding reaction takes place (Gallo et al., 2018). Among the surface properties, porosity, specific surface area, crystallinity and stoichiometry of the HAp phase (calcium groups can be substituted by other ions) could play a major role in DNA adsorption. The different manufacturing steps, such as the HAp densification (i.e. sintering), can greatly influence most of these surface properties. In particular, ionic substitution (e.g. carbonatation) and partial dehydration are known to occur frequently, and heterogeneously, in HAp during thermal treatment (J-P.Lafon, 2004; Wang, Dörner-Reisel and Müller, 2004) such as the ones used here to decontaminate the samplers before and between experiments, and might be the source of the observed variability. In addition, the chemical properties of the aqueous solution such as the pH (Alvarez et al., 1998; Cortez & Schnitzer, 1981; Khanna & Stotzky, 1992), ionic strength and the concentration of divalent cations (James Cleaves et al., 2011; Saeki et al., 2010) significantly impacts DNA adsorption and desorption. For example Wu et al. (2011) showed that by lowering the pH of the solution from 8 to 5 during the experiment, the binding between the DNA and the surface (here graphene oxide) increased from 30% to 100%. Surface analysis needs to be carried out to identify the physical (e.g. porosity, crystalline phases) and chemical (e.g. surface ionic groups) parameters involved in DNA binding on the HAp surface and the extent to which these parameters are influenced by the manufacturing and use of the sampler (e.g. sintering, debinding, immersion in DNA solution).

### 3.4. Conclusion

In view of the democratisation of the use of eDNA, tools are needed to easily and cost-effectively sample eDNA. We demonstrate that 3D passive hydroxyapatite samplers can be designed and used to collect eDNA, albeit some repeatability issues. Provided we can get a better understanding and control of the interaction between eDNA and HAp, this approach offers a simple alternative solution for eDNA-based biomonitoring. It also opens up an interdisciplinary field at the interface between engineering, surface science and molecular ecology.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by the CNRS Mission pour les Initiatives Transverses et Interdisciplinaires (project XLIFE CAPTAS), the French Biodiversity Agency (OFB), the National Technology Research Association (ANRT) and the company Eurofins Hydrobiologie France. This work was realised thanks to the support of the Graduate School H<sub>2</sub>O'Lyon (ANR-17-EURE-0018) and Université de Lyon (UdL) as part of the programme "Investissements d'Avenir" run by Agence Nationale de la Recherche (ANR). We acknowledge Louise Camus for her help with the microcosm experiment, Valentin Vasselon for his advice on experiments with artificial DNA and Jalal Omarakly for the surface analysis of the samplers. We also acknowledge the DTAMB platform (Université Claude Bernard Lyon 1) for access to their equipment and their help with the Fragment Analyzer.

#### **Data Accessibility**

The fluorescence data, DNA concentrations and DNA copy numbers are available on Zenodo (Zenodo, <https://doi.org/10.5281/zenodo.5997707>).

#### **Author's contributions**

TL and CM conceived the ideas and designed HAp samplers. Experimental design was conceived by TL, LK and HV. HAp samplers were thermal treated and characterised by HR, ST and LG. Laboratory experiments were conducted by HV and LK. Data analysis was conducted by HV and TL. HV and TL led the writing of the manuscript. All authors contributed to the manuscript.

## 4. Références

- Alvarez, A. J., Khanna, M., Toranzos, G. A., & Stotzky, G. (1998). Amplification of DNA bound on clay minerals. *Molecular Ecology*, 7(6), 775–778. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00339.x>
- Beng, K. C., & Corlett, R. T. (2020). Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: Opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, 29(7), 2089–2121. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-01980-0>
- Bessey, C., Neil Jarman, S., Simpson, T., Miller, H., Stewart, T., Kenneth Keesing, J., & Berry, O. (2021). Passive eDNA collection enhances aquatic biodiversity analysis. *Communications Biology*, 4(1), 236. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01760-8>
- Brundin, M., Figdor, D., Sundqvist, G., & Sjögren, U. (2013). DNA Binding to Hydroxyapatite: A Potential Mechanism for Preservation of Microbial DNA. *Journal of Endodontics*, 39(2), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.09.013>
- Cai, P., Huang, Q., Zhang, X., & Chen, H. (2006). Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(3), 471–476. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.05.019>
- Cortez, J., & Schnitzer, M. (1981). Reactions of nucleic acid bases with inorganic soil constituents. *Soil Biology and Biochemistry*, 13(3), 173–178. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(81\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(81)90016-X)
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>
- del Valle, L. J., Bertran, O., Chaves, G., Revilla-López, G., Rivas, M., Casas, M. T., Casanovas, J., Turon, P., Puiggali, J., & Alemán, C. (2014). DNA adsorbed on hydroxyapatite surfaces. *J. Mater. Chem. B*, 2(40), 6953–6966. <https://doi.org/10.1039/C4TB01184H>

- Douarche, C., Cortès, R., Roser, S. J., Sikorav, J.-L., & Braslau, A. (2008). DNA Adsorption at Liquid/Solid Interfaces. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(44), 13676–13679. <https://doi.org/10.1021/jp807759d>
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(02), 163. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Ellison, S. L., English, C. A., Burns, M. J., & Keer, J. T. (2006). Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 6(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-33>
- Franchi, M., Bramanti, E., Bonzi, L. M., Orioli, L., Vettori, C., & Gallori, E. (1999). Clay-Nucleic Acid Complexes: Characteristics and Implications for the Preservation of Genetic Material in Primeval Habitats. 19.
- Gaillard, C., & Strauss, F. (1998). Avoiding adsorption of DNA to polypropylene tubes and denaturation of short DNA fragments. *Technical Tips Online*, 3(1), 63–65. [https://doi.org/10.1016/S1366-2120\(08\)70101-6](https://doi.org/10.1016/S1366-2120(08)70101-6)
- Gallo, M., Tadier, S., Meille, S., & Chevalier, J. (2018). Resorption of calcium phosphate materials: Considerations on the in vitro evaluation. *Journal of the European Ceramic Society*, 38(3), 899–914. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.07.004>
- Gardner, C. M., & Gunsch, C. K. (2017). Adsorption capacity of multiple DNA sources to clay minerals and environmental soil matrices less than previously estimated. *Chemosphere*, 175, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.030>
- Grunenwald, A., Keyser, C., Sautereau, A. M., Crubézy, E., Ludes, B., & Drouet, C. (2014). Adsorption of DNA on biomimetic apatites: Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA. *Applied Surface Science*, 292, 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.12.063>
- Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., & Furlan, E. (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLOS ONE*, 12(6), e0179251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>
- James Cleaves, H., Crapster-Pregont, E., Jonsson, C. M., Jonsson, C. L., Sverjensky, D. A., & Hazen, R. A. (2011). The adsorption of short single-stranded DNA oligomers to

- mineral surfaces. *Chemosphere*, 83(11), 1560–1567.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.023>
- Jo, T., Arimoto, M., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2020). Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2(2), 140–151. <https://doi.org/10.1002/edn3.51>
- Kattimani, V. S., Kondaka, S., & Lingamaneni, K. P. (2016). Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone and Tissue Regeneration Insights*, 7, BTRI.S36138. <https://doi.org/10.4137/BTRI.S36138>
- Khanna, M., & Stotzky, G. (1992). Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1930–1939.  
<https://doi.org/10.1128/aem.58.6.1930-1939.1992>
- Khanna, M., Yoder, M., Calamai, L., & Stotzky, G. (1998). X-ray diffractometry and electron microscopy of DNA from *Bacillus subtilis* bound on clay minerals. *Sciences of Soils*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10112-998-0001-3>
- Kirtane, A., Atkinson, J. D., & Sassoubre, L. (2020). Design and Validation of Passive Environmental DNA Samplers Using Granular Activated Carbon and Montmorillonite Clay. *Environmental Science & Technology*, 54(19), 11961–11970.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01863>
- Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., Jackson, C. A., Lance, R. F., Mangan, A. M., Monroe, E. M., Piaggio, A. J., Stokdyk, J. P., Wilson, C. C., & Richter, C. A. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2(3), 271–282.  
<https://doi.org/10.1002/edn3.29>
- Lafon, J.-P. Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées. PhD thesis, University of Limoges, France (2004).
- Langlois, V. S., Allison, M. J., Bergman, L. C., To, T. A., & Helbing, C. C. (2020). The need for robust qPCR based eDNA detection assays in environmental monitoring and species inventories. *Environmental DNA*, edn3.164. <https://doi.org/10.1002/edn3.164>
- Li, J., Lawson Handley, L. J., Harper, L. R., Brys, R., Watson, H. V., Di Muri, C., Zhang, X., & Hänfling, B. (2019). Limited dispersion and quick degradation of environmental DNA in fish ponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA*, 1(3), 238–250.  
<https://doi.org/10.1002/edn3.24>

- Mächler, E., Deiner, K., Steinmann, P., & Altermatt, F. (2014). Utility of environmental DNA for monitoring rare and indicator macroinvertebrate species. *Freshwater Science*, 33(4), 1174–1183. <https://doi.org/10.1086/678128>
- Mandelkern, M., Elias, J. G., Eden, D., & Crothers, D. M. (1981). The dimensions of DNA in solution. *Journal of molecular biology*, 152(1), 153-161.
- Mariani, S., Baillie, C., Colosimo, G., & Riesgo, A. (2019). Sponges as natural environmental DNA samplers. *Current Biology*, 29(11), R401–R402. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.031>
- Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., & Minamoto, T. (2014). The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. *PLoS ONE*, 9(12), e114639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114639>
- Ogram, A. V., Mathot, M. L., Harsh, J. B., Boyle, J., & Pettigrew Jr, C. A. (1994). Effects of DNA polymer length on its adsorption to soils. *Applied and environmental microbiology*, 60(2), 393-396. <https://doi.org/10.1128/aem.60.2.393-396.1994>
- Ogwada, R. A., & Sparks, D. L. (1986). Kinetics of Ion Exchange on Clay Minerals and Soil: II. Elucidation of Rate-limiting Steps. *Soil Science Society of America Journal*, 50(5), 1162–1166. <https://doi.org/10.2136/sssaj1986.03615995005000050014x>
- Okazaki, M., Yoshida, Y., Yamaguchi, S., Kaneno, M., & Elliott, J. C. (2001). Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00433-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00433-6)
- Paget, E., Monrozier, L. J., & Simonet, P. (1992). Adsorption of DNA on clay minerals: Protection against DNaseI and influence on gene transfer. *FEMS Microbiology Letters*, 97(1–2), 31–39. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05435>
- Peltier, W. H., & Weber, C. I. (1985). Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms.
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. (2009). Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3), 219–235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2021). *\_nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects*. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>

- Piggott, M. P. (2016). Evaluating the effects of laboratory protocols on eDNA detection probability for an endangered freshwater fish. *Ecology and Evolution*, 6(9), 2739–2750. <https://doi.org/10.1002/ece3.2083>
- Rahaman, M. N. (2017). *Ceramic Processing and Sintering* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315274126>
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 94(3), 849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Rivera, S. F., Vasselon, V., Mary, N., Monnier, O., Rimet, F., & Bouchez, A. (2021). Exploring the capacity of aquatic biofilms to act as environmental DNA samplers: Test on macroinvertebrate communities in rivers. *Science of The Total Environment*, 763, 144208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144208>
- Saeki, K., Kunito, T., & Sakai, M. (2010). Effects of pH, ionic strength, and solutes on DNA adsorption by andosols. *Biology and Fertility of Soils*, 46(5), 531–535. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0447-y>
- Seymour, M., Durance, I., Cosby, B. J., Ransom-Jones, E., Deiner, K., Ormerod, S. J., Colbourne, J. K., Wilgar, G., Carvalho, G. R., de Bruyn, M., Edwards, F., Emmett, B. A., Bik, H. M., & Creer, S. (2018). Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology*, 1(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s42003-017-0005-3>
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research: NEXT-GENERATION SEQUENCING FOR ENVIRONMENTAL DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1794–1805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>
- Spear, S. F., Groves, J. D., Williams, L. A., & Waits, L. P. (2015). Using environmental DNA methods to improve detectability in a hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) monitoring program. *Biological Conservation*, 183, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.016>
- Spens, J., Evans, A. R., Halfmaerten, D., Knudsen, S. W., Sengupta, M. E., Mak, S. S. T., Sigsgaard, E. E., & Hellström, M. (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol:

- Advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635–645.  
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12683>
- Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., & Yamanaka, H. (2019). The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1(2), 99–108.  
<https://doi.org/10.1002/edn3.21>
- Wang, T., Dorner-Reisel, A., & Müller, E. (2004). Thermogravimetric and thermokinetic investigation of the dehydroxylation of a hydroxyapatite powder. *Journal of the European Ceramic Society*, 24(4), 693–698.  
[https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(03\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(03)00248-6)
- Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016. <http://ggplot2.org>
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Lowe, W. H., & Schwartz, M. K. (2015). Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Conservation Genetics Resources*, 7(3), 639–641. <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0465-z>
- Wu, M., Kempaiah, R., Huang, P.-J. J., Maheshwari, V., & Liu, J. (2011). Adsorption and Desorption of DNA on Graphene Oxide Studied by Fluorescently Labeled Oligonucleotides. *Langmuir*, 27(6), 2731–2738. <https://doi.org/10.1021/la1037926>
- Yu, W. H., Li, N., Tong, D. S., Zhou, C. H., Lin, C. X. (Cynthia), & Xu, C. Y. (2013). Adsorption of proteins and nucleic acids on clay minerals and their interactions: A review. *Applied Clay Science*, 80–81, 443–452.  
<https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.06.003>
- Yetgin, S. DNA adsorption on silica, alumina and hydroxyapatite and imaging of DNA by atomic force microscopy. PhD thesis, Institute of Technology, Chemical Engineering, Izmir (2013).  
<https://hdl.handle.net/11147/2956>





# Chapitre IV

## Applicabilité de l'ADNe pour la bioindication des rivières intermittentes

---

Les deux chapitres précédents ont permis d'acquérir des connaissances fondamentales sur l'ADNe ([Chapitre II](#)) et de développer un outil d'échantillonnage passif de l'ADNe ([Chapitre III](#)). Le chapitre qui suit présente une étude dont l'objectif est de tester l'applicabilité de diverses méthodes d'échantillonnage d'ADNe, dont les capteurs développés précédemment, pour la bioindication dans un milieu complexe et dynamique. Il s'agit d'une étude exploratoire sous la forme d'un chapitre en français, qui fera prochainement l'objet d'un article scientifique.

# 1. L'ADNe de macro-invertébrés révèle l'impact d'une pollution en contexte d'intermittence

Héloïse Verdier<sup>1,2,3</sup>, Maïlys Gauthier<sup>1</sup>, Thibault Datry<sup>3</sup>, Tristan Lefébure<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1,

CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France

<sup>2</sup> Eurofins Hydrobiologie France, Rue Lucien Cuenot, 54521 Maxéville, France

<sup>3</sup> INRAE, UR-Riverly, Centre de Lyon-Villeurbanne, 5 rue de la Doua CS70077, 69626 VILLEURBANNE Cedex, France

## 1.1. Résumé

Détecter une perturbation anthropique par l'analyse des communautés biologiques, connue sous le nom de bioindication, s'avère particulièrement difficile dans les milieux aquatiques complexes et dynamiques comme les rivières intermittentes. Pourtant, ces milieux représentent près de 50 % des rivières mondiales, et nécessitent des méthodes sensibles et fiables pour déceler les impacts anthropiques et appliquer des programmes de gestion et de conservation adaptés. Le metabarcoding de l'ADN environnemental (ADNe) pourrait lever les verrous liés à la méthode de bioindication conventionnelle. Néanmoins, sa capacité à détecter un impact anthropique localisé, en particulier dans les rivières intermittentes, est incertaine. De plus, plusieurs matrices d'échantillonnage (e.g ; eau, sédiments) et méthodes associées peuvent être utilisées et leur potentiel et leur complémentarité n'a pas été investigué jusqu'à présent. Par le biais d'une expérience *in situ*, l'objectif général de cette étude était d'évaluer la capacité des matrices naturelles et artificielles à détecter un impact anthropique en condition d'intermittence, et identifier de potentiels bioindicateurs de pollution.

Pour cela, nous avons échantillonné les communautés de macroinvertébrés, couramment utilisés pour déceler l'impact d'une pollution, à l'amont et à l'aval de stations d'épuration agissant comme source de pollution, le long d'une rivière présentant un gradient d'intermittence (c'est-à-dire présentant des durées d'assèchements croissantes). Cette étude révèle que l'ADNe, lorsqu'il est isolé à partir de certaines matrices environnementales, est capable de retranscrire l'impact d'une pollution sur les communautés d'invertébrés, et ce, même dans un contexte d'intermittence. De plus, elle met en évidence des taxons qui pourraient s'avérer pertinents pour détecter des pollutions dans les rivières intermittentes. Ouvre des possibilités pour la bioindication de ces milieux et l'amélioration de leur gestion.

### 1.2. Introduction

Les écosystèmes d'eau douce sont impactés par de multiples perturbations anthropiques (Meybeck, 2003; Vörösmarty et al., 2010). La surveillance et l'évaluation de ces impacts sont au cœur des législations internationales telles que la Directive Cadre sur l'Eau en Europe (DCE, 2000/60/CE) ou le Clean Water Act aux États-Unis (Environmental Law Institute, 2012). Cette évaluation se base en grande partie sur la bioindication. Cette approche consiste à analyser des communautés biologiques dites « bioindicatrices », témoins des variations des conditions environnementales d'origine naturelle et/ou anthropique et donc de la santé des écosystèmes (Hillebrand et al., 2018). Les macroinvertébrés benthiques sont couramment utilisés comme communautés bioindicatrices en raison de leur panel de réponses aux différents facteurs environnementaux, allant de la tolérance à la sensibilité élevée (Birk et al., 2012; J. N. Macher et al., 2016). Pour cela, les macroinvertébrés benthiques sont prélevés dans le milieu à l'aide de filet surber, triés, puis identifiés sur la base de leurs traits morphologiques. Les listes taxonomiques établies sont utilisées pour calculer des indices biotiques reflétant la qualité du milieu, à partir de données relatives à l'occurrence et à l'abondance des taxons, ainsi que des données sur leurs traits biologiques (e.g. polluo-sensibilité, polyvoltinisme; Bonada et al., 2006; Pereira et al., 2013).

Malgré les efforts de standardisation, l'application des méthodes de bioindication conventionnelles reste un défi majeur pour de nombreux écosystèmes complexes et dynamiques. C'est le cas des rivières intermittentes (RIs) qui cessent de s'écouler ou s'assèchent périodiquement sur un ou plusieurs tronçons (Skoulikidis et al., 2017). Représentant plus de la moitié des rivières mondiales (Messenger et al., 2021), les RIs sont des systèmes extrêmement dynamiques puisque soumis à de fortes variations hydrologiques dans le temps et dans l'espace (Datry et al., 2017). Elles peuvent à la fois présenter des habitats lotiques (eau courante), lentiques (eau stagnante) et terrestres (lit de rivière asséché) (Datry et al., 2017). Ces conditions hydrologiques font des RIs des écosystèmes naturellement dynamiques, dans lesquels l'impact de perturbations anthropiques est difficile à déceler par les approches de bioindication conventionnelles (Stubbington et al., 2018a). Souvent, l'impact de perturbations anthropiques n'est pas détectable en contexte intermittent (Crabot, Dolédec, et al., 2021; Morais et al., 2004; Soria et al., 2020). Au contraire, dans certains cas, les méthodes de bioindication conventionnelles indiquent même une amélioration de l'état écologique de tronçons intermittents à l'aval de rejets de station d'épuration, dû à une remise en eau « artificielle » (Crabot, Polášek, et al., 2021). Le manque de fiabilité de la bioindication standard pour détecter des impacts anthropiques en RIs est dû à deux raisons principales.

La première raison est que les protocoles de bioindication ont été conçus à partir de rivières pérennes et des communautés biologiques qui leur sont inféodées, et sans tenir compte de l'assèchement en tant que stress. Par conséquent, cette approche néglige de nombreux taxons potentiellement bioindicateurs pour les rivières intermittentes, à la fois durant l'étape l'échantillonnage (Watson & Dallas, 2013), mais aussi lors du calcul d'un indice de qualité du milieu. En rivière, l'échantillonnage des macroinvertébrés est réalisé exclusivement pendant les phases d'écoulement et sur des tronçons localisés (AFNOR, 2014). En plus d'être extrêmement invasif, ce protocole s'avère techniquement impossible à mettre en œuvre lorsque la rivière est asséchée ou sous forme de mouilles déconnectées (pouvant durer plusieurs mois) et ne tient pas compte des processus de dispersion et de sensibilité ou au contraire de résistance des organismes aux assèchements (Leigh et al., 2016; Robson et al., 2011). En particulier, les indices biotiques sont souvent basés sur des taxons polluo-sensibles comme les Ephemeroptera, les Plecoptera et les Trichoptera (dénommés EPT). Cependant, ces taxons s'avèrent également très sensibles à l'assèchement et leurs réponses à celui-ci ne sont pas prises en compte dans le calcul des indices (Reyjol et al., 2014).

Or, les taxons comme les Odonata, les Coleoptera et les Heteroptera (dénommés OCH), mais aussi les Oligochaeta et les Diptera (Bonada et al., 2006b; Datry, 2012) sont prépondérants en RIs, plus tolérants à différents types de dégradation de la qualité de l'eau, notamment la pollution de l'eau (Chang et al., 2014), mais sont peu pris en compte dans le calcul des indices. L'omission de ces taxons induit une vision tronquée des communautés des RIs réduisant ainsi leur potentiel à refléter la présence d'une perturbation additionnelle (e.g. pollution, Cañedo-Argüelles et al., 2016).

La deuxième difficulté réside dans l'étape d'identification morphologique des organismes ; processus coûteux et fastidieux reposant sur une expertise taxonomique élevée. D'une part, ces contraintes méthodologiques et financières réduisent inévitablement le nombre de suivis et de points d'échantillonnage. D'autre part, l'identification s'arrête à un niveau taxonomique trop grossier (e.g. famille) pour détecter des réponses suffisamment précises des communautés aux facteurs de stress, d'autant plus lorsque de multiples sources de stress s'additionnent (e.g. assèchements et pollution; (Cañedo-Argüelles et al., 2016; J. N. Macher et al., 2016, Stubbington et al., 2018). En effet, les niveaux taxonomiques inférieurs (i.e. genre, espèce) sont plus à même de mettre en évidence et distinguer les différents stress environnementaux (Bailey et al., 2001). Au vu de l'ensemble de ces challenges et de la prévalence des RIs, il est indispensable de développer des méthodes de bioindication adaptées aux RIs non invasives, avec une résolution taxonomique plus fine, et pouvant être déployé à large échelle spatiale et temporelle (e.g., Steward et al., 2018; Stubbington et al., 2018, Munné et al., 2021).

L'utilisation d'outils moléculaires, et particulièrement de l'ADN environnemental (ADNe), apparaît comme une alternative prometteuse pour la bioindication des RIs (Blackman et al., 2021, Laini et al., 2020). L'ADNe dérivé des macro-organismes correspond au matériel génétique relargué par les organismes vivants dans leur environnement par divers processus biologiques tels que l'excrétion, la desquamation ou encore la défécation (Taberlet et al., 2018). Une fois relargué, cet ADN transite dans l'écosystème et s'accumule dans des matrices environnementales (e.g. eau, sédiments), desquelles il peut être extrait et analysé afin d'inférer la présence d'organisme. Le metabarcoding de l'ADNe est une analyse consistant à l'amplification et au séquençage simultané de plusieurs espèces à partir d'échantillons d'ADNe.

Cette approche est apparue comme une révolution (Deiner et al., 2017; Taberlet et al., 2018), puisqu'elle permet de caractériser des communautés biologiques entières résidant dans un écosystème, et ce, sans avoir à les capturer au préalable. En plus de son caractère non invasif, le metabarcoding de l'ADNe présente de nombreux avantages pour la bioindication des RIs. Premièrement, sa facilité de mise en œuvre et sa rapidité permettent d'augmenter l'échelle temporelle et spatiale des inventaires de communautés biologiques. Ainsi, il permettrait une meilleure prise en compte (i) de la variabilité spatio-temporelle des RIs et (ii) de la dispersion des organismes, processus clé dans les hydrosystèmes intermittents. Deuxièmement, le metabarcoding de l'ADNe permettrait d'accéder à une diversité d'organismes plus importante que par les approches de taxonomie morphologique. Elle permettrait notamment d'identifier des espèces difficiles à échantillonner, sous forme de résistance ou à des stades juvéniles (e.g. larves) pouvant réagir différemment aux facteurs de stress environnementaux (Sturmbauer et al., 1999, Eisenring et al., 2016). De plus, une meilleure résolution taxonomique pourrait mettre en évidence des taxons à forts potentiels bioindicateurs généralement sous-évalués par l'approche morphologique, comme les Chironomidae, les Hydropsychidae et les Baetidae (Resh & Unzicker, 1975, Lencioni et al., 2012).

Néanmoins, d'importantes interrogations demeurent quant aux informations fournies par l'ADNe, et en particulier sa capacité à retranscrire l'impact d'une perturbation à une échelle locale. L'ADNe est un mélange complexe de molécules, le plus souvent collecté à partir d'échantillons d'eau qui sont ensuite filtrés. Or, l'ADNe en suspension dans l'eau peut être transporté à plusieurs kilomètres depuis sa source et se dégrader à des vitesses variables (Barnes & Turner, 2016). Ainsi, l'ADNe issu des échantillons d'eau peut aussi bien refléter les communautés à l'échelle du bassin versant (Deiner et al., 2016) qu'à un niveau local sur les communautés (Jeunen et al., 2019; Lim et al., 2016). D'autres matrices biologiques accumulent l'ADNe, mais sont encore peu utilisées dans un contexte de bioindication, comme les sédiments ou les biofilms se développant sur des pierres (Rivera et al., 2021). Ces matrices pourraient intégrer un signal plus local et être prélevées même lorsque le lit de la rivière est asséché (e.g. sédiments). Néanmoins, l'ensemble de ces matrices ne sont pas toujours disponibles ou prélevables selon les milieux aquatiques (e.g. absence de sédiments fins, milieux profonds) ou les phases hydrologiques d'une rivière (e.g. crue ou assèchement).



Le développement de capteurs d'ADNe artificiels a émergé pour collecter passivement et simplement l'ADNe dans de telles conditions et dans un large éventail de milieux aquatiques (Kirtane et al., 2020, Verdier et al., 2022). De nature très variée, les matrices intègrent certainement un signal ADN très différent. Cependant, leur potentiel et leur complémentarité pour la bioindication n'ont pas encore été évalués. Cette étude exploratoire vise à évaluer la capacité du métabarcoding de l'ADNe issu de quatre matrices naturelles et artificielles (eau, sédiments, biofilms, capteurs passifs en hydroxyapatite développés précédemment) à détecter une perturbation d'origine anthropique (i.e. pollution) dans une rivière intermittente. Pour cela, un échantillonnage de l'ADNe, en parallèle d'un inventaire conventionnel de macroinvertébrés, a été réalisé à l'amont et l'aval de trois stations d'épuration agissant comme source de pollution. Nous émettons l'hypothèse que les diverses approches - ADNe et conventionnelles - offriront une vision différente des communautés de macroinvertébrés, et que l'ADNe permettra notamment de mieux détecter une perturbation anthropique, lorsqu'elle intervient dans un contexte d'intermittence.

Les objectifs de cette étude sont de (i) comparer les inventaires des communautés de macroinvertébrés obtenus *via* les approches d'échantillonnage morphologiques et basés sur l'ADNe, (ii) d'évaluer la capacité de l'ADNe issue de diverses matrices à détecter l'effet d'une perturbation anthropique (i.e. pollution) en plus d'une perturbation hydrologique. Les résultats sont ensuite discutés dans un contexte d'amélioration de la bioindication en contexte intermittent.

### 1.3. Matériels et méthodes

#### 1.3.1. Sites d'étude

L'étude a été menée sur l'Albarine, une rivière intermittente située dans l'est de la France (Ain, 69). L'Albarine prend sa source à 950 m d'altitude et draine un bassin versant de 313 km<sup>2</sup>. Cette rivière se caractérise par une section pérenne où l'eau s'écoule en continu le long d'un plateau karstique sur environ 45 km, et, plus en aval, par une section présentant un régime d'écoulement intermittent sur environ 10 km (Fig. 1-1). Sur cette section intermittente, les assèchements se produisent de manière saisonnière et forment un gradient d'intermittence qui s'intensifie vers l'aval (c'est-à-dire des phases d'assèchement plus longues).

Chaque année, les phases d'assèchement à l'aval conduisent à un lit de rivière complètement sec en été et jusqu'en automne (Datry et al., 2012).

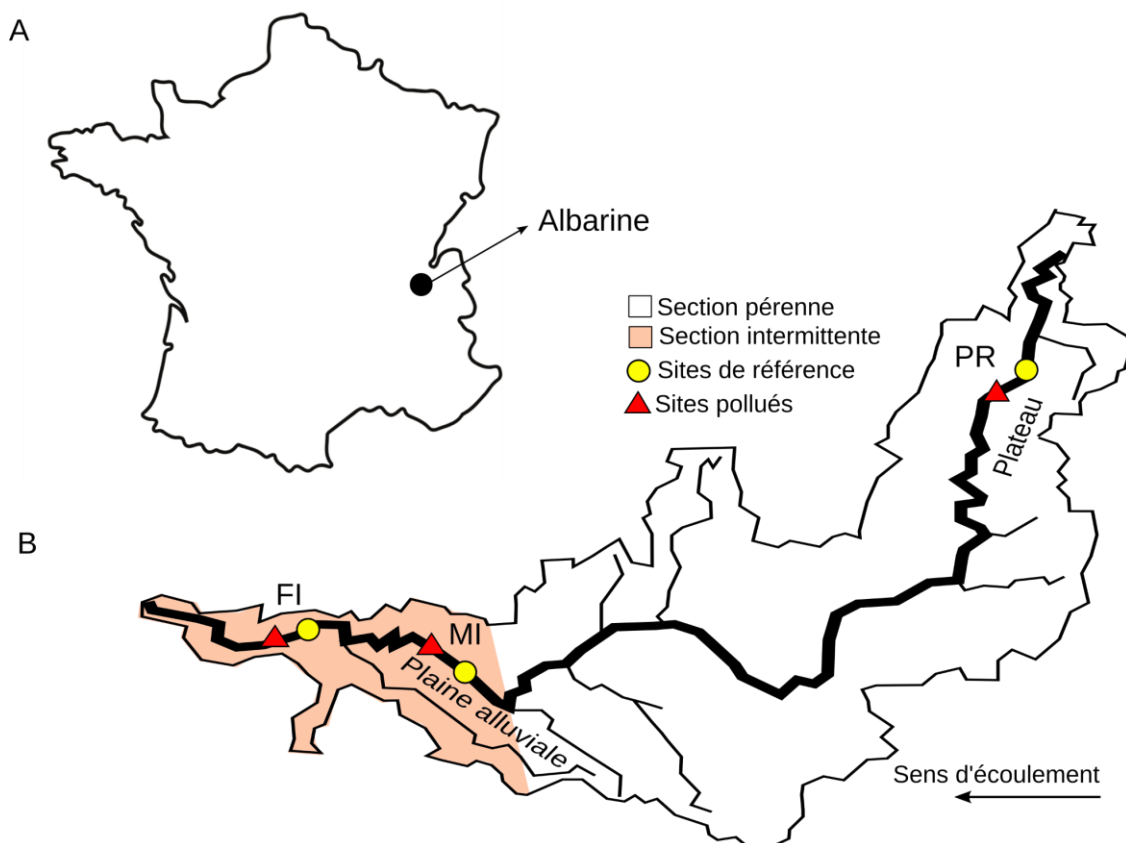


Figure 1-1 : (A) Localisation de la rivière de l'Albarine, (B) carte du bassin versant de l'Albarine montrant la section pérenne (remplissage blanc) et la section intermittente (remplissage rose) ainsi que les 6 sites d'échantillonnages (ronds = sites de référence, triangles = sites pollués) distribués le long du gradient d'intermittence (PR = Pérenne, MI = Moyennement Intermittente, FI = Fortement Intermittente).

Trois stations d'épuration ont été sélectionnées comme source de pollution, sur des zones présentant différents degrés d'intermittence afin de représenter de manière exhaustive la diversité des conditions hydrologiques de la rivière. La première station est située sur une zone pérenne (PR) qui s'écoule à un débit constant toute l'année, la deuxième est située sur une zone moyennement intermittente (MI), présentant un débit nul 60 % du temps sur une année, et la troisième située sur la zone fortement Intermittente (FI), présentant un débit nul 70 % du temps sur une année (Datry, 2012; Larned et al., 2011). Le choix s'est porté sur des stations d'épuration présentant des taux de rejets organiques compris entre 900 et 33 333 EH (Equivalent-Habitant, quantité de pollution émise par personne et par jour, Tableau 1-1).

Tableau 1-1 : Caractéristiques des stations d'épuration

Condition hydrologique	Distance à la source (km)	Capacité de stockage (EH)	Type de traitement	Niveau d'intermittence (%)
Pérenne (PR)	7,2	1200	Lit bactérien	0
Moyement Intermittente (MI)	51,6	900	Boue activée - aération prolongée	60
Fortement Intermittente (FI)	74,5	33 333	Boue activée - aération prolongée	70

Les échantillons ont été prélevés à l'amont et l'aval de chaque station d'épuration, soit un total de six points de prélèvement (Figure 1-1). Les points en amont sont considérés comme des sites de références (REF), non impactés par les effluents de stations d'épuration. Les points en aval correspondent aux sites pollués (P) par les effluents de station d'épuration. La campagne d'échantillonnage a été conduite entre mai et juin 2021, période pendant laquelle le débit était continu sur l'ensemble des sites. Cette période a été sélectionnée afin de conduire en parallèle l'échantillonnage de l'ADNe et des communautés par l'approche morphologique, cette dernière ne pouvant être réalisée que lorsque la rivière est en eau. Le dernier épisode d'assèchement s'est terminé sur les zones intermittentes plus de 60 jours avant le début de l'expérience et à notre connaissance, le site pérenne a coulé en continu pendant les 20 dernières années.

### 1.3.2. Données physico-chimiques

Une caractérisation de la composition physico-chimique de l'eau a été réalisée deux mois avant l'échantillonnage des communautés, et consistait en la mesure des nutriments (ammonium, nitrite, nitrate, orthophosphate), des matières en suspension (MES), de la demande biochimique et chimique en oxygène (DBO5 et ST-DCO) et du carbone organique dissous (COD). Au moment de l'échantillonnage des communautés biologiques, des variables environnementales complémentaires ont été mesurées comme la hauteur d'eau (cm), la largeur mouillée (cm) et la vitesse du courant (cm.s<sup>-1</sup>). L'altitude (m), la latitude et la longitude de chaque site ont été obtenues avec un GPS Garmin. La conductivité (µS.cm<sup>-1</sup>) et la température (°C) ont été mesurées avec un conductimètre. Le pH et le pourcentage d'oxygène dissous ont été mesurés avec une sonde multiparamètres en amont des points de prélèvements pour éviter un biais dans les mesures. Le pourcentage d'ombrage a été estimé visuellement sur un tronçon de 20 fois la largeur mouillée en moyenne.

### 1.3.3. Échantillonnage des macroinvertébrés

Sur chacun des 6 sites, un inventaire conventionnel des macro-invertébrés benthiques a été réalisé en suivant le protocole européen standardisé (Multi-Habitat Sampling, norme XP T 90-333 in AFNOR, 2010). Pendant les conditions de faible débit, les spécimens ont été collectés sur les différents types de mésohabitats rencontrés sur le site en 12 réplicats, avec un filet Surber (surface d'échantillonnage 0,05 m<sup>2</sup>, maille de 500 m). Les spécimens prélevés ont été placés et conservés dans des flacons hermétiques contenant de l'alcool à 96°. Les spécimens ont été triés, comptés et identifiés au niveau du genre, ou à la famille et sous-famille pour les Oligochetae, certains Diptera (e.g. Chironomidae), les Trichoptera les Limnephilidae, les Coleoptera, les Dytiscidae et les Hydrophilidae par le laboratoire EUROFINS HYDROBIOLOGIE FRANCE (AFNOR, 2010).

### 1.3.4. Échantillonnage de l'ADNe

Sur chaque site, l'ADNe a été échantillonné dans quatre matrices : (i) des capteurs passifs en hydroxyapatite (Verdier et al., 2022), (ii) une filtration d'eau, (iii) une extraction à partir de sédiments (Turner et al., 2015) et (iv) une à partir de biofilms (Rivera et al., 2021). Deux jours avant l'échantillonnage des matrices naturelles (eau, sédiments, biofilms), huit capteurs passifs ont été fixés à l'aide de fil de fer sur des piquets préalablement autoclavés, et disposés dans la rivière, de façon à les immerger entièrement dans l'eau. Le nombre de réplicats (8) a été limité par le nombre total de capteurs disponibles.

Les capteurs ont été laissés dans la rivière pendant 48 heures, durée suffisante pour capturer l'ADNe tout en évitant l'obstruction de la surface des capteurs par des substrats biologiques (e.g. feuilles, sédiments) et le développement de biofilm microbien. Après immersion, les capteurs ont été collectés et placés dans des tubes Eppendorf Lobind® et placés dans la glace sur site et pendant le transport (environ 1 heure) afin d'éviter la dégradation de l'ADN avant l'extraction. Après récupération des capteurs, les matrices naturelles (eau, sédiments et biofilms) ont été collectées en 12 réplicats par matrice et par site, comme pour l'inventaire conventionnel. Ce niveau de réplification élevé permet de quantifier la variabilité du signal ADNe et de mieux quantifier les incertitudes liées à la détection d'espèces (Ficetola et al., 2015; Hestetun et al., 2021). Pour la matrice eau, 2 litres d'eau ont été collectés sur chacun des 12 points de prélèvement à l'aide de flacons stériles en polyéthylène et avec des gants.

Immédiatement après collection, les échantillons d'eau ont été filtrés à l'aide d'une pompe à vide reliée à des entonnoirs filtrants (filtres de 0,45 µm en fibre de cellulose, MCE Membrane, Merck Millipore, Germany) disposés sur une rampe de filtration (Vacuum filtration manifold, Nalgene ®). Les filtres ont ensuite été placés dans des tubes Eppendorf Lobind ® de 5 mL. Pour la matrice biofilms, les biofilms ont été prélevés sur cinq pierres à chacun des 12 points de prélèvement, soit un total de 60 pierres par site. Ils ont été collectés en grattant la surface supérieure des pierres avec une brosse à dents propre, conformément à la norme européenne EN 13946 (AFNOR, 2014).

Les échantillons de biofilms ont été conservés dans des tubes Falcon © stériles de 50 mL, fixés dans de l'éthanol (70%) selon les protocoles européens (AFNOR 2014). Enfin, pour la matrice sédiments, 50 mL de sédiments de surface ont été collectés à l'aide de spatules stériles et transférés dans des tubes Falcon © stériles de 50 mL. L'ensemble des échantillons ont été placés dans la glace sur site et pendant le transport (environ 1 heure) afin d'éviter la dégradation de l'ADNe, puis stockés au laboratoire à -80°C pour les filtres et les sédiments, et à 4°C pour les biofilms jusqu'à extraction. Pour les capteurs, l'ADNe a été extrait le jour même.

### 1.3.5. Extraction ADN, PCR et séquençage

#### A. Extraction ADN

- **Capteurs passifs en hydroxyapatite**

Le jour de l'échantillonnage, en laboratoire, les tubes contenant les capteurs ont été centrifugés pendant 1 minute à 3000 rpm afin d'évacuer le liquide contenu dans les porosités. Les capteurs ont ensuite été rincés avec 1 mL d'eau ultrapure stérile puis l'ADNe a été désorbé selon le protocole utilisé par Verdier et al., (2022). Les échantillons d'ADNe extraits ont été stockés à -4 °C avant l'amplification et le séquençage.

- **Extraction à partir des filtres**

L'ADNe des filtres a été extrait à l'aide d'un protocole modifié du kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen <sup>TM</sup> DNA Blood and Tissue kit). En résumé, 500 µL de tampon ATL et 40 µL de protéinase K ont été ajoutés dans chaque tube de 5 mL contenant les filtres, vortexés pendant 15 secondes et incubés à 56 °C dans un bain-marie avec agitation (Memmert GmbH + Co.KG, WB 14, Schwabach, Allemagne) à 150 rpm pendant 48 heures. Après incubation, 400 µL de tampon AL et 400 µL d'éthanol 96 % ont été ajoutés dans les tubes et vortexés pendant 15 secondes. Les étapes suivantes ont été effectuées selon les recommandations du fabricant. Les échantillons d'ADN extraits ont été stockés à -4 °C avant l'amplification et le séquençage.

- **Extraction à partir des biofilms**

Les échantillons contenant les biofilms fixés dans l'éthanol ont été centrifugés à 4°C à 13 000 rpm afin de précipiter le matériel biologique (Eppendorf Centrifuge ® 5430 V2.2). Les extractions ont été réalisées à partir du culot de biofilms avec le kit Genomic DNA from soil (Macherey Nagel <sup>TM</sup> Nucleospin Soil <sup>TM</sup>). Pour cela, 700 µL de tampon SL1 ont été ajoutés au culot précédemment obtenu. Le mélange a été agité horizontalement avec un vortex pendant 5 minutes à 100 rpm puis centrifugé à 11000 g pendant 2 minutes. Après ajout de 150 µL de tampon SL3, les tubes ont été centrifugés à 11 000 g pendant 3 minutes. Les étapes suivantes ont été effectuées selon les recommandations du fournisseur. La dernière étape d'élution d'ADN a été réalisée dans 30 µL de tampon SE. Les échantillons d'ADN extraits ont été stockés à -4 °C avant l'amplification et le séquençage.

- **Extraction à partir des sédiments**

Les sédiments ont été homogénéisés avant extraction à l'aide de spatules stériles et pesés sur une balance de précision. Les extractions ont été réalisées à partir de  $800 \pm 0,12$  mg de sédiments à l'aide du kit Genomic DNA from soil (Macherey Nagel <sup>TM</sup> Nucleospin Soil <sup>TM</sup>) en suivant le même protocole que celui utilisé pour les biofilms.

### B. PCR et séquençage

Les ADNe ont été amplifiés par PCR avec un couple d'amorces développées spécifiquement pour l'ADNe des invertébrés benthiques (FwhF2/EPTDr2n, Leese et al., 2020) et plus particulièrement les EPTD (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera et Diptera). Ces amorces amplifient un fragment d'ADN du gène CO1 d'une longueur de 142 pb. Des queues Illumina ont été ajoutées aux séquences des deux couples d'amorces pour préparer une deuxième PCR, permettant le séquençage ADN. La première PCR (PCR 1) a été faite en triplicats dans un volume total par triplicat de 35  $\mu$ L contenant une concentration en tampon de 1X et 0,36  $\mu$ Mol de chaque amorce sens et antisens et 5  $\mu$ L d'ADNe. Les réactions de PCR ont été réalisées selon le protocole d'amplification suivant : dénaturation à 95°C pendant 8 minutes, suivie de 30 cycles de 95 °C pendant 30 secondes, 50 °C pendant 1 minute et 72 °C pendant 1 minute. Une extension finale de 72 °C pendant 7 minutes a été effectuée, suivie d'une diminution de la température à 4 °C pour éviter la dégradation de l'ADN. Trente échantillons PCR ont été sélectionnés aléatoirement afin de vérifier l'efficacité de l'amplification sur gel d'agarose 3 %.

Les PCR ont ensuite été envoyées à la plateforme GenoToul (INRAE, Toulouse) où les produits de la PCR 1 ont été purifiés puis amplifiés dans une deuxième PCR permettant un double-indexage de chaque échantillon et leur préparation pour le séquençage avec l'ajout d'oligonucléotides (P5 ou P7) spécifiques à la technologie utilisée le séquençage, ici Illumina. Les bibliothèques ainsi obtenues ont été séquencées en utilisant le kit de séquençage 2\*250 paired-end V3 MiSeq par GenoToul.

### C. Prévention des contaminations et contrôles négatifs

Pour limiter au maximum les contaminations sur le terrain, des ustensiles à usage unique étaient réservés pour chaque matrice ADNe (e.g. spatules, entonnoirs de filtration). Avant l'échantillonnage et entre chaque site de prélèvements, tout le matériel y compris les waders était décontaminé avec de la javel 5 % ( $\pm$  2 %). Pour limiter la cross-contamination entre échantillons, l'ordre de prélèvements des matrices naturelles et artificielle s'est fait de la concentration supposée d'ADNe la plus faible à la plus forte : capteurs, eau, biofilms, sédiments.

En laboratoire, les échantillons ont été extraits sous des hottes réservées aux échantillons ADN faiblement concentrés, préalablement décontaminées à la javel 5 % ( $\pm 2$  %) et traitées 15 min aux UVs. Des contrôles négatifs de contamination ont été réalisés à chaque étape : 1) des contrôles de terrain correspondant à la filtration d'eau stérile, ii) des contrôles d'extraction correspondant à de l'eau stérile extraite avec les mêmes kits d'extraction que les échantillons contenant de l'ADN et iii) des contrôles de PCR correspondant à des échantillons d'eau amplifiés en parallèle des échantillons d'ADNe.

### D. Traitement bio-informatique

Le package DADA2 (version 1.20.0, Callahan et al., 2017) a été utilisé pour assigner chaque séquence ADN à un ASV ("Amplicon Sequences Variants"), à partir des reads MiSeq demultiplexées (forward et reverse). Les séquences de primers ont été retirées des reads en utilisant le logiciel cutadapt v 1.9.1 (Martin, 2011). Après avoir retiré les séquences de primers, les séquences ont été filtrées (longueur minimale de 120 nucléotides et aucun N autorisé) et dérépliquées. Les séquences forward et reverse ont ensuite été fusionnées avec la fonction 'mergePairs' du package DADA2 avec un minimum de recouvrement entre les deux séquences de 20 bp et un nombre maximum de mismatches de 5 bases. Les séquences chimères ont ensuite été de novo détectées et retirées avec "removeBimeraDenovo" (méthode consensus). Enfin, les ASVs avec une abondance inférieure à 0.0001 % dans tous les échantillons ont été retirés, car ces ASVs peuvent être le produit d'erreurs de PCR ou de séquençage. L'étape d'assignement taxonomique des ASVs a été réalisée en utilisant l'algorithme RDP Classifier (Wang et al., 2007) avec un seuil de bootstrap de 75 %. La base de données utilisée correspondait à un jeu d'entraînement disponible sur CO1 Classifier (v 4.0.1, Porter & Hajibabaei, 2018) mis à jour en avril 2019 et constitué de données de COI issues des bases de référence GenBank et BOLD Systems. Seules les séquences d'ADN appartenant aux macroinvertébrés ont été conservées dans notre jeu de données pour les analyses. Des courbes de raréfaction (Annexe 3-1) sur la diversité alpha ont été effectuées et ont indiqué qu'un minimum de 10 000 lectures était suffisant pour capturer la majeure partie de la diversité au sein des échantillons. Au total, 59 échantillons n'avaient pas la profondeur minimale requise et n'ont pas été conservés pour les analyses. Ces échantillons appartiennent aux contrôles négatifs (24 échantillons), où sont associés aux capteurs passifs (28 échantillons) et aux sédiments (7 échantillons).



### 1.3.6. Analyse de données

Des diagrammes de Venn ont été réalisés avec le package 'venn diagramm' afin de comparer le nombre de familles uniques et partagées entre les différentes matrices et approches. Pour tester les effets des perturbations (pollution et intermittence) sur la richesse taxonomique, des ANOVAs à deux facteurs ont été conduites. Pour tester l'effet de ces mêmes facteurs sur la structure des communautés, des ordinations multidimensionnelles non métriques (NMDS) avec le basées sur les distances de Bray Curtis ont été réalisées avec la fonction 'metaMDS' du package vegan. Pour tester la différence de structure des communautés entre sites de référence et pollués mises en évidence avec les NMDS, une analyse de la variance par permutation (PERMANOVA) a été réalisée pour chaque méthode d'échantillonnage et zone de la rivière (PR, MI et FI). Cette analyse a utilisé les fonctions 'adonis2' du package vegan, et 'pairwise.adonis' du package pairwiseAdonis. A partir des matrices de distances Bray Curtis, une analyse de pourcentage de similarité (SIMPER ; Clarke & Ainsworth, 1993) a été conduite pour calculer la contribution (%) de chaque taxon à la dissimilarité entre les sites de référence et sites pollués de chaque zone de la rivière. Finalement, l'analyse 'Indval' avec la fonction 'multipatt' a été conduite pour identifier des taxons potentiellement bioindicateurs de pollution en rivière intermittente. En utilisant le package 'Indicspecies' (Caceres, Jansen, & Caceres, 2011), cette analyse génère un indice de valeur de l'indicateur pour chaque taxon et catégorie de sites (référence ou pollué). Elle permet de mesurer le degré de spécificité d'un taxon pour une condition environnementale, en combinant à la fois sa fréquence et son abondance. Les graphiques ont été réalisés avec le package 'ggplot2'.

## 1.4. Résultats

### 1.4.1. Physico-chimie

Sur les trois zones de la rivière - pérenne, moyennement intermittente et fortement intermittente – les paramètres physico-chimiques mesurés varient peu entre les sites placés en amont (référence) et en aval (pollué) des stations d'épuration, montrant *a priori* une faible contamination de l'eau par les stations d'épuration sélectionnées.

Tableau 1-2: Résultats des analyses physico-chimiques réalisées sur les 6 sites de prélèvements de la rivière (PR = Pérenne, MI = Moyennement Intermittente, FI = Fortement Intermittente, REF = site de référence, P = site impacté par les effluents de station d'épuration.

Paramètres	Unité	PR-REF	PR-P	MI-REF	MI-PE	FI-REF	FI-P
Demande Biochimique en							
Oxygène (DBO5)	mg O2/l	1,2	1,6	1,7	1,4	1,3	1,3
ST-DCO	mg O2/l	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Matières en suspension							
(MES)	mg/l	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Carbone Organique							
Dissous (COD)	mg C/l	2,4	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1
Ammonium (NH4)	mg NH4/l	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Azote Kjeldahl	mg N/l	<0.5	0,6	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Nitrates	mg NO3/l	1,3	2,4	2,6	2,6	2,7	2,8
Nitrites	mg NO2/l	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Orthophosphates (PO4)	mg PO4/l	0,071	0,043	0,045	0,049	<0.02	0,074
pH		7,2	9	7,7	8	8,7	9
Conductivité	µS/cm	381,6	417,7	371,7	374,3	360,3	363,8

### 1.4.2. Résultats de l'inventaire morphologique et du séquençage de l'ADNe

#### (a) Approche morphologique

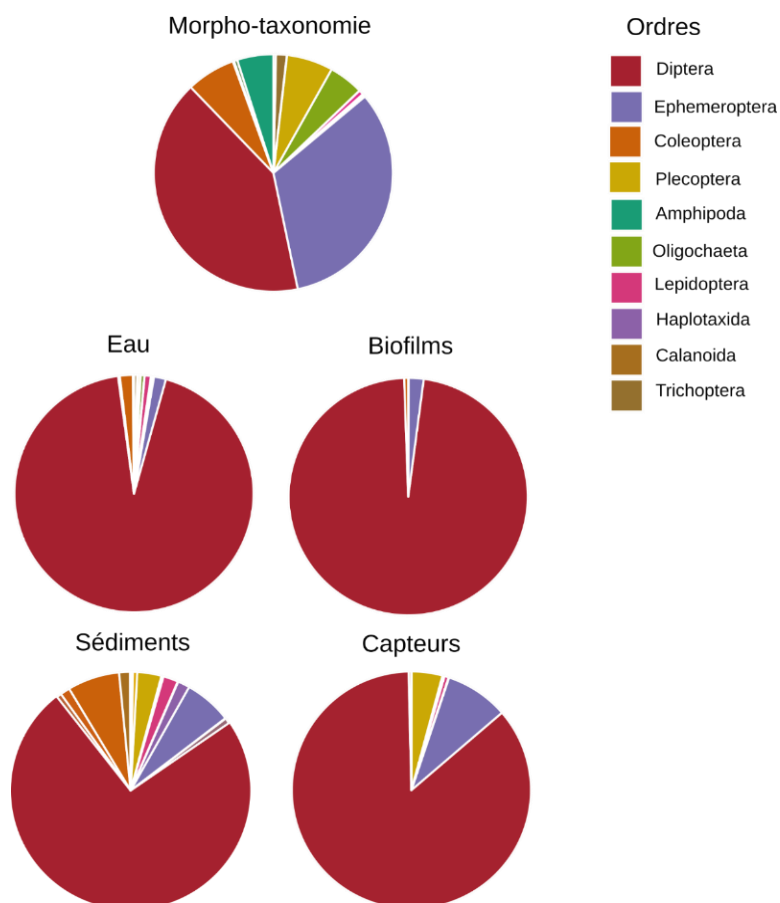
En morphologie, un total de 65 taxons ont été identifiés et assignés à différentes résolutions taxonomiques, allant de l'espèce à la famille. Les 4 phylums identifiés appartiennent aux Arthropoda (88 %), des Annelida (4,4 %), des Plathelminthes (4,6 %) et des Mollusca (3 %).

#### (b) ADN environnemental

Le séquençage de l'ADNe a produit en moyenne de  $142\,045 \pm 84\,871$  lectures pour l'ensemble des échantillons (moyenne  $\pm$  écart-type). Après les étapes de tri,  $126\,877 \pm 75\,459$  séquences ont été obtenues réparties comme suit selon les matrices d'échantillonnage :  $193\,688 \pm 69\,652$  dans l'eau,  $121\,384 \pm 31\,981$  dans les biofilms,  $111\,660 \pm 48\,983$  dans les sédiments et  $54\,719 \pm 69\,652$  avec les capteurs passifs.

Sur l'ensemble des lectures, toutes matrices d'échantillonnage confondues, 99,2 % des séquences correspondaient aux Arthropoda, 0,6 % aux Annelida et 0,2 % correspondaient entre autres aux Cnidaria, Rotifera et Bacteria. Seuls les Arthropoda, les Annelida et les Cnidaria ont été conservés pour la suite des analyses.

Figure 1-2 : Diagrammes circulaires comparant l'abondance relative (en %) des communautés d'invertébrés benthiques (au niveau de l'ordre) entre l'approche morphologique et l'échantillonnage de l'ADNe à travers différentes matrices.



### 1.4.3. Comparaison des inventaires morphologiques et issus du métabarcoding de l'ADNe

Les quatre principaux phylums (Arthropoda, Annelida, Mollusca et Plathelminthes) ont été détectés par l'ensemble des méthodes d'échantillonnage. Quelle que soit la matrice d'échantillonnage d'ADNe, les communautés étaient dominées par l'ordre des Diptera (entre 75 et 97 %). Le deuxième ordre le plus dominant était les Ephemeroptera (1,6 à 8 %) dans l'eau et les biofilms, les Coleoptera dans les sédiments et les Plecoptera dans les capteurs passifs (Figure 1-2). Parmi les 267 familles détectées au total, seules 14 étaient communes à l'ensemble des approches d'échantillonnages (Figure 1-3) dont les Chironomidae, très majoritaires, et les Simuliidae (Figure 1-4). Douze familles ont été uniquement détectées par la morphologie, dont 5 familles de Trichoptera (Hydropsychidae, Polycentropodidae, Psychomyiidae, Sericostomatidae, Glossosomatidae), deux familles de Plecoptera (Chloroperlidae et Perlodidae) et l'isopode *Asellus aquaticus*. Les échantillons d'eau ont détecté 179 familles, dont 82 étaient uniques à cette matrice, dont les plus abondantes sont les Milichiidae (Diptera) et les Halictidae (Hymenoptera). Dans les sédiments, 128 familles sont détectées dont 36 uniques, dont les plus abondantes appartiennent à l'ordre des Araneae (en particulier les familles des Ochyroceratidae et des Theridiidae).

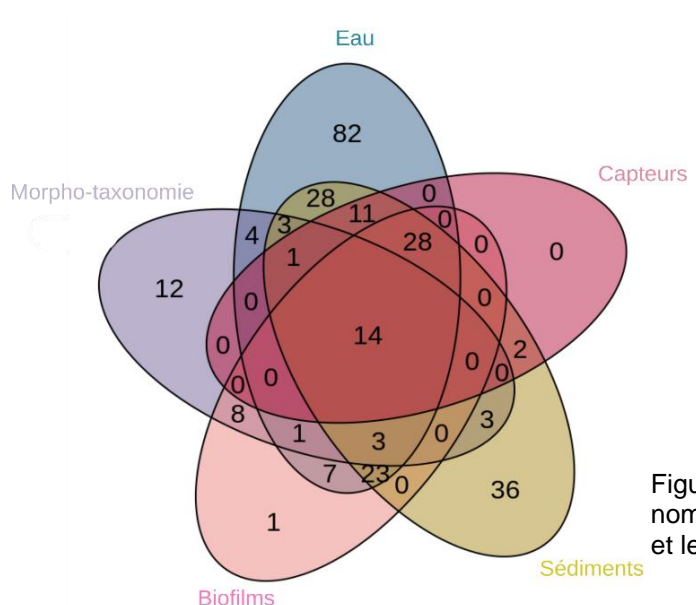


Figure 1-3: Diagramme de Venn représentant le nombre de familles détectées par la morphologie et les quatre matrices ADNe.

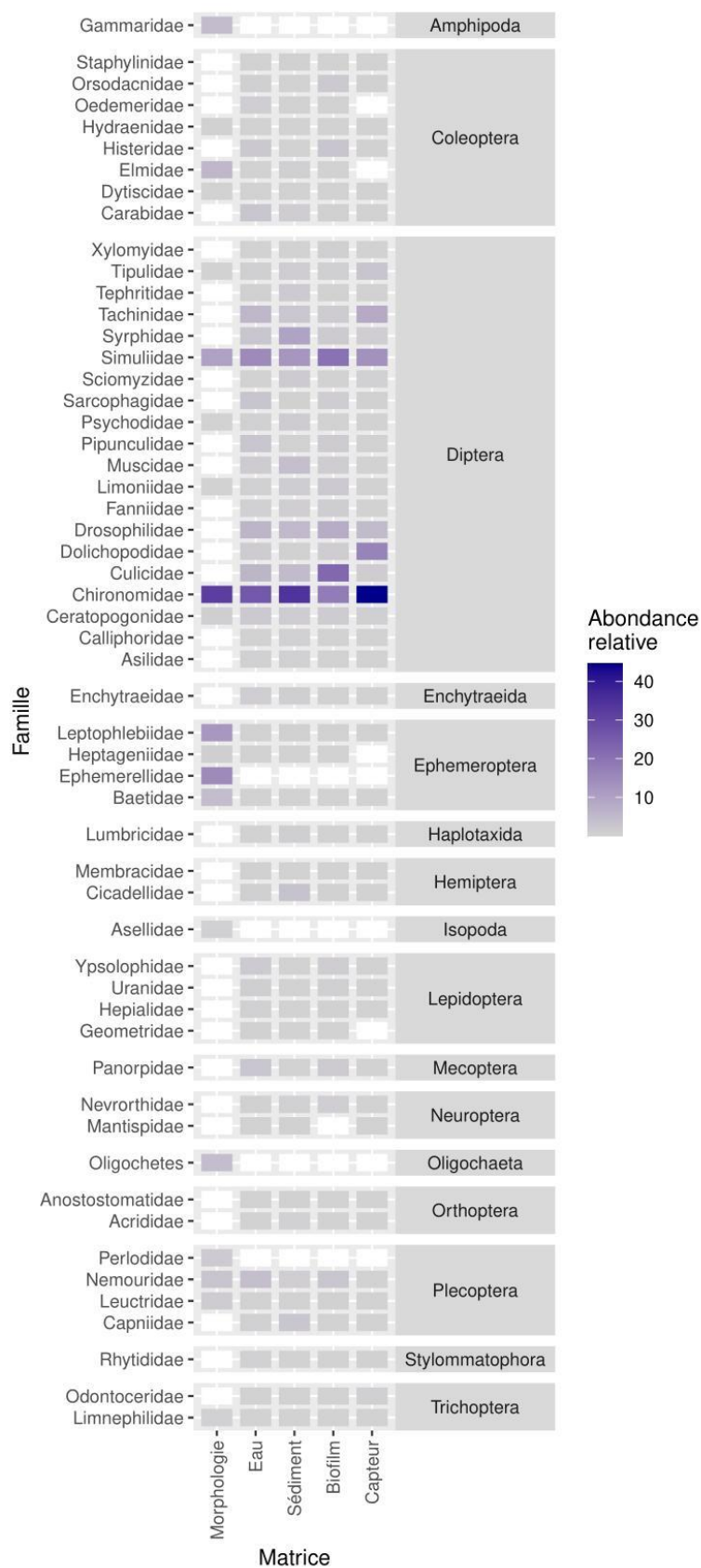


Figure 1-4: Heatmap comparant les familles détectées par l'approche morphologique et par l'ADNe issus des différentes matrices (eau, sédiments, biofilms, capteurs) au rang de la famille. Les cases blanches sont synonymes d'une abondance égale à zéro. Pour alléger la représentation, seules les familles avec une abondance relative supérieures à 0.001% sont représentées. Les familles présentant une abondance relative inférieure à 0.0001% sont disponibles en annexes.

#### 1.4.4. Détection des perturbations : intermittence et pollution

En morphologie, la permanence d'écoulement a un effet significatif sur la richesse taxonomique alors que la pollution n'a pas d'effet (Tableau 1-3). Avec l'ADNe, les effets de la permanence d'écoulement et de la pollution dépendent de la matrice d'échantillonnage. Pour la matrice eau, la richesse taxonomique est significativement impactée par la permanence d'écoulement et la pollution (Tableau 1-3), et l'effet de la pollution est significatif quel que soit le niveau d'intermittence (Figure 1-5). Pour la matrice biofilms, l'effet de la pollution dépend de la permanence d'écoulement (interaction significative ; Tableau 1-3): l'effet de la pollution est uniquement visible dans la zone moyennement intermittente (Figure 1-5). Avec les capteurs passifs, seule la permanence d'écoulement a un effet significatif (Tableau 1-3). Enfin, aucun des deux facteurs n'a d'effet significatif sur la richesse issue des sédiments (Tableau 1-3). Il est important de noter que la permanence d'écoulement a un effet négatif sur la richesse taxonomique avec l'approche morphologique (57,5 % de diminution entre la zone pérenne et la zone fortement intermittente ; Figure 1-5) alors qu'elle a eu un effet positif avec l'ADNe (60 % d'augmentation dans l'eau, 14 % dans les biofilms et de 80 % avec les capteurs entre la zone pérenne et la zone fortement intermittente). Elle n'a cependant pas d'effet significatif dans les échantillons de sédiments.

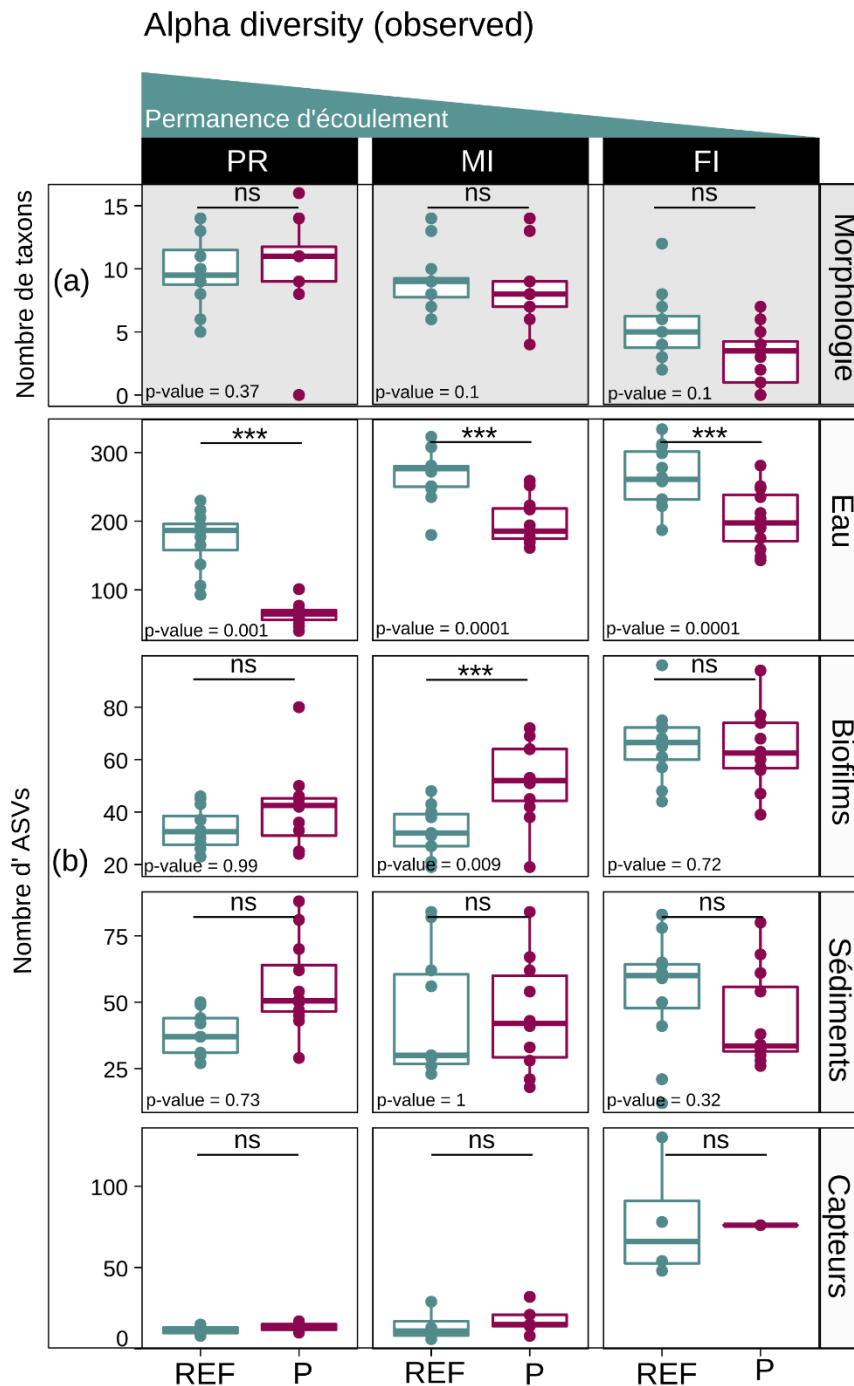


Figure 1-5 : (a) Nombre de taxons observés et (b) nombre d'ASVs dans les sites de référence (REF) et pollués (P) par les effluents de station d'épuration, selon trois niveaux d'écoulement de la rivière (PR= Pérenne, MI = Moyennement Intermittente, FI = Fortement Intermittente) et par méthode d'échantillonnage. Les p-values sont celles associées aux tests post-hoc comparant la richesse taxonomique entre les sites de référence et les sites pollués. \* indique  $p\text{-value} < 0,001$  ; \*\* indique  $0,001 \leq p\text{-value} < 0,1$  ; \* indique  $0,1 \leq p\text{-value} < 0,5$  ; ns indique  $p\text{-value} \geq 0,5$ ).

Tableau 1-3 : Effet de la pollution et de la permanence d'écoulement sur les métriques de diversité- $\alpha$  (ANOVA à deux facteurs) par méthode d'échantillonnage. Les p-values significatives sont indiquées en gras.

	Méthode	Paramètre	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Conventionnel	Morphologie	Pollution	1	10.9	10.89	1.294	0.259
		Permanence d'écoulement	2	451.2	225.6	26.812	<b>3e-09 ***</b>
		Pollution x Permanence d'écoulement	2	25.9	12.93	1.537	0.223
ADN environnemental	Eau	Pollution	1	116645	116645	85.077	<b>1.75e-13 ***</b>
		Permanence d'écoulement	2	208886	104443	76.177	<b>&lt; 2e-16 ***</b>
		Pollution x Permanence d'écoulement	2	7580	3790	2.764	0.0703
	Biofilms	Pollution	1	1217	1217	7.383	<b>0.0084 **</b>
		Permanence d'écoulement	2	10399	5199	31.543	<b>2.43e-10 ***</b>
		Pollution x Permanence d'écoulement	2	1216	608	3.688	<b>0.0303 *</b>
	Sédiments	Pollution	1	47	46.6	0.129	0.721
		Permanence d'écoulement	2	160	79.8	0.22	0.803
		Pollution x Permanence d'écoulement	2	2188	1093.8	3.021	0.056.
Capteurs	Pollution	1	983	983	2.422	0.146	
	Permanence d'écoulement	2	12980	6490	15.983	0.0004 ***	
	Pollution x Permanence d'écoulement	2	16	8	0.02	0.98	



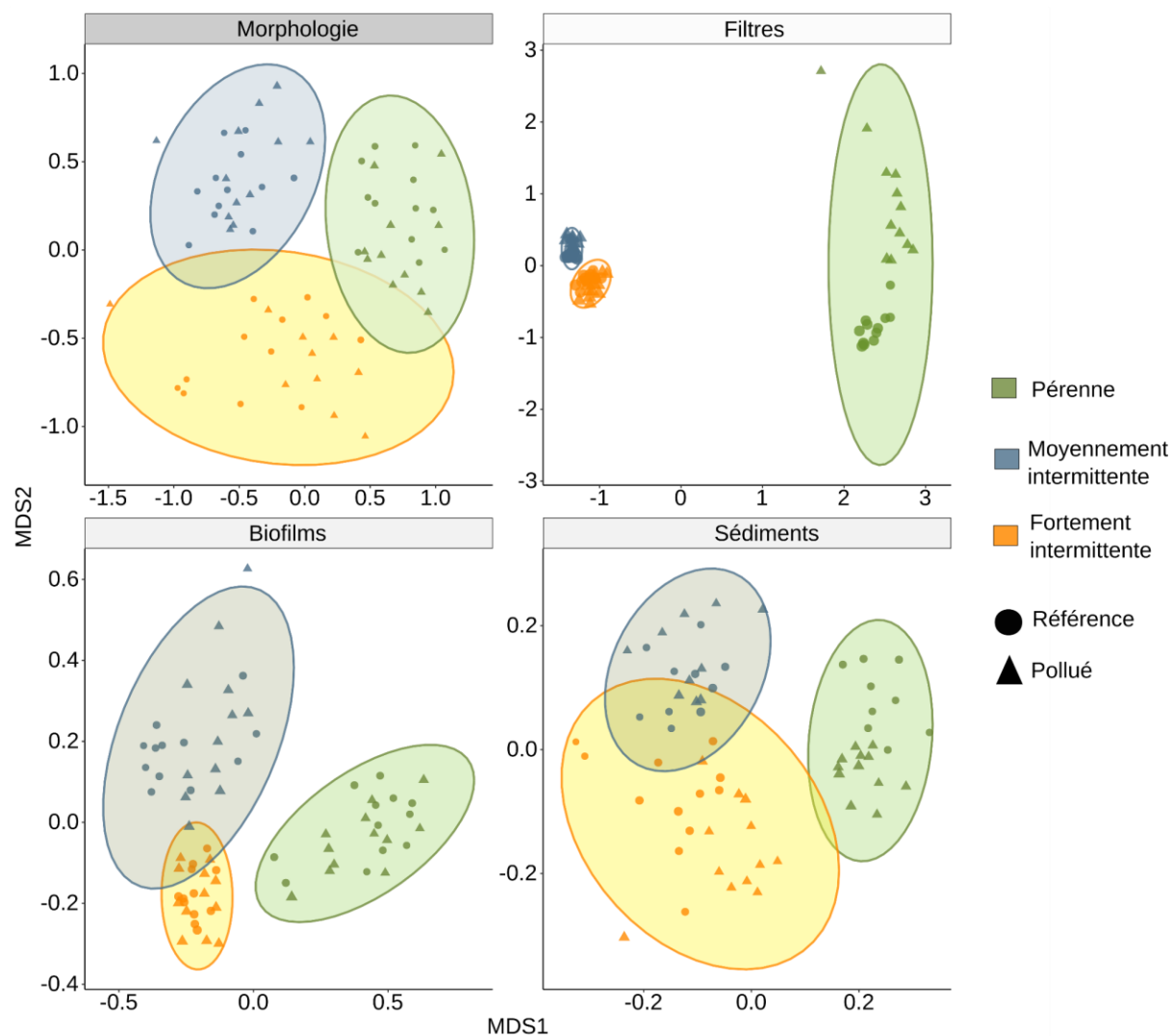


Figure 1-6 : Analyse NMDS, basée sur une matrice de distance de Bray-Curtis, des communautés d'invertébrés sur les sites de référence (cercles) et pollués (triangles) selon trois niveaux d'écoulement de la rivière (PR = Pérenne, MI = Moyennement Intermittent, FI = Fortement Intermittent), pour l'approche morphologie et les méthodes basées sur l'ADNe (filtres, biofilms, sédiments). Les ellipses indiquent le niveau de confiance à 95 % basé sur le centroïde calculé pour chaque zone (PR, MI et FI).

L'ordination par NMDS montre que l'ensemble des approches d'échantillonnage discriminent les communautés des 3 zones présentant différents degrés d'intermittence. Plus particulièrement, la zone pérenne est bien différenciée par rapport aux deux autres zones (Figure 1-6). Concernant la pollution, seul l'ADNe issu des matrices eau et biofilms ont permis de différencier les sites de référence des sites pollués, dans la zone pérenne et moyennement intermittente pour les échantillons d'eau, et seulement dans la zone moyennement intermittente pour les biofilms (Tableau 1-4). Aucune approche ne permet de différencier significativement un effet pollution en condition fortement intermittente, même si la matrice ADNe eau montre un effet faible (permanova,  $R^2 = 0.08$ ,  $p = 0.15$ ). Les capteurs passifs à ADNe ne sont pas représentés, car le nombre d'échantillons sauvegardés pour les analyses est trop insuffisant (section 1.3.5) pour l'ordination NMDS.

La suite des analyses se concentre sur l'ADNe issu de la matrice eau, ayant montré la meilleure capacité à distinguer l'effet de la pollution sur les communautés. Lorsqu'on s'intéresse en détail à cette matrice, les taxons ayant la plus forte contribution à la différenciation des sites de référence et pollués appartiennent majoritairement à la famille aux Chironomidae (Diptera), et ce, quel que soit le degré d'intermittence (analyse SIMPER, contribution supérieure à 20 %). Le tableau 3-1 en annexes II montre les 10 taxons contribuant le plus aux différences entre sites de référence et pollués. L'analyse Indval (McGeoch et al., 1998), réalisée à partir de la matrice eau, a permis de mettre en évidence des taxons potentiellement bioindicateurs de pollution dans les zones plus ou moins intermittentes. La majorité des taxons bioindicateurs appartiennent à l'ordre des Diptera (de 76 à 100 % selon les zones). Dans la zone pérenne, 11 taxons ont été identifiés et appartiennent aux familles des Chironomidae (45 %), des Tipulidae (18 %) et des Anthomyiidae (18 %). Dans la zone moyennement intermittente, 25 taxons ont été associés à la pollution et appartiennent majoritairement aux familles des Chironomidae (60 %), des Tipulidae (13 %) et des Simuliidae (13 %). Dans la zone fortement intermittente 15 taxons bioindicateurs ont été associés à la pollution et appartiennent aux familles des Chironomidae (47 %), des Sarcophagidae (13 %) et des Syrphidae (13,3 %).

Tableau 1-4 : Analyse PERMANOVA testant la différence de structure des communautés mises en évidence avec les NMDS, entre les sites de référence et les sites pollués, par niveau d'écoulement et par méthode d'échantillonnage. Les p-values significatives sont en gras.

	Méthode	Permanence d'écoulement	Sites	Df	R <sup>2</sup>	F	Pr(>F)	p.adjusted
Conventionnel	Morphologie	Pérenne	REF-P	1	0.11	2.62	0.01	0.19
		Moyennement intermittent	REF-P	1	0.08	1.95	0.06	0.85
		Fortement intermittent	REF-P	1	0.15	3.59	0.007	0.1
ADN environnemental	Eau	Pérenne	REF-P	1	0.11	2.85	0.001	<b>0.015</b>
		Moyennement intermittent	REF-P	1	0.12	2.71	0.002	<b>0.03</b>
		Fortement intermittent	REF-P	1	0.08	1.86	0.01	0.15
	Biofilms	Pérenne	REF-P	1	0.04	1.04	0.345	1
		Moyennement intermittent	REF-P	1	0.15	3.84	0.005	<b>0.075</b>
		Fortement intermittent	REF-P	1	0.04	0.91	0.579	1
	Sédiments	Pérenne	REF-P	1	0.09	1.9	0.02	0.34
		Moyennement intermittent	REF-P	1	0.05	1.05	0.36	1
		Fortement intermittent	REF-P	1	0.07	1.6	0.02	0.33
	Capteurs	Pérenne	REF-P	1	0.54	2.35	0.33	1
		Moyennement intermittent	REF-P	1	0.11	0.83	0.53	1
		Fortement intermittent	REF-P	1	0.23	0.92	0.8	1

## 1.5. Discussion

L'approche morphologique utilisée pour déceler les impacts anthropiques sur écosystèmes d'eau douce est sous optimale en rivière intermittente pour de multiples raisons : (i) l'omission de taxons fréquents dans les RIs potentiellement bioindicateurs, (ii) la résolution taxonomique souvent trop grossière pour mettre en évidence les réponses des taxons face aux perturbations et (iii) des suivis réalisés à une échelle spatiale et temporelle trop restreinte et pas assez souple et dynamique pour prendre en compte la variabilité des conditions hydrologiques et des communautés dans les RIs, en particulier les mécanismes de dispersion. L'utilisation de l'ADNe à travers de multiples matrices naturelles et artificielles pourrait surmonter ces challenges en couplant une meilleure résolution taxonomique, des capacités d'intégration spatio-temporelle plus large et un accès à une diversité d'organismes importante, potentiellement bioindicatrice de perturbations. Cependant leur capacité à retranscrire un impact anthropique dans un contexte d'intermittence n'a pas encore été évaluée. Par le biais d'une étude *in situ*, les objectifs de cette étude étaient de (i) comparer les approches de bioindication conventionnelles et celles basées sur l'ADNe, et (ii) d'évaluer la capacité des matrices naturelles et artificielles à détecter un impact anthropique en condition d'intermittence, et identifier de potentiels bioindicateurs de pollution.

### 1.5.1. Différentes visions de la biodiversité

La comparaison des inventaires de macro-invertébrés entre l'approche morphologique et l'ADNe montre à la fois des congruences et des différences marquées. Les taxons appartenant à l'ordre des Diptera dominant les inventaires, quelle que soit l'approche utilisée (morphologique ou ADNe). Cet ordre couvre une large diversité de taxons, connus pour être dominants dans les écosystèmes d'eau douce en termes d'abondance et de diversité (Armitage & Blackburn, 1990; Pinder, 1986). Aux niveaux taxonomiques inférieurs (i.e. famille et niveaux inférieurs), nous observons d'importantes différences entre les inventaires puisque très peu de familles sont communes à l'ensemble des approches (14 seulement sur 267 au total), avec jusqu'à 5 fois plus de familles détectées par l'ADNe couvrant à la fois des taxons aquatiques et des taxons d'habitats ripariens et/ou terrestres (e.g. Culicidae; Diptera, Cicadidae; Hemiptera). À l'inverse, certaines familles d'EPTD préférentiellement ciblées par les amorces employées n'ont été détectées que par la morphologie.

Cette faible congruence entre les inventaires de macroinvertébrés obtenus par la morphologie et le metabarcoding de l'ADNe est souvent rapportée dans la littérature (Keck et al., 2022). Ces divergences peuvent être dues à de multiples raisons; techniques, biologiques ou liées à la résolution spatiale fournie par l'ADNe.

Le couple d'amorces utilisé peut expliquer en partie les divergences entre morphologie et metabarcoding de l'ADNe. Concevoir des amorces amplifiant uniquement l'ADN des macroinvertébrés est difficile, car ces derniers constituent un groupe paraphylétique vaste et très diversifié (protostomiens dont les EPT ne représentent qu'un faible pourcentage). Pour cibler les macroinvertébrés traditionnellement étudiés, le metabarcoding repose sur l'utilisation d'amorces hautement dégénérées (Brantschen et al., 2021). Ces amorces amplifient souvent un large éventail de fragments d'ADN non ciblés (e.g. algues, bactéries) en plus des macro-invertébrés. Plusieurs couples d'amorces ont été développés ces dernières années pour tenter d'augmenter la spécificité des amorces au groupe ciblé, et le choix de l'un ou l'autre dépend de l'objectif visé. Il est clair qu'il n'existe pas de solution unique et que nous nous acheminons plutôt sur des sets d'amorces ciblant des groupes de macro-invertébrés différents (Clark et al., 2017; Elbrecht et al., 2019; Grey et al., 2018 ; Hajibabaei et al., 2019; Taberlet et al., 2018). Notre étude utilise un couple d'amorces ciblant le gène COI (Cytochrome Oxydase I), conçues pour amplifier spécifiquement les taxons EPTD (EPTDr2n/fwhF2), souvent essentiels pour le calcul des indices biotiques.

Ces amorces ont été choisies, car elles permettent de réduire considérablement le nombre de taxons non-cibles (99 % des séquences ont été assignées aux Arthropoda) par rapport à d'autres amorces où les séquences correspondant aux Arthropoda représentent souvent moins de 40 % des séquences totales (e.g. les amorces BF2/BR2 and fwhF2/fwhR2n, Leese et al., 2021; Rivera et al., 2021). Néanmoins, ces amorces excluent certains taxons (testées *in silico*, Leese et al., 2021), notamment des crustacés (entre autres l'isopode *Asellus aquaticus*) et certains genres de Trichoptera (*Rhyacophila* et *Hydropsyche*), effectivement absents de nos inventaires basés sur l'ADNe. Ainsi, pour les macroinvertébrés, l'utilisation de plusieurs amorces est souvent préconisée pour assurer la détection des taxons particulièrement ciblés par la bioindication (Corse et al., 2019; Hajibabaei et al., 2019). Néanmoins, la non-détection de ces taxons par metabarcoding de l'ADNe ne doit pas masquer la multitude d'autres taxons détectés par cette approche, qui peut apporter une réelle valeur ajoutée à la bioindication conventionnelle (Sweeney et al., 2011).

Le processus d'assignation taxonomique peut aussi être source de biais et/ou de divergences. Premièrement, les bases de données pour les macro-invertébrés sont moins complètes que pour d'autres groupes taxonomiques tels que les téléostéens, un groupe beaucoup plus restreint, et peuvent conduire à des erreurs d'assignation, en particulier sur des séquences courtes comme celles utilisées dans cette étude. Deuxièmement, une multitude d'outils d'assignement existent pour assigner une séquence à un taxon. Ces outils reposent sur des méthodologies très différentes (similitude, composition en mots, placement phylogénétique, RDP), et pour lesquels une variété de paramètres sont à définir (e.g. seuil de similarité, probabilité postérieure, ...). L'utilisation de l'un ou l'autre de ces outils peut être source de grandes variations impactant la fiabilité de l'assignement (Bik, 2021; Hleap et al., 2021). Dans ce contexte, une étude de sensibilité et de spécificité est probablement nécessaire en amont d'une analyse de ce type. Troisièmement, les séquences sont souvent assignées au rang de l'espèce, ce qui peut surestimer la diversité obtenue avec l'ADNe. Par exemple, 57 genres de Chironomidae (Diptera) ont été détectés avec l'ADNe alors qu'ils n'ont pas pu l'être avec l'approche morphologique, l'identification s'arrêtant à la famille pour ces taxons.

Des raisons biologiques peuvent aussi expliquer les différences entre les inventaires morphologiques et ceux basés sur l'ADNe. La biologie des organismes, et en particulier le taux de production d'ADNe, influence fortement leur détectabilité. Tout d'abord, les organismes ont des taux de production d'ADNe variables (Andruszkiewicz Allan et al., 2021; Carraro et al., 2020; [Chapitre II Article 1](#)), ce qui suggère que la quantité d'ADNe dans l'eau n'est pas nécessairement proportionnelle à l'abondance des individus. Certains taxons sont susceptibles de relarguer de plus grandes quantités d'ADN comme ceux produisant du mucus (e.g. mollusques). À l'inverse, les organismes présentant un exosquelette comme les crustacés, ou certains organismes comme les trichoptères construisant une protection à partir de matériaux abiotiques peuvent relarguer moins d'ADNe dans leur environnement et être moins détectables. Tous ces facteurs biologiques ont un impact sur la production d'ADNe et sa concentration dans les substrats et peuvent sensiblement impacter la détection des organismes.

Une différente résolution spatiale entre l'ADNe et la morphologie peut aussi fortement influencer les inventaires de biodiversité fournis par ces deux approches. Avec l'ADNe, un grand nombre de familles ont été détectées uniquement dans les sédiments et l'eau (entre 36 et 82 familles). Parmi elles, des taxons terrestres tels que des Lepidoptera, Drosophilidae (Diptera), Cicadidae (Cigales; Hemiptera), et des Cerambycidae (Coleoptera). Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle un échantillon d'eau, et dans une moindre mesure de sédiment, peut intégrer en partie l'ADNe d'écosystèmes adjacents ou situés plus en amont, du fait du transport de l'ADNe en particulier en milieux lotiques (Deiner et al., 2016; Pont et al., 2018).

Ces résultats sont confirmés par la richesse taxonomique qui augmente en aval de la rivière, suggérant une accumulation d'ADNe en aval, alors que la richesse obtenue par l'inventaire morphologique, elle, diminue.

### 1.5.2. Détection d'une pollution dans un contexte d'intermittence

L'intermittence montre un effet antagoniste sur la richesse des communautés entre l'approche morphologique et le metabarcoding de l'ADNe. Par l'approche morphologique, la richesse des zones intermittentes est beaucoup plus faible que celle de la zone pérenne (57,5 % plus faible). Ce résultat corrobore le constat de plusieurs auteurs, qui suggèrent une forte diminution de la richesse taxonomique et de la diversité avec le degré d'intermittence (Datry et al., 2017), bien qu'il arrive que l'intermittence n'ait pas d'effet sur la richesse dans certaines rivières où les habitats sont relativement stables (Skoulikidis et al., 2011; Kalogianni et al., 2017). Cette diminution de la richesse est en partie liée à une abondance et une diversité beaucoup plus faible des taxons EPT dans les tronçons subissant des assèchements, même si ces derniers ont eu lieu plusieurs mois auparavant. Ceci est dû à "l'effet mémoire" de l'intermittence sur ces mêmes sites, qui implique que même lorsque l'écoulement reprend après une période d'assecs, les communautés sont encore impactées par l'effet de l'assèchement à long terme (Datry et al., 2011; Datry et al., 2012). Dans les zones intermittentes, les communautés sont plutôt dominées par les Diptera (surtout les Chironomidae) et les Oligochaeta. Avec l'ADNe en revanche, nous observons le schéma inverse.

Avec l'ADNe issu de l'eau, des biofilms et des capteurs, la richesse augmente avec le gradient d'intermittence. Ce résultat révèle potentiellement une sensibilité différente des matrices ADNe à l'intermittence, ou, plus probablement, une accumulation d'ADNe en aval de la rivière correspondant au site le plus intermittent. Les résultats ont montré que la matrice eau intègre des ADNe provenant d'écosystèmes pas seulement aquatiques, mais aussi terrestres ou ripariens, suggérant un transport de l'ADNe en aval. Ainsi, la matrice eau en aval de la rivière agirait comme un « collecteur » de l'ADNe expliquant l'augmentation de la richesse. Avec l'ADNe issu de sédiments, la richesse taxonomique n'a pas été impactée par l'intermittence et est restée relativement stable entre la zone pérenne et les zones intermittentes. Dans les sédiments, la richesse peut être augmentée localement par l'ADN résiduel stocké dans les sédiments (Pansu, 2014), sur des durées souvent plus longues que les autres matrices naturelles modifiant ainsi complètement la relation avec les processus tel que les assèchements ou les transferts de l'amont vers l'aval.

L'analyse de physico-chimie n'a pas révélé de contamination de l'eau par les effluents de station d'épuration, quel que soit le degré d'intermittence de la rivière. En effet, les paramètres mesurés tels que la Demande Biologique en Oxygène (DBO) ont peu varié entre les sites de référence (amont de station d'épuration) et les sites pollués (aval de station d'épuration). Pourtant plusieurs études antérieures sur les mêmes sites de prélèvements montrent une forte contamination (Crabot et al., 2021). L'absence de contamination avérée de l'eau peut être liée au fort débit au moment du prélèvement (de 18,5 m<sup>2</sup>/s le 11/02/2021, Hydroportail), qui a pu engendrer une dilution suffisamment forte pour diminuer drastiquement la concentration en polluants. De plus, ces stations d'épuration ne rejettent pas continuellement leurs effluents. Mis ensemble, ces résultats montrent qu'une analyse physico-chimique de la composition de l'eau à un instant précis n'intègre pas les contaminations chroniques ou sporadiques. Dans ce contexte, le recours aux communautés bioindicatrices telles que les macroinvertébrés, est particulièrement pertinent pour déceler un potentiel impact et c'est la base même des approches de bioindication qui intègre la variabilité physico-chimique de l'environnement sur des temps longs.



Un effet de la pollution sur la richesse et la structure des communautés de macroinvertébrés est détecté par l'ADNe issu de l'eau et des biofilms, alors qu'il n'a pas été détecté par l'approche morphologique. En morphologie, l'effet de l'intermittence est tellement fort, en particulier sur les taxons sensibles comme les EPT, que ces derniers ne reflètent pas le stress supplémentaire dû à la pollution. L'ADNe issu de l'eau est la seule qui met en évidence l'effet de la pollution sur la richesse, quel que soit le degré d'intermittence.

L'effet de la pollution dans la zone présentant un fort degré d'intermittence entre les sites de référence et pollués est moins visible, certainement dû, en partie, à l'accumulation de l'ADNe en aval qui vient brouiller le signal. Pour les biofilms, l'impact de la pollution dépend du niveau d'intermittence puisqu'elle est détectée uniquement dans la zone moyennement intermittente. Malgré les évidences que l'ADNe intègre la biodiversité à une large échelle spatiale (e.g. présence de taxons terrestres), il semblerait que cette approche selon la matrice utilisée soit aussi capable de déceler une perturbation à un niveau local. En effet, la présence de stations d'épuration interrompt localement l'augmentation progressive de la richesse taxonomique vers l'aval de la rivière (Figure 1-5). On note une diminution locale de la richesse pouvant aller jusqu'à 62 % entre les sites de références et pollués. Des études récentes font le même constat : l'ADNe peut capter des signaux locaux même en milieux lotiques (Cantera et al., 2022; Jeunen et al., 2019; J.-N. Macher et al., 2018). Entre les sites de références et pollués, on note une diminution importante de l'abondance des ADNe issus des EPT (Ephemeroptera, Plecoptera et Trichoptera), taxons connus pour être particulièrement sensibles à la pollution organique (Vivier, 1972), mais aussi des Coleoptera, des Calanoida et des Cyclopoida.

L'abondance de certains taxons a augmenté dans les sites pollués par rapport aux sites de référence, en particulier les Chironomidae et les Simuliidae (Diptera). La résolution taxonomique plus fine fournie par l'ADNe nous permet de mettre en évidence la diversité de ces taxons, omise par l'approche morphologique. En comparaison avec d'autres groupes d'insectes (tels que les Ephemeroptera et les Plecoptera), les réponses des différentes espèces de Chironomidae aux facteurs de stress environnementaux sont très variables, ces dernières montrant des réponses moins précises au niveau à la famille (Carew et al., 2011). Identifier ces taxons au genre ou à l'espèce permettrait peut-être de détecter et différencier les sources de stress et devenir des bioindicateurs pertinents pour les rivières intermittentes (Czechowski et al., 2020).

## 1.6. Conclusion

En comparant les inventaires de macro-invertébrés obtenus par l'ADNe et les inventaires conventionnels, nous fournissons des informations importantes sur l'applicabilité de l'ADNe pour la bioindication des rivières intermittentes. Cette étude montre que l'échantillonnage de l'ADNe *via* différentes matrices, donne des visions différentes de la composition et de la diversité des communautés par rapport à l'approche morphologique. L'échantillonnage ADNe permet, selon les matrices utilisées, de mettre en évidence l'impact d'une perturbation à un niveau local, et ce même dans un milieu subissant un stress hydrologique lié à des assèchements saisonniers. Grâce à l'apport d'une résolution taxonomique plus fine, l'ADNe a permis de mettre en évidence des bioindicateurs s'avérant pertinents pour les rivières intermittentes, comme les Chironomidae. De plus amples investigations sont toutes de même nécessaires pour valider la fiabilité du signal renvoyé par l'ADNe, et déployer cette approche sur un plus grand nombre de sites afin de vérifier l'applicabilité de l'ADNe dans des conditions environnementales variées.

## 2. Références

- AFNOR, 2004. Qualité de l'eau – Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN) (No. NF T90-350). AFNOR.
- AFNOR, 2010. Qualité de l'eau -Traitement au laboratoire d'échantillons contenant des macroinvertébrés de cours d'eau. (No. XP T90-388). AFNOR.
- AFNOR, 2016. Macroinvertébrés : Prélèvement en cours d'eau peu profond (No. NF T90-333). AFNOR.
- Andruszkiewicz Allan, E., Zhang, W. G., C. Lavery, A., & F. Govindarajan, A. (2021). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 3(2), 492–514. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>
- Armitage, P. D., & Blackburn, J. H. (1990). Environmental stability and communities of chironomidae (diptera) in a regulated river. *Regulated Rivers: Research & Management*, 5(4), 319–328. <https://doi.org/10.1002/rrr.3450050404>
- Bailey, R. C., Norris, R. H., & Reynoldson, T. B. (2001). Taxonomic resolution of benthic macroinvertebrate communities in bioassessments. *Journal of the North American Benthological Society*, 20(2), 280–286. <https://doi.org/10.2307/1468322>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Bik, H. M. (2021). Just keep it simple? Benchmarking the accuracy of taxonomy assignment software in metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources*, 21(7), 2187–2189. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13473>
- Birk, S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., Solimini, A., van de Bund, W., Zampoukas, N., & Hering, D. (2012). Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators*, 18, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.10.009>
- Blackman, R. C., Altermatt, F., Foulquier, A., Lefébure, T., Gauthier, M., Bouchez, A., Stubbington, R., Weigand, A. M., Leese, F., & Datry, T. (2021). Unlocking our understanding of intermittent rivers and ephemeral streams with genomic tools. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 19(10), Article 10. <https://doi.org/10.1002/fee.2404>
- Bonada, N., Prat, N., Resh, V. H., & Statzner, B. (2006). DEVELOPMENTS IN AQUATIC INSECT BIOMONITORING: A Comparative Analysis of Recent Approaches. *Annual Review of Entomology*, 51(1), Article 1. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151124>

- Bonada, N., Rieradevall, M., Prat, N., & Resh, V. H. (2006). Benthic macroinvertebrate assemblages and macrohabitat connectivity in Mediterranean-climate streams of northern California. *Journal of the North American Benthological Society*, 25(1), 32–43. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2006\)25\[32:BMAAMC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2006)25[32:BMAAMC]2.0.CO;2)
- Brantschen, J., Blackman, R. C., Walser, J.-C., & Altermatt, F. (2021). Environmental DNA gives comparable results to morphology-based indices of macroinvertebrates in a large-scale ecological assessment. *PLOS ONE*, 16(9), e0257510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257510>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Cañedo-Argüelles, M., Bogan, M. T., Lytle, D. A., & Prat, N. (2016). Are Chironomidae (Diptera) good indicators of water scarcity? Dryland streams as a case study. *Ecological Indicators*, 71, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.002>
- Cantera, I., Decotte, J.-B., Dejean, T., Murienne, J., Vigouroux, R., Valentini, A., & Brosse, S. (2022). Characterizing the spatial signal of environmental DNA in river systems using a community ecology approach. *Molecular Ecology Resources*, 22(4), 1274–1283. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13544>
- Carraro, L., Mächler, E., Wüthrich, R., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. *Nature Communications*, 11(1), 3585. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17337-8>
- Chang, F.-H., Lawrence, J. E., Rios-Touma, B., & Resh, V. H. (2014). Tolerance values of benthic macroinvertebrates for stream biomonitoring: Assessment of assumptions underlying scoring systems worldwide. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(4), 2135–2149. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3523-6>
- Clark, S., Smallwood, S., Lee, H., Krueger, F., Reik, W., & Kelsey, G. (2017). Genome-wide base-resolution mapping of DNA methylation in single cells using single-cell bisulfite sequencing (scBS-seq). *Nature Protocols*, 12, 534–547. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.187>
- Clarke, K., & Ainsworth, M. (1993). A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology Progress Series*, 92, 205–219. <https://doi.org/10.3354/meps092205>
- Corse, E., Tougard, C., Archambaud-Suard, G., Agnèse, J.-F., Messu Mandeng, F. D., Bilong Bilong, C. F., Duneau, D., Zinger, L., Chappaz, R., Xu, C. C. Y., Megléc, E., & Dubut, V. (2019). One-locus-several-primers: A strategy to improve the taxonomic and haplotypic coverage in diet metabarcoding studies. *Ecology and Evolution*, 9(8), 4603–4620. <https://doi.org/10.1002/ece3.5063>
- Crabot, J., Dolédec, S., Forcellini, M., & Datry, T. (2021). Efficiency of invertebrate-based bioassessment for evaluating the ecological status of streams along a gradient of flow intermittence. *Ecological Indicators*, 133, 108440.

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108440>

- Crabot, J., Polášek, M., Launay, B., Pařil, P., & Datry, T. (2021). Drying in newly intermittent rivers leads to higher variability of invertebrate communities. *Freshwater Biology*, 66(4), 730–744. <https://doi.org/10.1111/fwb.13673>
- Czechowski, P., Stevens, M. I., Madden, C., & Weinstein, P. (2020). Steps towards a more efficient use of chironomids as bioindicators for freshwater bioassessment: Exploiting eDNA and other genetic tools. *Ecological Indicators*, 110, 105868. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105868>
- Datry, T. (2012). Benthic and hyporheic invertebrate assemblages along a flow intermittence gradient: Effects of duration of dry events: River drying and temporary river invertebrates. *Freshwater Biology*, 57(3), 563–574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02725.x>
- Datry, T., Bonada, N., & Boulton, A. J. (Eds.). (2017). *Intermittent rivers and ephemeral streams: Ecology and management*. Academic Press, an imprint of Elsevier.
- De Caceres, M., Legendre, P. (2009). Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology*, URL <http://sites.google.com/site/miqueldecaceres/>
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), Article 21. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Deiner, K., Fronhofer, E. A., Mächler, E., Walser, J.-C., & Altermatt, F. (2016). Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature Communications*, 7(1), 12544. <https://doi.org/10.1038/ncomms12544>
- Eisenring, M., Altermatt, F., Westram, A. M., & Jokela, J. (2016). Habitat requirements and ecological niche of two cryptic amphipod species at landscape and local scales. *Ecosphere*, 7(5), e01319. <https://doi.org/10.1002/ecs2.1319>
- Ficetola, G. F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., De Barba, M., Gielly, L., Lopes, C. M., Boyer, F., Pompanon, F., Rayé, G., & Taberlet, P. (2015). Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 543–556. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12338>
- Grey, E. K., Bernatchez, L., Cassey, P., Deiner, K., Deveney, M., Howland, K. L., Lacoursière-Roussel, A., Leong, S. C. Y., Li, Y., Olds, B., Pfrender, M. E., Prowse, T. A. A., Renshaw, M. A., & Lodge, D. M. (2018). Effects of sampling effort on biodiversity patterns estimated from environmental DNA metabarcoding surveys. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27048-2>
- Hajibabaei, M., Porter, T. M., Wright, M., & Rudar, J. (2019). COI metabarcoding primer choice

- affects richness and recovery of indicator taxa in freshwater systems. *PLOS ONE*, 14(9), e0220953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220953>
- Hestetun, J. T., Lanzén, A., Skaar, K. S., & Dahlgren, T. G. (2021). The impact of DNA extract homogenization and replication on marine sediment metabarcoding diversity and heterogeneity. *Environmental DNA*, 3(5), 997–1006. <https://doi.org/10.1002/edn3.223>
- Hillebrand, H., Blasius, B., Borer, E. T., Chase, J. M., Downing, J. A., Eriksson, B. K., Filstrup, C. T., Harpole, W. S., Hodapp, D., Larsen, S., Lewandowska, A. M., Seabloom, E. W., Van de Waal, D. B., & Ryabov, A. B. (2018). Biodiversity change is uncoupled from species richness trends: Consequences for conservation and monitoring. *Journal of Applied Ecology*, 55(1), 169–184. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12959>
- Hleap, J. S., Littlefair, J. E., Steinke, D., Hebert, P. D. N., & Cristescu, M. E. (2021). Assessment of current taxonomic assignment strategies for metabarcoding eukaryotes. *Molecular Ecology Resources*, 21(7), 2190–2203. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13407>
- Jeunen, G., Knapp, M., Spencer, H. G., Lamare, M. D., Taylor, H. R., Stat, M., Bunce, M., & Gemmill, N. J. (2019). Environmental DNA (eDNA) metabarcoding reveals strong discrimination among diverse marine habitats connected by water movement. *Molecular Ecology Resources*, 19(2), 426–438. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12982>
- Kalogianni, E., Vourka, A., Karaouzas, I., Vardakas, L., Laschou, S., & Skoulikidis, N. Th. (2017). Combined effects of water stress and pollution on macroinvertebrate and fish assemblages in a Mediterranean intermittent river. *Science of The Total Environment*, 603–604, 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.078>
- 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. <https://doi.org/10.1111/mec.16364>
- Kirtane, A., Atkinson, J. D., & Sassoubre, L. (2020). Design and Validation of Passive Environmental DNA Samplers Using Granular Activated Carbon and Montmorillonite Clay. *Environmental Science & Technology*, 54(19), Article 19. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01863>
- Laini, A., Beermann, A. J., Bolpagni, R., Burgazzi, G., Elbrecht, V., Zizka, V. M. A., Leese, F., & Viaroli, P. (2020). Exploring the potential of metabarcoding to disentangle macroinvertebrate community dynamics in intermittent streams. *Metabarcoding and Metagenomics*, 4, e51433. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.51433>
- Larned, S. T., Schmidt, J., Datry, T., Konrad, C. P., Dumas, J. K., & Dietrich, J. C. (2011). Longitudinal river ecohydrology: Flow variation down the lengths of alluvial rivers. *Ecohydrology*, 4(4), 532–548. <https://doi.org/10.1002/eco.126>
- Leese, F., Sander, M., Buchner, D., Elbrecht, V., Haase, P., & Zizka, V. M. A. (2020). *Improved*

- freshwater macroinvertebrate detection from eDNA through minimized non-target amplification* [Preprint]. *Ecology*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.063545>
- Leese, F., Sander, M., Buchner, D., Elbrecht, V., Haase, P., & Zizka, V. M. A. (2021). Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification. *Environmental DNA*, 3(1), 261–276. <https://doi.org/10.1002/edn3.177>
- Leigh, C., Bonada, N., Boulton, A. J., Hugueny, B., Larned, S. T., Vander Vorste, R., & Datry, T. (2016). Invertebrate assemblage responses and the dual roles of resistance and resilience to drying in intermittent rivers. *Aquatic Sciences*, 78(2), 291–301. <https://doi.org/10.1007/s00027-015-0427-2>
- Lencioni, V., Marziali, L., & Rossaro, B. (2012). Chironomids as bioindicators of environmental quality in mountain springs. *Freshwater Science*, 31(2), 525–541. <https://doi.org/10.1899/11-038.1>
- Lim, N. K. M., Tay, Y. C., Srivathsan, A., Tan, J. W. T., Kwik, J. T. B., Baloğlu, B., Meier, R., & Yeo, D. C. J. (n.d.). Next-generation freshwater bioassessment: EDNA metabarcoding with a conserved metazoan primer reveals species-rich and reservoir-specific communities. *Royal Society Open Science*, 3(11), 160635. <https://doi.org/10.1098/rsos.160635>
- Macher, J. N., Salis, R. K., Blakemore, K. S., Tollrian, R., Matthaei, C. D., & Leese, F. (2016). Multiple-stressor effects on stream invertebrates: DNA barcoding reveals contrasting responses of cryptic mayfly species. *Ecological Indicators*, 61, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.08.024>
- Macher, J.-N., Vivancos, A., Piggott, J. J., Centeno, F. C., Matthaei, C. D., & Leese, F. (2018). Comparison of environmental DNA and bulk-sample metabarcoding using highly degenerate cytochrome *c* oxidase I primers. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1456–1468. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12940>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- McGeoch, M. A., & Chown, S. L. (1998). Scaling up the value of bioindicators. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(2), 46–47.
- Messenger, M. L., Lehner, B., Cockburn, C., Lamouroux, N., Pella, H., Snelder, T., Tockner, K., Trautmann, T., Watt, C., & Datry, T. (2021). Global prevalence of non-perennial rivers and streams. *Nature*, 594(7863), 391–397. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03565-5>
- Meybeck, M. (2003). Global analysis of river systems: From Earth system controls to Anthropocene syndromes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1440), 1935–1955. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1379>
- Morais, M., Pinto, P., Guilherme, P., Rosado, J., & Antunes, I. (2004). Assessment of

- Temporary Streams: The Robustness of Metric and Multimetric Indices under Different Hydrological Conditions. In D. Hering, P. F. M. Verdonschot, O. Moog, & L. Sandin (Eds.), *Integrated Assessment of Running Waters in Europe* (pp. 229–249). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0993-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0993-5_14)
- Munné, A., Bonada, N., Cid, N., Gallart, F., Solà, C., Bardina, M., Rovira, A., Sierra, C., Soria, M., Fortuño, P., Llorens, P., Latron, J., Estrela, T., Fidalgo, A., Serrano, I., Jiménez, S., Vega, R., & Prat, N. (2021). A Proposal to Classify and Assess Ecological Status in Mediterranean Temporary Rivers: Research Insights to Solve Management Needs. *Water*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/w13060767>
- Pansu, J. (2014). *Impacts des activités anthropiques sur la biodiversité: Une approche spatiale et temporelle par analyse de l'ADN environnemental*. 267.
- Pereira, H. M., Ferrier, S., Walters, M., Geller, G. N., Jongman, R. H. G., Scholes, R. J., Bruford, M. W., Brummitt, N., Butchart, S. H. M., Cardoso, A. C., Coops, N. C., Dulloo, E., Faith, D. P., Freyhof, J., Gregory, R. D., Heip, C., Höft, R., Hurr, G., Jetz, W., ... Wegmann, M. (2013). Essential Biodiversity Variables. *Science*, 339(6117), 277–278. <https://doi.org/10.1126/science.1229931>
- Pinder, L. C. V. (1986). Biology of Freshwater Chironomidae. *Annual Review of Entomology*, 31(1), 1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.31.010186.000245>
- Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civade, R., Jean, P., Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H., & Dejean, T. (2018). Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>
- Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Automated high throughput animal CO1 metabarcoding classification. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22505-4>
- Resh, V. H., & Unzicker, J. D. (1975). Water Quality Monitoring and Aquatic Organisms: The Importance of Species Identification. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 47(1), 9–19.
- Reyjol, Y., Argillier, C., Bonne, W., Borja, A., Buijse, A. D., Cardoso, A. C., Daufresne, M., Kernan, M., Ferreira, M. T., Poikane, S., Prat, N., Solheim, A.-L., Stroffek, S., Usseglio-Polatera, P., Villeneuve, B., & van de Bund, W. (2014). Assessing the ecological status in the context of the European Water Framework Directive: Where do we go now? *Science of The Total Environment*, 497–498, 332–344. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.119>
- Rivera, S. F., Rimet, F., Vasselon, V., Vautier, M., Domaizon, I., & Bouchez, A. (2022). Fish eDNA metabarcoding from aquatic biofilm samples: Methodological aspects. *Molecular Ecology Resources*, 22(4), 1440–1453. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13568>
- Rivera, S. F., Vasselon, V., Mary, N., Monnier, O., Rimet, F., & Bouchez, A. (2021). Exploring the capacity of aquatic biofilms to act as environmental DNA samplers: Test on



- macroinvertebrate communities in rivers. *Science of The Total Environment*, 763, 144208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144208>
- Robson, B., Chester, E., & Austin, C. (2011). Why life history information matters: Drought refuges and macroinvertebrate persistence in non-perennial streams subject to a drier climate. *Marine and Freshwater Research*, 62, 801–810. <https://doi.org/10.1071/MF10062>
- Skoulikidis, N. T., Sabater, S., Datry, T., Morais, M. M., Buffagni, A., Dörflinger, G., Zogaris, S., del Mar Sánchez-Montoya, M., Bonada, N., Kalogianni, E., Rosado, J., Vardakas, L., De Girolamo, A. M., & Tockner, K. (2017). Non-perennial Mediterranean rivers in Europe: Status, pressures, and challenges for research and management. *Science of The Total Environment*, 577, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.147>
- Skoulikidis, N. Th., Vardakas, L., Karaouzas, I., Economou, A. N., Dimitriou, E., & Zogaris, S. (2011). Assessing water stress in Mediterranean lotic systems: Insights from an artificially intermittent river in Greece. *Aquatic Sciences*, 73(4), 581. <https://doi.org/10.1007/s00027-011-0228-1>
- Soria, M., Gutiérrez-Cánovas, C., Bonada, N., Acosta, R., Rodríguez-Lozano, P., Fortuño, P., Burgazzi, G., Vinyoles, D., Gallart, F., Latron, J., Llorens, P., Prat, N., & Cid, N. (2020). Natural disturbances can produce misleading bioassessment results: Identifying metrics to detect anthropogenic impacts in intermittent rivers. *Journal of Applied Ecology*, 57(2), 283–295. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13538>
- Steward, A. L., Negus, P., Marshall, J. C., Clifford, S. E., & Dent, C. (2018). Assessing the ecological health of rivers when they are dry. *Ecological Indicators*, 85, 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.10.053>
- Stubbington, R., Chadd, R., Cid, N., Csabai, Z., Miliša, M., Morais, M., Munné, A., Pařil, P., Pešić, V., Tziortzis, I., Verdonschot, R. C. M., & Datry, T. (2018a). Biomonitoring of intermittent rivers and ephemeral streams in Europe: Current practice and priorities to enhance ecological status assessments. *Science of The Total Environment*, 618, 1096–1113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.137>
- Stubbington, R., Chadd, R., Cid, N., Csabai, Z., Miliša, M., Morais, M., Munné, A., Pařil, P., Pešić, V., Tziortzis, I., Verdonschot, R. C. M., & Datry, T. (2018b). Biomonitoring of intermittent rivers and ephemeral streams in Europe: Current practice and priorities to enhance ecological status assessments. *Science of The Total Environment*, 618, 1096–1113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.137>
- Sturmbauer, C., Opadiya, G. B., Niederstatter, H., Riedmann, A., & Dallinger, R. (1999). Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance. *Molecular Biology and Evolution*, 16(7), 967–974. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026186>
- Sweeney, B., Battle, J., Jackson, J., & Dapkey, T. (2011). Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? *Journal of the North American Benthological Society*, 30, 195–216. <https://doi.org/10.1899/10-016.1>

- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press.
- The Clean Water Act Jurisdictional Handbook (2nd ed.), Environmental Law Institute, Washington, DC (2012)
- Turner, C. R., Uy, K. L., & Everhart, R. C. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 183, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017>
- Verdier, H., Konecny-Dupre, L., Marquette, C., Reveron, H., Tadier, S., Grémillard, L., Barthès, A., Datry, T., Bouchez, A., & Lefébure, T. (2022). Passive sampling of environmental DNA in aquatic environments using 3D-printed hydroxyapatite samplers. *Molecular Ecology Resources*, 22(6), 2158–2170. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13604>
- Vivier, P. (1972). Action de la pollution organique sur la faune aquatique d'eau douce. *La Houille Blanche*, 58(2–3), 143–149. <https://doi.org/10.1051/lhb/1972010>
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S. E., Sullivan, C. A., Liermann, C. R., & Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555–561. <https://doi.org/10.1038/nature09440>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Watson, M., & Dallas, H. (2013). Bioassessment in ephemeral rivers: Constraints and challenges in applying macroinvertebrate sampling protocols. *African Journal of Aquatic Science*, 38(1), 35–51. <https://doi.org/10.2989/16085914.2012.742419>

### 3. Annexes II

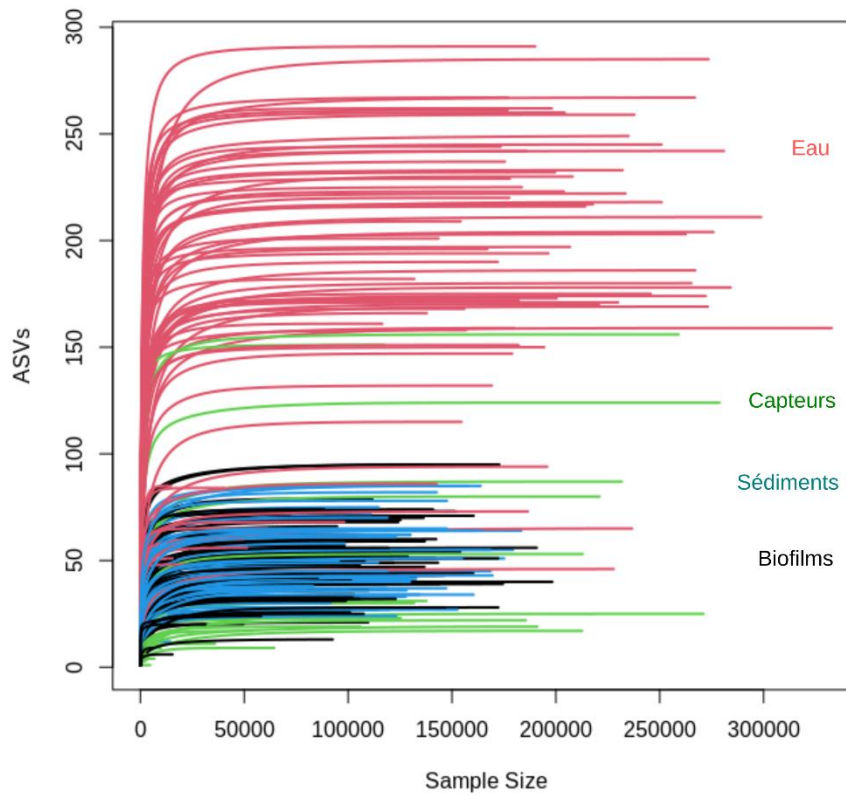


Figure 3-1: Courbe de raréfaction sur les données brutes issus du séquençage ; pour chaque échantillon selon les matrices d'échantillonnage utilisées (rouge = eau, vert = capteurs, bleu = sédiments, noir = biofilms).

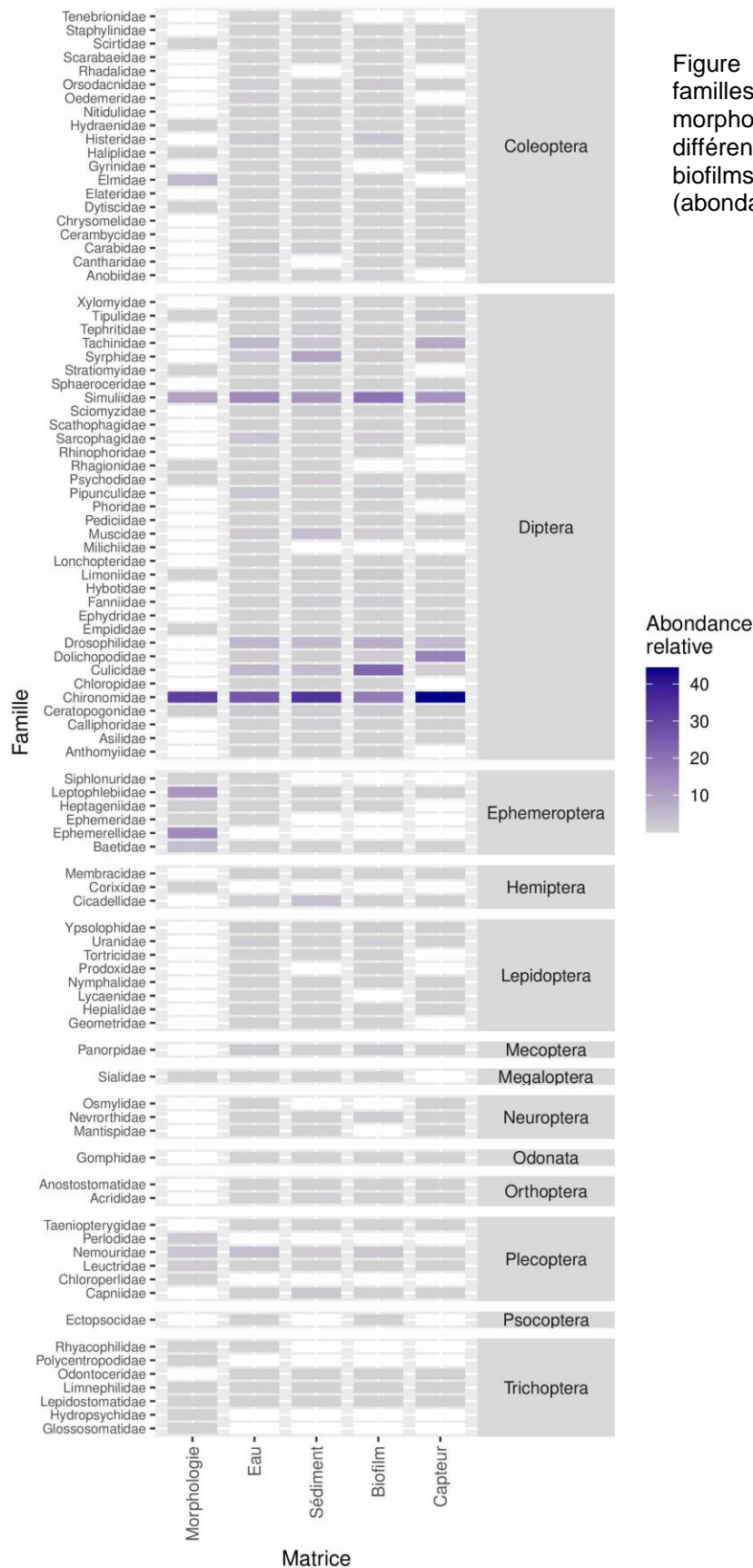


Figure 3-2 : Heatmap comparant les familles détectées par l'approche morphologique et par l'ADNe issus des différentes matrices (eau, sédiments, biofilms, capteurs) au rang de la famille (abondance supérieure à 0.0001%).

## Chapitre IV : Applicabilité de l'ADNe pour la bioindication des rivières intermittentes

Zone	Matrice	ASV	Règne	Embranchement	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	Contribution	Abondance_relative
FI	Eau	ASV41	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Orthocladius	Orthocladius_frigidus	0,01973542	279,16667
FI	Eau	ASV2	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Limoniidae	Gonomyia	Gonomyia_condensa	0,02101944	739,33333
FI	Eau	ASV39	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Drosophilidae	Drosophila	Drosophila_microralis	0,02289306	460,5
FI	Eau	ASV9	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Simuliidae	Simulium	Simulium_laterale	0,02490486	384,66667
FI	Eau	ASV26	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Orthocladius	Orthocladius_rivulorum	0,02713333	65
FI	Eau	ASV16	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Orthocladius	Orthocladius_rivulorum	0,02878681	661,41667
FI	Eau	ASV15	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Syrphidae	Meliscaeva	Meliscaeva_auricollis	0,03364792	92,83333
FI	Eau	ASV4	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Cricotopus	Cricotopus_metatibialis	0,03903403	343,91667
FI	Eau	ASV11	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Anthomyiidae	Botanophila	Botanophila_striolata	0,041775	907,91667
FI	Eau	ASV6	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Orthocladius	Orthocladius_frigidus	0,05912569	142,25
MI	Eau	ASV106	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Drosophilidae	Phortica	Phortica_hani	0,01464167	0,4166667
MI	Eau	ASV5	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	Australophyra	Australophyra_rostrata	0,01658264	122,4166667
MI	Eau	ASV100	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Simuliidae	Simulium	Simulium_aziruni	0,01680486	3,0833333
MI	Eau	ASV2	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Limoniidae	Gonomyia	Gonomyia_condensa	0,02339861	1007,833333
MI	Eau	ASV36	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Rhagionidae	Symphoromyia	Symphoromyia_crassicornis	0,02459583	132
MI	Eau	ASV4	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Cricotopus	Cricotopus_metatibialis	0,0259125	923,25
MI	Eau	ASV57	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Procladius	Procladius_bellus	0,02754097	12,5
MI	Eau	ASV43	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Procladius	Procladius_bellus	0,03396736	4,3333333
MI	Eau	ASV33	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Procladius	Procladius_bellus	0,03719444	201,9166667
MI	Eau	ASV25	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Simuliidae	Simulium	Simulium_pictipes	0,04255417	464,3333333
PR	Eau	ASV201	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Orthocladius	Orthocladius_glabripennis	0,01160556	3,25
PR	Eau	ASV32	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Syrphidae	Toxomerus	Toxomerus_norma	0,01262014	63,33333
PR	Eau	ASV81	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Diamesa	Diamesa_tonsa	0,01397153	260,58333
PR	Eau	ASV11	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Anthomyiidae	Botanophila	Botanophila_striolata	0,01823125	198,5
PR	Eau	ASV9	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Simuliidae	Simulium	Simulium_laterale	0,02162153	268,5
PR	Eau	ASV42	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	Cyrtoneuropsis	Cyrtoneuropsis_similata	0,02859444	591,75
PR	Eau	ASV31	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Diamesa	Diamesa_zernyi	0,03333403	577,58333
PR	Eau	ASV34	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Orthocladius	Orthocladius_frigidus	0,03685	17,5
PR	Eau	ASV14	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Anthomyiidae	Botanophila	Botanophila_striolata	0,05249306	29,75
PR	Eau	ASV1	Metazoa	Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	Orthocladius	Orthocladius_frigidus	0,12671181	3510

Tableau 3-1 : Tableau présentant les 10 taxons contribuant le plus à la dissimilarité entre les sites de référence et pollués sur les trois zones de la rivière présentant différents degrés d'intermittence (FI = Fortement Intermittente, MI = Moyennement Intermittente, PR = Pérenne)

# Chapitre V

## Synthèse des résultats, discussion et perspectives

---

Les écosystèmes d'eau douce et leur biodiversité font face à des pressions anthropiques grandissantes, qui peuvent se cumuler et interagir entre elles. Les méthodes de bioindication actuelles (capture et identification morphologique des bioindicateurs), en plus d'être invasives, ne sont pas toujours fiables pour retranscrire l'impact de ces perturbations, et sont inapplicables dans beaucoup d'écosystèmes complexes et dynamiques (e.g. larges rivières, rivières intermittentes, eaux souterraines). Dans ces conditions, des méthodes non invasives, sensibles et idéalement applicables à l'ensemble des milieux sont nécessaires. L'échantillonnage des communautés biologiques à travers l'ADNe qu'elles émettent dans l'environnement pourrait répondre à cet objectif. Cependant, le manque de compréhension fondamentale sur la production d'ADNe et sa dynamique, ainsi que les contraintes méthodologiques liées à l'échantillonnage en particulier dans les milieux complexes et dynamiques, limite encore son intégration dans un cadre réglementaire. Cette thèse proposait de lever les défis à l'application de l'ADNe pour la bioindication en (i) étudiant la production et l'état de l'ADNe et leurs impacts sur la détection des espèces (ii) développant un capteur passif à ADNe, standardisable et applicable dans un large panel de milieux et en (iii) testant la capacité de plusieurs outils d'échantillonnage de l'ADNe à détecter un impact anthropique dans une rivière subissant un stress hydrologique (rivière intermittente). Ce chapitre présente une synthèse des résultats obtenus dans un contexte opérationnel, puis il fournit des pistes de travail pour approfondir les connaissances sur l'ADNe et son applicabilité à la bioindication des écosystèmes complexes ou peu accessibles.

# 1. Synthèse et discussion

## 1.1. Interactions complexes entre états, origine et persistance de l'ADNe

L'écologie de l'ADNe (production, état, persistance et transport) est un aspect fondamental essentiel pour comprendre la dynamique de l'ADNe en milieux aquatiques, et inférer la présence d'espèces de manière fiable. Jusqu'à présent, deux aspects ont été sous-évalués : **la production et l'état des particules d'ADNe relarguées** dans l'environnement. Ces paramètres conditionnent à la fois la quantité d'ADNe disponible dans un milieu et la forme sous laquelle il est susceptible d'être détecté. Initialement, la quantité et l'état des particules d'ADNe sont probablement très différents selon les espèces et le compartiment génomique ciblé, et plus ou moins stable dans le temps. Le premier objectif de cette thèse visait à quantifier et à caractériser l'état des particules d'ADNe relarguées par des taxons éloignés phylogénétiquement, en fonction du temps et du compartiment génétique ciblé (nucléaire et mitochondrial). Les résultats ([Article 1](#), [Chapitre II](#)) suggèrent un lien complexe **entre l'état des particules d'ADNe, leur origine génomique et leur persistance** dans la colonne d'eau. Cette section met en avant (i) l'apport de cette thèse dans la compréhension globale de l'écologie de l'ADNe en écosystème d'eau douce et (ii) les implications possibles sur la façon d'échantillonner et d'analyser l'ADNe.

### 1.1.1. Nouvelles données sur les états de l'ADNe

Les premières études sur l'état des particules concernent quasi exclusivement les poissons et leur ADN mitochondrial. Les résultats entre espèces de poissons étant congruents, les auteurs concluent alors que l'ADNe est relargué majoritairement sous forme de particules de tailles supérieures à 10  $\mu\text{m}$ , et correspondent donc à des cellules entières ou morceaux de tissus (Turner et al., 2014, Jo et al., 2019, Barnes et al., 2021). Ces particules proviendraient majoritairement des fèces, du mucus ou des gamètes (Rivera et al., 2022), bien que ce dernier aspect n'ait pas été testé expérimentalement. Une fois dans l'eau, ces cellules seraient dégradées par différents processus à une vitesse constante (e.g. UVs, enzymes, acidité de l'eau), les conduisant d'un état intracellulaire à des fragments d'ADN libres dans l'eau, jusqu'à leur complète disparition (Jo, Murakami et al. 2019).



Les résultats de cette thèse, montrent que cette hypothèse semble beaucoup moins valable pour des organismes taxonomiquement éloignés des poissons. **L'ADNe semblerait être relargué sous différents états et quantités selon les taxons.** D'une part, les quantités d'ADNe relarguées sont extrêmement variables d'un taxon à l'autre, et certains ont des taux de production très faibles (les isopodes relarguent jusqu'à 1000 fois moins d'ADNe que les autres taxons). Ceci démontre que la production d'ADNe n'est pas seulement définie par la biomasse et la densité d'organismes dans un milieu, mais par des mécanismes plus complexes tels que le métabolisme ou la physiologie. D'autre part, bien qu'on ait mesuré des états à l'équilibre (entre production et dégradation), les fortes différences entre taxons permettent de suggérer que l'ADNe est émis sous de multiples états : **des cellules entières** (majoritaire chez les téléostéens), des **cellules déjà fragmentées** (majoritaire chez les isopodes), voire même des **organelles** ou des **fragments d'ADNe libres** (*Daphnia magna*, Moushomi et al., 2018). L'ADNe formerait alors dès le départ un mélange de particules **polydisperses** dans le milieu (molécules qui diffèrent du point de vue de la masse moléculaire ou de la constitution).

En fonction de leur typologie (e.g. libres, adsorbées), les particules d'ADNe pourraient présenter une dynamique, une vitesse ou encore des capacités d'adsorption et de rétention différentes. Les caractéristiques physiques des particules, souvent omises dans les expériences sur la dynamique de l'ADNe, pourraient également jouer un rôle déterminant dans la persistance et la dispersion de l'ADN en milieu aquatique et ainsi la détection des espèces. Elles pourraient expliquer, en faisant le lien avec les conditions environnementales (e.g. vitesse de courant, morphologie du cours d'eau), pourquoi la détection des espèces *via* l'ADNe peut être si variable d'un écosystème à l'autre ([Chapitre I, section 2.2.2](#)). Ci-après sont présentées des hypothèses sur les liens entre les différents états de l'ADNe et leur dynamique (c'est-à-dire leur persistance et leur transport). Puis, les implications potentielles de ces hypothèses pour l'échantillonnage et l'analyse de l'ADNe seront mises en avant.

### 1.1.2. Lien entre états, origine génomique et dynamique des particules d'ADNe

Selon leurs états et leur origine génomique, les particules d'ADNe pourraient persister et être transportées de manière variable dans l'environnement. Une fois relarguées, les particules d'ADNe semblent se dégrader à différentes vitesses selon (i) l'origine génomique dont ils proviennent (nucléaire ou mitochondrial) et (ii) leur états (intra ou extracellulaire). Les résultats de l'Article 1 vont dans ce sens avec une accumulation des petites particules d'ADNe nucléaires dans le temps. Jo et al., (2019) supportent nos résultats en montrant que l'ADN nucléaire (ITS1) issu de maquereau se dégrade plus vite que le mitochondrial dans l'eau. Concernant la dégradation selon les états de l'ADNe, des études ont comparé la vitesse de dégradation de fragments d'ADN libres de différentes tailles dans l'eau et indiquent une dégradation rapide de grands fragments (719 pb). Les fragments d'ADN courts (127 pb) semblent, eux, persister plus longtemps (Jo et al., 2017) et s'accumuler dans l'eau (Chapitre II, Figure 2-4). On peut également imaginer que selon leurs états, les particules d'ADNe puissent se disperser différemment. Par exemple, les particules d'ADNe légères telles que les fragments d'ADN libres pourraient rester dans la colonne d'eau et être transportées par le courant, ou être adsorbées sur des matières en suspension et des substrats présents dans l'eau (e.g. végétation, biofilm, sédiments). En effet, les fragments d'ADNe libres présentent un squelette phosphaté chargé négativement, qui peut se lier à certaines surfaces par le biais d'interactions ioniques (Chapitre III, section 1). À l'inverse, les particules d'ADNe les plus lourdes comme les cellules entières pourraient rapidement sédimenter.

Bien que ces hypothèses puissent être valables en conditions contrôlées ou dans des milieux naturels relativement stables, elles le sont certainement beaucoup moins en milieux lotiques par exemple, où la persistance des particules d'ADN n'est pas seulement liée à leur dégradation, mais à des mécanismes complexes de transport, d'adsorption et de rétention de ces particules. Plus particulièrement, dans les écosystèmes intermittents, présentant par exemple des alternances de phases d'écoulement (e.g. crue, bas débit), ou des échanges de flux d'eau important avec la zone hyporhéique. De plus, la remobilisation importante des sédiments dans ces systèmes peut représenter une source de variabilité supplémentaire pour la détection de l'ADNe.

Dans ces conditions, **étudier l'état de l'ADNe sa persistance et son transport séparément semblent sous optimales pour comprendre la dispersion et la dynamique de l'ADNe** (Andruszkiewicz Allan et al., 2021). De plus amples investigations sont nécessaires pour mieux comprendre les liens entre états, dynamiques et conditions environnementales, afin de fiabiliser l'information fournie par l'ADNe. Des perspectives sont proposées ci-après (section 3.1).

### 1.1.3. Capteurs passifs en hydroxyapatite : un potentiel masqué par une grande variabilité

L'échantillonnage de l'ADNe est l'une des étapes déterminantes pour collecter une quantité d'ADNe suffisante et inférer la présence des organismes. Le deuxième objectif de cette thèse était de développer des capteurs passifs, réutilisables et applicables idéalement dans divers habitats aquatiques. Les capteurs passifs à ADNe se sont montrés efficaces pour collecter des ADN **de nature très différente** (ADN de synthèse, ADN extrait d'organismes entiers ou ADNe), **rapidement** (en moins de 24H), en **conditions contrôlées et naturelles** (e.g. étang, rivières). Leur utilisation a par exemple permis de (i) détecter des espèces cibles dont le taux de production d'ADNe est extrêmement faible (*Asellus aquaticus*, [Chapitre II](#)) en surpassant les autres méthodes d'échantillonnage (filtration), et (ii) décrire des communautés de macro-invertébrés en rivière intermittente *via* le metabarcoding de l'ADNe ([Chapitre IV](#)). Cette section met en avant les potentiels des capteurs comparés aux autres méthodes d'échantillonnage de l'ADNe, et discute des problèmes de variabilité observés.

Ces résultats montrent l'intérêt des capteurs en hydroxyapatite pour collecter l'ADNe, en particulier de certains macro-invertébrés où l'ADNe est susceptible d'être libéré sous forme de pulse d'ADNe et dans différents états (voir section précédente). D'une part, parce qu'une immersion prolongée des capteurs permet de collecter l'ADNe relargué de manière discontinue, et d'autre part, parce qu'ils sont susceptibles de capturer l'ADNe sous différents états, et particulièrement des fragments d'ADN libres dans la colonne d'eau. Dans le [Chapitre III](#), la majorité des capteurs placés dans un étang (7 sur 9 capteurs) ont permis de collecter l'ADNe issu d'isopodes, surpassant la méthode de filtration d'eau.

Ce résultat confirmerait l'hypothèse que l'ADNe, du moins en étang et pour ces isopodes ([Article 2](#)), serait principalement sous forme de fragments d'ADN libres qui seraient difficilement capturés par les filtres. L'adsorption des fragments d'ADN libres sur l'hydroxyapatite est bien connue, et a été vérifiée expérimentalement ([Article 2](#), [Expérience 1](#)). Les capteurs pourraient également collecter d'autres états de l'ADNe, par exemple sous forme intracellulaire. En effet, l'hydroxyapatite est particulièrement utilisée pour fabriquer des implants prothétiques, car elle favorise le développement tissulaire et cellulaire à sa surface, garantissant le succès de l'implantation dans l'organisme humain (Ducheyne et Qiu, 1999, Bertazzo et al., 2010). Bien qu'à ce stade cela soit très hypothétique, il est possible que les capteurs puissent adsorber des cellules entières à leur surface une fois immergé dans l'eau (Bertazzo et al., 2010; Iwamoto et al., 2016).

D'un point de vue opérationnel, les capteurs offrent de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes d'échantillonnage utilisées au cours de cette thèse (filtration d'eau et extraction d'ADNe à partir de sédiments ou de biofilms épilithiques). Premièrement, ils sont rentables et permettent un gain de temps important. Une fois fabriqués, les capteurs sont réutilisables et leur mise en pratique repose sur des étapes simples et peu coûteuses. On peut estimer que la pose de capteurs dans un milieu est 2 à 3 fois plus rapide que la filtration d'eau ou le prélèvement de biofilms et de sédiments. Ensuite, ils peuvent être utilisés dans beaucoup de conditions environnementales. Ils pourraient être utilisés dans des milieux qui ne sont pas propices au développement de biofilms, lorsque les sédiments fins sont très peu disponibles comme dans l'étude *in situ* de cette thèse ([Article 3](#), [Chapitre IV](#)), ou encore lorsque l'eau est trop turbide pour être filtrée. De plus, leur maniabilité permettrait de les déployer dans des milieux peu accessibles. Enfin, il est possible de contrôler le temps d'immersion des capteurs dans l'eau et donc le temps d'intégration de l'ADN sur la surface, contrairement aux autres méthodes. En effet, la filtration est basée sur un prélèvement d'eau à un instant précis, peut-être pas suffisamment intégratif de la biodiversité. À l'inverse, l'eau et les sédiments accumulent de l'ADNe au cours du temps, et ce temps d'intégration inconnu pourrait fournir un signal temporel trop large et inutilisable pour la bioindication.

Malgré leurs potentiels évidents, d'importants problèmes de répliquabilité ont été observés. Tout au long des expériences, que ce soit en laboratoire ([Chapitre III](#)) et en milieux naturels ([Chapitres III et IV](#)), des variations extrêmes de la captation d'ADNe ont été observées, sans qu'il soit possible d'identifier leur origine dans le temps imparti de la thèse. La principale difficulté réside dans l'aspect imprédictible de la variation de captation. En effet, certains capteurs qui ne collectaient pas d'ADN à une expérience donnée pouvaient en collecter dans une autre, et ce de manière très aléatoire même lorsque les conditions expérimentales étaient proches de l'identique entre expériences. Bien que les résultats n'aient pas été tous présentés dans le [Chapitre III](#), de nombreuses expériences ont été réalisées pour tenter de comprendre l'origine de cette variabilité. Ces expériences visaient à tester de multiples facteurs qui pourraient influencer la captation d'ADNe :

- (i) des facteurs **biologiques** liés à l'ADN source (e.g. origine et type des ADN, densités des organismes, types d'organismes sources d'ADNe),
- (ii) des facteurs **abiotiques** liés au milieu dans lequel sont immergés les capteurs (e.g. mouvements d'eau, composition ionique de l'eau, pH, température),
- (iii) des facteurs **liés aux protocoles** d'utilisation des capteurs (e.g. temps d'immersion, kits d'élution de l'ADN, température ambiante).

Les résultats n'ont pas été présentés dans le corps du manuscrit, car étaient souvent difficiles à exploiter, et se sont finalement avérés être liés à une variabilité de captation. Cette variabilité vient très probablement des **paramètres de surface des capteurs**. Notamment des phénomènes de dissolution de la surface ont souvent lieu lorsque l'hydroxyapatite entre en contact avec l'eau (Bertazzo et al., 2010). Ainsi des substitutions ioniques en surface (changement de groupements ioniques en surface et remplacement par d'autres) pourraient complètement inhiber l'adsorption de l'ADNe dans certaines conditions. De plus amples investigations sur les caractéristiques physico-chimiques de surface sont requises pour comprendre ce problème de répliquabilité et seront présentées en perspectives (section 3.2).

### 1.1.4. Signal de l'ADNe : local, régional ou les deux ?

Pour être applicable à la bioindication, en particulier en milieu complexe, l'ADNe doit fournir un signal spatio-temporel fiable et exploitable sur les communautés biologiques présentes. Le **troisième objectif de la thèse était de tester la capacité de l'ADNe extrait à partir de plusieurs matrices naturelles, ainsi que les capteurs développés, à retranscrire l'impact d'une pollution locale dans une rivière intermittente**. Dans la littérature, l'échelle spatiale du signal ADNe en rivière est très variable (section 2.2). La majorité des études ont décrit un transport de l'ADNe vers l'aval, jusqu'à plusieurs dizaines de kilomètres depuis sa source (par exemple, Deiner et Altermatt, 2014 ; Jane et al., 2015 ; Laporte et al., 2020 ; Nukazawa et al., 2018 ; Sansom et Sassoubre, 2017 ; Shogren et al., 2019). Certains auteurs prônent alors l'ADNe comme un « intégrateur » de la biodiversité à l'échelle de paysage entier (Deiner et al., 2016). Néanmoins, la complexité de la dynamique de l'ADNe, mise en lumière notamment dans le [Chapitre II](#), mène à considérer ces conclusions avec prudence.

Dans l'étude exploratoire menée en rivière intermittente ([Article 3, Chapitre IV](#)), nous nous attendions à ce que les matrices d'échantillonnages (naturelles et capteurs passifs), selon leur typologie, fournissent une description des communautés à différentes échelles spatiales. La filtration d'eau pourrait fournir une vision à une échelle régionale de par le transport horizontal de l'ADNe, alors que les substrats fixés (capteurs, biofilms et sédiments) donnerait une vision plus locale du fait d'une rétention rapide de l'ADNe émit à proximité (Fremier et al., 2019). De manière surprenante, **la filtration d'eau a fourni un double signal sur la biodiversité : à la fois local et régional**. D'une part, la filtration d'eau était la seule méthode ayant permis de déceler l'impact local de la pollution sur la richesse et la structure des communautés de macro-invertébrés. Ce signal local concordait avec l'approche morphologique puisqu'il correspondait à une diminution drastique des taxons polluo-sensibles (e.g. Ephemeroptera) dans les sites pollués et, à l'inverse, une forte abondance relative de taxons à priori polluo-tolérants (e.g. Chironomidae, Simuliidae).

D'autre part, la filtration a fourni également un signal « régional » des communautés de par (i) la détection d'ADNe issus de taxons terrestres (Cicadidae, Hemiptera) et (ii) une accumulation de l'ADN dans les zones les plus en aval de la rivière, démontrant bien un transport horizontal de l'ADNe vers l'aval. Bien que ce double signal puisse être dû à une multitude de facteurs, agissant probablement en interaction, cela conduit à se questionner sur deux aspects qui pourraient jouer un rôle clé.

Le **type de substrats** présents pourrait fortement affecter la détection de l'ADNe dans la colonne d'eau. Par exemple, Buxton et al. (2017) indique que les sédiments peuvent avoir une influence importante sur la disparition de l'ADNe dans l'eau, en particulier la présence de sédiments fins. En effet, il semblerait que les particules d'ADNe soient piégées dans les interstices des sédiments ou substrats benthiques (Fremier et al., 2019, Shogren et al., 2017). La rivière étudiée dans cette thèse était constituée d'un lit de galet avec très peu de sédiments fins accessibles. Ainsi, le brassage par le courant, associé à la faible sédimentation de l'ADNe a pu favoriser la présence d'ADNe dans l'eau et dans les biofilms épilithiques. En effet, la richesse était plus importante dans ces deux compartiments et augmentait vers l'aval de la rivière, alors qu'elle était bien plus faible dans les sédiments et restait stable entre l'amont et l'aval de la rivière. Ainsi, **la présence et la quantité de substrat d'un milieu pourraient être déterminants pour la détection des espèces par l'ADNe**. En d'autres termes, plus la présence de substrat est importante, moins la quantité d'ADNe dans l'eau sera importante et vice versa. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi la détection d'une espèce d'isopode (*A.aquaticus*) en étang (Chapitre III, Article 2) par filtration d'eau était médiocre. En effet, cet étang présente une faible hauteur d'eau, peu de brassage, et une quantité de substrat biologique, dont des particules fines beaucoup plus importantes que la rivière intermittente étudiée dans le dernier chapitre. Ceci expliquerait la sédimentation ou l'adsorption rapide de l'ADNe et sa disparition de la colonne d'eau, le rendant difficilement détectable à travers un échantillon d'eau.

Le double signal retrouvé par la filtration d'eau pourrait être due à une **différence de transportabilité des ADNe** selon l'état, la taille et la constitution des particules relarguées. Nous avons vu dans le [chapitre II](#) que selon l'espèce considérée et le compartiment génétique, l'ADNe pouvait prendre différents états et potentiellement persister plus ou moins longtemps dans les différentes matrices naturelles. Comme vu précédemment (section 1.1.3), certaines particules d'ADNe plus lourdes pourraient parcourir une distance plus faible que les particules plus légères telles que les fragments d'ADNe libres (cf [section 1.1.2](#)), et rester relativement proches des organismes sources. Ces particules pourraient constituer le pool local d'ADN observé. À l'inverse, les particules légères telles que les fragments d'ADN être libres pourraient être transportées plus en aval, et composer le pool « régional » d'ADN. Néanmoins, le peu d'informations disponibles à ce sujet limite l'établissement d'hypothèses solides.

Pour conclure, l'ADNe selon la méthode d'échantillonnage employée est capable de retranscrire des perturbations locales, mais aussi d'intégrer une échelle spatiale plus large. Néanmoins, la pertinence de ce double signal pour la bioindication doit être vérifiée dans des contextes plus diversifiés (e.g. rivières plus ou moins larges, sinueuses, en conditions d'assèchements). En particulier, une attention doit être portée sur la structure du bassin versant et ses différentes composantes, et spécifiquement les zones situées le plus en aval. Il est possible que la capacité de l'ADNe à détecter une perturbation locale dans ces zones soit moins fiable, car floutée par l'effet « collecteur » d'ADNe. De futures investigations sont nécessaires afin de confirmer le réel potentiel de l'ADNe pour la bioindication dans ce type de milieu, ainsi que la pertinence apportée par ces différents signaux d'ADN. Ces aspects seront discutés section 3.3.1.



### 1.1.5. Implications des résultats pour l'échantillonnage, l'analyse de l'ADNe pour la bioindication

Mis ensemble, les résultats de cette thèse mènent à s'interroger sur la manière optimale d'échantillonner et d'analyser l'ADNe pour garantir la détection des espèces dans le cadre de la bioindication. Si la filtration d'eau est la méthode d'échantillonnage d'ADNe la plus utilisée, elle semble *a priori* ne pas être optimale du fait qu'elle omet une grande partie des particules d'ADNe en ne ciblant que certaines tailles de particules. Or dans le [Chapitre IV](#), c'est cette même méthode qui a donné les meilleurs résultats comparés à toutes les autres méthodes explorées (extraction de sédiments, biofilms et capteurs en hydroxyapatite). Ainsi, il semblerait qu'il n'existe pas, pour l'instant, de méthodologie « unique » optimale pour détecter des espèces par l'ADNe. Dans certains milieux (e.g. selon la quantité de sédiments et de biofilms), ou pour certaines espèces (e.g. isopodes), une méthode d'échantillonnage pourrait être meilleure qu'une autre. Ainsi, la détection de l'ADNe est influencée par une multitude de paramètres allant des caractéristiques intrinsèques de l'ADN, à sa dynamique jusqu'aux méthodes d'échantillonnage et d'analyse employées.

A cela s'ajoute d'autres défis, tel que l'accès aux informations d'abondance des organismes. L'abondance relative ou absolue est utilisée dans le calcul de la plupart des indices biotiques (Pawlowski et al., 2018). Les difficultés à estimer l'abondance des organismes semblent être reliées d'une part à la méthode de détection (détection de taxon cible ou multi-taxons) et le type d'organisme ciblé. La quantité d'ADNe de poissons et d'amphibiens cibles, mesurée en PCR quantitative, est souvent corrélée à la biomasse des organismes (Lacoursière-Roussel et al., 2016; Yates et al., 2019). Ces résultats encourageants laissent entrevoir la possibilité de relier la concentration d'ADN à l'abondance des individus. Néanmoins, ceci semble beaucoup plus difficile pour les macro-invertébrés qui émettent de l'ADNe de manière discontinue, souvent à des concentrations très faibles comparées aux poissons et aux amphibiens. Dans ce cas, la concentration d'ADN ne semblerait pas être un bon proxy pour estimer l'abondance ([Chapitre II, Article 1](#)). Avec le metabarcoding de l'ADNe (détection de multiples espèces), estimer l'abondance apparaît encore plus difficile (Shaw et al., 2016 ; Elbrecht et al., 2017).

Le nombre de séquences générées par le metabarcoding ne correspond pas directement au nombre d'individus ou à la biomasse (Carew et al., 2013; Elbrecht et Leese, 2015). De multiples facteurs peuvent influencer l'estimation de l'abondance des organismes à partir des séquences obtenues. Premièrement, nous avons vu précédemment qu'à une biomasse donnée, les taxons émettent des quantités d'ADNe différents. Deuxièmement, l'efficacité des amorces PCR et de la réaction en elle-même est source de biais. Le nombre de séquences finales attribuées à une espèce donnée dépend fortement du nombre d'amplicons générés pendant la réaction PCR. L'efficacité des amorces PCR diffère selon les espèces (Kermarrec et al., 2013 ; Elbrecht et Leese, 2015 ; Elbrecht et al., 2017, Elbrecht et al., 2017). Ainsi, les amorces peuvent amplifier préférentiellement l'ADN de certains taxons, ce qui conduit à une situation courante où la plupart des lectures de séquençage appartiennent majoritairement à quelques espèces dont l'ADN est facilement amplifié par rapport aux autres. En outre, l'efficacité des amorces PCR diffère probablement d'un échantillon à l'autre en fonction de la communauté biologique ciblée. À l'heure actuelle, il n'existe pas de solution unique et simple pour résoudre les problèmes liés à l'estimation de l'abondance. L'approche la plus fiable consiste à n'utiliser que les données de présence/absence, comme proposée dans le cas du macrozoobenthos d'eau douce (Elbrecht et Leese, 2015). D'autres solutions ont été proposées et consistent à utiliser des facteurs de correction, comme développé par Vasselon et al. (2017) pour les diatomées. Néanmoins, ceci reste difficile à appliquer sur des organismes pluri-cellulaires.

## 2. Conclusion et recommandations

Dans l'ensemble, ce travail de thèse a démontré le potentiel de l'échantillonnage de l'ADNe pour la bioindication, notamment pour détecter une perturbation anthropique dans une rivière subissant déjà un stress hydrologique. Néanmoins, les recherches et développements concernant l'ADNe de macro-invertébrés a pris un certain retard par rapport aux autres groupes (e.g. poissons, Keck et al., 2022), et des efforts restent encore à fournir pour aller vers l'intégration de l'ADNe à la bioindication. Plus particulièrement, cette thèse montre l'importance et la nécessité de mieux comprendre la dynamique de l'ADNe, en tissant des liens avec d'autres domaines de recherche tels que la physique et la chimie pour mieux comprendre les mécanismes de dispersion et de dégradation de l'ADNe. Pour le moment, l'ADN extrait directement à partir des communautés ou « bulk DNA » de macro-invertébrés apparaît comme une solution exploitable à plus court terme (Blackman et al., 2019) permettant de consolider les développements méthodologiques (e.g. protocoles de laboratoire, biais d'amorces) et analytiques (e.g. aspects quantitatifs) avant de passer à la détection des organismes par l'ADNe.

## 3. Perspectives

### 3.1. Mieux comprendre les liens entre états, persistance et transport de l'ADNe

Cette thèse met en évidence les liens complexes entre états, origine génomique et dynamique (persistance et transport) des particules d'ADNe dans les milieux aquatiques. Une caractérisation plus fine des états de l'ADNe directement produits par les organismes, en lien avec leur dégradation et leur transport permettrait d'aller plus loin dans la compréhension de sa dynamique dans les milieux aquatiques. En effet, la méthode de filtration séquentielle utilisée dans le Chapitre II (Article 1) est trop indirecte pour inférer avec précision les états de l'ADN. D'une part, la filtration d'un volume d'eau à travers plusieurs filtres, suivi de l'extraction peut entraîner des pertes d'ADN au cours des différentes étapes et sous-estimer la quantité d'ADNe. D'autre part, la taille des particules piégées sur les différents filtres n'est certainement pas un bon proxy pour inférer l'état moléculaire de ces particules. Par exemple, si des particules d'ADNe sont piégées sur un filtre de grande porosité (e.g. supérieur à 10  $\mu\text{m}$ ), nous estimerons qu'il s'agit de cellules ou de tissus. Or, il peut s'agir de fragments d'ADNe libres adsorbés sur des matières en suspension ou agglomérés entre eux. Ainsi, une perspective intéressante serait de réaliser une expérience en canal artificiel couplant (i) une meilleure prise en compte de la dynamique spatio-temporelle des différents états de l'ADNe et (ii) l'utilisation d'un outil analytique pour caractériser plus finement l'état des particules.

Cette expérience consisterait à placer des organismes vivants dans un canal artificiel contenant des sédiments et des biofilms, dont le débit et l'écoulement de l'eau seraient contrôlables. Des prélèvements d'eau, de biofilms et de sédiments seraient réalisés juste après l'ajout des organismes (1h) puis à plusieurs temps rapprochés (2h, 6h, 12h) pour mesurer exactement la quantité de particules d'ADNe produite et leurs états. Le prélèvement des différentes matrices naturelles permettrait d'estimer indirectement le transport de l'ADNe et sa rétention après relargage. Dans un deuxième temps, les organismes seraient retirés du canal puis les mêmes prélèvements seraient réalisés, en l'absence d'organismes pour mesurer la vitesse de dégradation de l'ADNe dans les différents substrats.

Enfin, l'ADNe serait quantifié par qPCR pour mesurer la quantité d'ADN et le taux de dégradation. Enfin, au lieu d'utiliser un système de filtration séquentiel, les états des particules pourraient être déterminés à l'aide d'un cytomètre trieur. Cet appareil permet d'isoler et de récupérer une ou plusieurs population(s) extra et intra-cellulaire(s) selon des critères de taille, de granulosité (contenu cellulaire) et/ou de fluorescence (récepteur, transformation génétique, phase cellulaire...). Il serait donc possible d'utiliser des marqueurs ADN pour trier et identifier les particules d'ADNe selon leur taille et leur origine génomique (sondes fluorescentes différentes pour l'ADNe mitochondrial et nucléaire), et estimer de manière plus directe le type de particules d'ADNe et leur origine biologique. Néanmoins, cette technologie est aujourd'hui appliquée dans des domaines très éloignés de l'ADNe. En conséquence, une étape de développement importante sera nécessaire pour adapter cette technique à des particules en très faibles concentration comme l'ADNe, dont le signal pourrait se confondre avec le bruit de mesure de l'appareil. Une étape de filtration et/ou de précipitation de l'échantillon d'eau pourrait notamment être nécessaire pour concentrer l'échantillon en ADNe. *In fine*, une meilleure connaissance des états de l'ADNe, leur persistance et leur transport permettrait ainsi le développement de modèle statistique prenant en compte l'ensemble de ces paramètres et mieux estimer la distribution de l'ADNe dans l'environnement.

### 3.2. Voies d'amélioration des capteurs passifs à ADNe

#### 3.2.1. Mieux comprendre les interactions ADNe/surface

Ces travaux de thèse ont mis en évidence le fort potentiel des capteurs en hydroxyapatite pour collecter passivement l'ADNe en milieux aquatiques. Cependant, la grande variabilité dans l'efficacité de captation (c'est-à-dire l'adsorption) d'ADN empêche pour l'instant son application pour inventorier la biodiversité. Nous avons vu dans le Chapitre III que l'adsorption de l'ADNe sur l'hydroxyapatite est intimement liée à l'interaction chimique entre l'ADN et la surface. Ainsi, trois paramètres semblent déterminants pour l'adsorption de l'ADN à l'hydroxyapatite et la stabilité de la liaison : les **caractéristiques physiques** (e.g. microstructure, porosité) **et chimiques** (groupements de surface et leur stabilité) de la surface des capteurs, et le(s) **type(s) d'interaction(s) liant l'ADN à cette surface ainsi que leur force**.

Des modifications des propriétés de surface des capteurs au cours de l'utilisation pourraient être à l'origine des problèmes de répliquabilité observés pendant les expériences de la thèse. Le point de départ serait de caractériser ces propriétés et identifier si elles varient d'un capteur à l'autre, ou évoluent au cours des étapes d'utilisation des capteurs (décontamination, immersion dans l'eau et élution). Ceci pourrait donner des indices sur l'origine de la variabilité de captation d'ADNe et des pistes pour optimiser les paramètres de fabrication. Cette section propose différentes analyses permettant de mesurer ces paramètres.

### Perspective 1 : Caractérisation des propriétés physiques de la surface.

La microstructure regroupe l'ensemble des propriétés physiques microscopiques de surface pouvant influencer la captation d'ADN. Parmi ces propriétés, la porosité et la cristallinité pourraient être particulièrement importantes à considérer. La porosité fait référence aux « vides » microscopiques d'un matériau solide. Il en existe deux types: la porosité ouverte et fermée. La structure poreuse est dite fermée lorsque les pores ne sont pas reliés entre eux et sont inaccessibles à l'eau et à l'air puisqu'ils ne débouchent pas en surface, et ouverte lorsque les pores sont reliés entre eux, formant des canaux très fins. Il a été montré que plus un matériau est poreux, plus il favorise l'adsorption de biomolécules. Ceci est lié à l'augmentation de la surface spécifique (en  $m^2/gramme$  de matière), c'est-à-dire simplement, la surface disponible pour fixer l'ADN. L'objectif ici serait de comparer le type de porosité et la quantité de pores entre des capteurs ayant montré des rendements de captation contrastés. La porosité peut être évaluée par un montage d'Archimède.

### Perspective 2 : Caractérisation chimique

Après avoir caractérisé les propriétés physiques de surface, la prochaine étape serait de caractériser les propriétés chimiques et en **particulier les groupements ioniques permettant l'adsorption de l'ADN**. Pour cela, il serait possible d'utiliser des technologies de spectroscopie infrarouge types FT-IR ou Raman (FTIR). Toutes les molécules émettent, par le biais de leur liaisons chimiques, des vibrations (e.g. déformation, élongation). Lorsque ces molécules sont excitées par une source d'énergie, elles vont émettre un signal vibrationnel qui leur est propre. Ainsi, il est possible de reconnaître la signature des molécules et d'identifier le groupement chimique dont elles proviennent.

En pratique, cette analyse consiste à envoyer un rayonnement infrarouge à des longueurs d'onde différentes sur l'échantillon (ici les capteurs), les modes vibrationnels des molécules aux différentes longueurs d'onde sont retranscrites sur un spectre. En d'autres termes, on obtient des bandes d'absorption, résultant de modes vibrationnels intramoléculaires qui absorbent la source d'énergie. La position (longueur d'onde convertie en nombre d'onde) et la forme des bandes d'absorption d'un spectre sont donc caractéristiques des groupements chimiques d'où elles proviennent. Cette analyse permettrait donc de déterminer les groupements moléculaires en surface, notamment ceux responsables de l'adsorption (calcium, phosphate).

Ce travail de caractérisation des surfaces a déjà été initié dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire Matériaux Ingénierie et Sciences (MATEIS, Lyon), plus particulièrement les équipes Céramiques et Composites. Cette collaboration a donné lieu à un stage de Master 2, et débouchera probablement sur un sujet de thèse.

### 3.2.2. Optimisation de la surface des capteurs

En plus d'une caractérisation physico-chimique de la surface et des interactions avec l'ADN, plusieurs paramètres initiaux dans la confection des capteurs peuvent être optimisés pour renforcer l'adsorption et augmenter la quantité d'ADN adsorbée. Comme évoqué précédemment, les interactions ioniques sont primordiales pour assurer l'adsorption de l'ADNe. Plus spécifiquement, les groupements phosphate en surface des capteurs sont particulièrement importants puisque c'est à eux que les groupements phosphate de l'ADN sont supposés se relier par le biais de cations inorganiques présents dans l'eau ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+/3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ). Deux propositions peuvent être faites pour augmenter le nombre de sites d'adsorption sur la surface et favoriser les liaisons avec l'ADN.

#### **Perspective 1 : Contrôler le ratio Ca/P de la surface**

Les capteurs sont imprimés à partir d'une résine en hydroxyapatite contenant majoritairement du phosphate (P) de calcium (Ca). Parmi les résines disponibles à la vente, certaines présentent des ratios de concentration Ca/P différents. Sélectionner une résine avec un ratio Ca/P plus élevé permettrait peut-être d'augmenter la quantité de phosphate disponible dans les capteurs une fois imprimé, fournissant un nombre de sites de fixation pour l'ADNe plus important.

### Perspective 2 : Fonctionnalisation de la surface.

Une autre alternative pour optimiser l'efficacité de captation des capteurs serait la technique de fonctionnalisation de surface. La fonctionnalisation de surface désigne l'optimisation ou l'ajout de propriétés à la surface d'un matériau dans le but d'améliorer ses performances ou lui conférer de nouvelles fonctionnalités (adhérence, accroche mécanique...). Pour les capteurs passifs à ADNe, l'objectif serait « d'ajouter » des groupements ioniques positifs pour favoriser l'adsorption d'ADN et la stabiliser.

## 3.3. Un pas vers la bioindication du futur

### 3.3.1. Fiabilisation du signal spatio-temporel de l'ADNe

L'échantillonnage de l'ADNe, selon la méthode employée (filtration) a permis de mettre en évidence une pollution localisée sur les communautés bioindicatrices (macro-invertébrés) en rivière intermittente ([Article 3, Chapitre IV](#)). Ces résultats prometteurs doivent cependant être confirmés par des expériences supplémentaires afin de (i) **fiabiliser cette information** et (ii) **la valider dans des écosystèmes présentant des conditions environnementales contrastées**. Bien que les inventaires de macro-invertébrés entre l'ADNe et l'approche morphologique semblent congruents, les différences en termes de résolution taxonomique limitent la pertinence de la comparaison. Par exemple, les Chironomidae sont assignés au rang de la famille en morphologie, alors qu'ils le sont à l'espèce en ADNe. Dans ces conditions il est difficile de vraiment savoir si les espèces de Chironomidae recensées par l'ADNe sont réellement présentes localement.

Ainsi, pour vérifier la capacité de l'ADNe à refléter les communautés au niveau local, une solution serait de comparer les inventaires de macro-invertébrés avec ceux obtenus par une méthode d'échantillonnage locale fiable, et présentant une identification taxonomique aussi fine que l'ADNe. Pour cela, utiliser le metabarcoding de l'ADN extrait directement des communautés prélevées *in situ* serait une solution appropriée. De plus, ceci permettrait découpler l'apport de l'identification moléculaire par le séquençage, de l'apport d'une méthode d'échantillonnage qui intègre un signal spatial à plus large échelle (ADNe). Ce travail de comparaison est déjà en cours puisqu'il a été initié dans le cadre d'une collaboration avec un projet de recherche (MISTRAL, Université Lyon 1).



Ce projet vise à identifier les meilleurs protocoles d'extraction d'ADN pour le metabarcoding issus de communautés « bulk » de macro-invertébrés. Ainsi, les campagnes d'échantillonnage du projet Mistral et de la thèse ont été réalisées en parallèle, sur les mêmes sites de prélèvements.

Deuxièmement, une seconde étape de validation serait de réaliser une campagne d'échantillonnage de l'ADNe *via*, différentes matrices naturelles, à l'échelle du bassin versant entier avec des points d'échantillonnage couvrant au maximum l'hétérogénéité spatiale. Ainsi, cela permettrait de valider la capacité de l'ADNe à retranscrire des perturbations locales en considérant les différentes parties du bassin versant, et son potentiel effet « collecteur » de l'ADNe en aval (section 1.2.2). Sur ce jeu de données, des analyses de nestedness et de turnover pourraient être réalisées afin de voir si la biodiversité trouvée avec l'ADNe en aval un sous-échantillon de la biodiversité en amont ou si elle représente une biodiversité unique/différente. Ces analyses consistent en la décomposition de la diversité beta en deux composantes (nestedness et turnover) pour connaître la part de chacune dans la diversité. Les données pourraient être ensuite comparées à un projet d'envergure, où des communautés de macro-invertébrés ont été prélevées sur plus de 600 points sur le bassin versant de l'Albarine (projet DRYvER, Riverly, INRAE).

### 3.3.2. Développement d'indices biotiques ADNe pour les rivières intermittentes

#### A. Les Chironomidae comme bioindicateurs

Les résultats de cette thèse ont mis en évidence des taxons qui s'avèreraient être des bioindicateurs de pollution pertinents en rivière intermittente ; et plus particulièrement le groupe des Chironomidae. Ce groupe est l'un des plus abondants et diversifiés parmi les insectes peuplant les écosystèmes d'eau douce (Ashe et al., 1987, Ferrington, 2008). Leur potentiel en tant que bioindicateur est largement reconnu depuis plusieurs dizaines d'années (Nicacio & Juen, 2015), mais les difficultés liées à leur identification morphologique ont restreint la possibilité de développer des indices biotiques. Utiliser l'ADNe issu de ces organismes permettrait de révéler leur potentiel, en particulier pour la bioindication des rivières intermittentes.

Les Chironomidae sont ubiquistes, et peuvent être présents sur une large gamme de gradients environnementaux, y compris les gradients de pH, de salinité, d'oxygène dissous, de niveau d'eau et de température (Armitage et al., 2012). Selon les espèces, ils peuvent répondre de manière spécifique à différents stress. Par exemple, Beermann et al., (2018) ont étudié l'effet de différentes pressions en microcosmes et sur 35 espèces de Chironomidae, et 15 d'entre elles fournissaient des réponses spécifiques aux facteurs de stress. Ceci est particulièrement intéressant pour les RIs, car certaines espèces pourraient résister à l'assèchement, et dans le même temps, être sensibles à la pollution. D'autre part, ils peuvent peupler de nombreux habitats typiques des RIs, aussi bien des habitats lenticques, lotiques que des mares temporaires. Leur utilisation permettrait ainsi de démêler les différents facteurs de stress en rivière intermittente, et mettre en évidence plus clairement des perturbations anthropiques. Pour développer des indices basés sur l'ADNe des Chironomidae, plusieurs étapes seraient nécessaires en amont. Premièrement, toutes les espèces n'ont probablement pas les mêmes réponses aux différentes pressions, ainsi il faudrait tout d'abord mesurer la tolérance ou à l'inverse la sensibilité de ces organismes à des gradients de pression (e.g. assèchements, pollution). Deuxièmement, il serait nécessaire de concevoir des amorces PCR suffisamment spécifiques à l'ensemble des espèces de Chironomidae pour garantir une détection fine des taxons. Enfin, des bases de données exhaustives recensant les espèces présentes sur le territoire devraient être développées. Néanmoins, cette dernière étape suppose que les Chironomidae des différentes régions soient suffisamment bien connus et identifiables pour permettre une assignation à l'espèce.

### B. Indices basés sur les séquences

Le développement d'indices basés sur l'ADNe des Chironomidae apparaît comme une perspective intéressante. Néanmoins, les difficultés liées aux bases de données et à l'estimation de l'abondance (section 1.1.6) des organismes pourraient fortement limiter leur potentiel bioindicateur dans le calcul d'indice biotique. Une autre possibilité serait de s'affranchir complètement de la taxonomie, en utilisant les ASV ou les OTUs produits à partir des séquences ADN comme proxy d'espèces. Ceci découlerait sur un indice non pas taxonomique, mais un indice « ASV » ou « OTU ». Ce type d'approche permet d'exploiter l'ensemble des séquences ADN, même si la plupart des espèces ne sont pas référencées dans la base de données, ce qui pourrait être le cas pour les Chironomidae dont l'identification morphologique est complexe.

Pour les rivières intermittentes, il serait intéressant d'analyser, sur un jeu de données conséquent, la structure des séquences (ASV ou OTUs) le long de gradients d'intermittence et de pollution. Ceci permettrait de voir si l'on observe une « signature » génétique particulière en fonction de la source de perturbation. Récemment, plusieurs auteurs ont proposé une méthode sans taxonomie en développant des approches de machine learning (algorithmes d'apprentissage automatique supervisé, SML) pour prédire l'état écologique (Cordier et al., 2017; Keck et al., 2017). Les résultats montrent que les indices biotiques basés sur les séquences issues de communautés de foraminifères reflètent assez bien l'état écologique d'un milieu marin. Bien que des développements soient encore nécessaires, ce type d'approche offre des perspectives prometteuses pour estimer l'état écologique ou déceler des impacts anthropiques en milieux aquatiques, en particulier ceux où la bioindication est encore impossible.

## 4. Références

Andruszkiewicz Allan, E., Zhang, W. G., C. Lavery, A., & F. Govindarajan, A. (2021). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 3(2), 492-514. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>

Armitage, P. D., Pinder, L. C., & Cranston, P. S. (2012). *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. Springer Science & Business Media.

Barnes, M. A., Chadderton, W. L., Jerde, C. L., Mahon, A. R., Turner, C. R., & Lodge, D. M. (2021). Environmental conditions influence eDNA particle size distribution in aquatic systems. *Environmental DNA*, 3(3), Art. 3. <https://doi.org/10.1002/edn3.160>

Beermann, A. J., Elbrecht, V., Karnatz, S., Ma, L., Matthaei, C. D., Piggott, J. J., & Leese, F. (2018). Multiple-stressor effects on stream macroinvertebrate communities: A mesocosm experiment manipulating salinity, fine sediment and flow velocity. *Science of The Total Environment*, 610-611, 961-971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.084>

Bertazzo, S., Zambuzzi, W. F., Campos, D. D. P., Ogeda, T. L., Ferreira, C. V., & Bertran, C. A. (2010). Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78(2), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.02.027>

Blackman, R. C., Mächler, E., Altermatt, F., Arnold, A., Beja, P., Boets, P., Egeter, B., Elbrecht, V., Filipe, A. F., Jones, J. I., Macher, J., Majaneva, M., Martins, F. M. S., Murria, C., Meissner, K., Pawlowski, J., Schmidt Yanez, P. L., Zizka, V. M. A., Leese, F., ... Deiner, K. (2019). Advancing the use of molecular methods for routine freshwater macroinvertebrate biomonitoring – the need for calibration experiments. *Metabarcoding and Metagenomics*, 3, 49-57. <https://doi.org/10.3897/mbmg.3.34735>

Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2017). Is the detection of aquatic environmental DNA influenced by substrate type? *PLOS ONE*, 12(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183371>

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*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-45>

Cordier, T., Lanzén, A., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Stoeck, T., & Pawlowski, J. (2019). Embracing Environmental Genomics and Machine Learning for Routine Biomonitoring. *Trends in Microbiology*, *27*(5), 387-397. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.012>

Deiner, K., & Altermatt, F. (2014). Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE*, *9*(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>

Deiner, K., Fronhofer, E. A., Mächler, E., Walser, J.-C., & Altermatt, F. (2016). Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature Communications*, *7*(1), 12544. <https://doi.org/10.1038/ncomms12544>

Ducheyne, P., & Qiu, Q. (1999). Bioactive ceramics: The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, *20*(23), 2287-2303. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00181-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00181-7)

Elbrecht, V., & Leese, F. (2015). Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass—Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol. *PLOS ONE*, *10*(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130324>

Elbrecht, V., Peinert, B., & Leese, F. (2017). Sorting things out: Assessing effects of unequal specimen biomass on DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution*, *7*(17), 6918-6926. <https://doi.org/10.1002/ece3.3192>

Ferrington, L. C. (2008). Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. In E. V. Balian, C. Lévêque, H. Segers, & K. Martens (Éds.), *Freshwater Animal Diversity Assessment* (p. 447-455). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7\\_45](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7_45)

Fremier, A. K., Strickler, K. M., Parzych, J., Powers, S., & Goldberg, C. S. (2019). Stream Transport and Retention of Environmental DNA Pulse Releases in Relation to

Hydrogeomorphic Scaling Factors. *Environmental Science & Technology*, 53(12), Art. 12. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06829>

Iwamoto, T., Hieda, Y., & Kogai, Y. (2016). Effect of hydroxyapatite surface morphology on cell adhesion. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 1263-1267. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.056>

Jane, S. F., Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Schwartz, M. K., Lowe, W. H., Letcher, B. H., & Whiteley, A. R. (2015). Distance, flow and PCR inhibition : EDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12285>

Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA : EDNA surveillance of rare aquatic species. *Conservation Letters*, 4(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x>

Jerde, C. L., Olds, B. P., Shogren, A. J., Andruszkiewicz, E. A., Mahon, A. R., Bolster, D., & Tank, J. L. (2016). Influence of Stream Bottom Substrate on Retention and Transport of Vertebrate Environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 50(16), Art. 16. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01761>

Jo, T., Arimoto, M., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019). Particle Size Distribution of Environmental DNA from the Nuclei of Marine Fish. *Environmental Science & Technology*, 53(16), Art. 16. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02833>

Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., Sakata, M. K., Yamamoto, S., & Minamoto, T. (2017). Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), Art. 6. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12685>

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. <https://doi.org/10.1111/mec.16364>

Keck, F., Vasselon, V., Tapolczai, K., Rimet, F., & Bouchez, A. (2017). Freshwater biomonitoring in the Information Age. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15(5), 266-274. <https://doi.org/10.1002/fee.1490>

Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Humbert, J. F., & Bouchez, A. (2013). Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities : A test for freshwater diatoms. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 607-619. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12105>

Lacoursière-Roussel, A., Côté, G., Leclerc, V., & Bernatchez, L. (2016). Quantifying relative fish abundance with eDNA : A promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*, 53(4), 1148-1157. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12598>

Laporte, M., Bougas, B., Côté, G., Champoux, O., Paradis, Y., Morin, J., & Bernatchez, L. (2020). Caged fish experiment and hydrodynamic bidimensional modeling highlight the importance to consider 2D dispersion in fluvial environmental DNA studies. *Environmental DNA*, 2(3), 362-372. <https://doi.org/10.1002/edn3.88>

Moushomi, R., Wilgar, G., Carvalho, G., Creer, S., & Seymour, M. (2019). Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of *Daphnia magna* mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. *Scientific Reports*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48984-7>

Nicacio, G., & Juen, L. (2015). Chironomids as indicators in freshwater ecosystems : An assessment of the literature. *Insect Conservation and Diversity*, 8(5), 393-403. <https://doi.org/10.1111/icad.12123>

Nukazawa, K., Hamasuna, Y., & Suzuki, Y. (2018). Simulating the Advection and Degradation of the Environmental DNA of Common Carp along a River. *Environmental Science & Technology*, 52(18), 10562-10570. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02293>

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., ... 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.002>

Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Gough, K. C. (2014). REVIEW : The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), Art. 5. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>

Rivera, S. F., Rimet, F., Vasselon, V., Vautier, M., Domaizon, I., & Bouchez, A. (2022). Fish eDNA metabarcoding from aquatic biofilm samples: Methodological aspects. *Molecular Ecology Resources*, 22(4), 1440-1453. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13568>

Sansom, B. J., & Sassoubre, L. M. (2017). Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates to Model Freshwater Mussel eDNA Transport in a River. *Environmental Science & Technology*, 51(24), Art. 24. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05199>

Shaw, J. L. A., Clarke, L. J., Wedderburn, S. D., Barnes, T. C., Weyrich, L. S., & Cooper, A. (2016). Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation*, 197, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.03.010>

Shogren, A. J., Tank, J. L., Andruszkiewicz, E., Olds, B., Mahon, A. R., Jerde, C. L., & Bolster, D. (2017). Controls on eDNA movement in streams : Transport, Retention, and Resuspension. *Scientific Reports*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05223-1>

Shogren, A. J., Tank, J. L., Egan, S. P., Bolster, D., & Riis, T. (2019). Riverine distribution of mussel environmental DNA reflects a balance among density, transport, and removal processes. *Freshwater Biology*, 64(8), 1467-1479. <https://doi.org/10.1111/fwb.13319>

Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206>

Vasselon, V., Rimet, F., Tapolczai, K., & Bouchez, A. (2017). Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France). *Ecological Indicators*, 82, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.024>



Yates, M. C., Fraser, D. J., & Derry, A. M. (2019). Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature. *Environmental DNA*, 1(1), 5-13. <https://doi.org/10.1002/edn3.7>

## 5. Articles annexe III

Florian MALARD<sup>1</sup>,  
Héloïse VERDIER<sup>1</sup>,  
Lara KONECNY-DUPRÉ<sup>1</sup>,  
David EME<sup>2-3</sup>,  
Christophe J. DOUADY<sup>1</sup>  
et Tristan LEFÉBURE<sup>1</sup>

(1) Université Claude Bernard Lyon 1,  
CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA,  
F-69622, Villeurbanne, France

(2) IFREMER Centre Atlantique,  
Unité Écologie et Modèles pour  
l'Haliéutique, rue de l'Île d'Yeu,  
Nantes, 44980, France

(3) RiverLY Research Unit, National  
Research Institute for Agriculture  
Food and Environment (INRAE),  
Villeurbanne, France

# Subterranean species inventory in the molecular era

## Inventaire des espèces souterraines dans l'ère moléculaire

**ABSTRACT:** Since the first discoveries in the 1860s of subterranean organisms in France, there has been a sustained effort in sampling and identifying subterranean species. Yet, the species inventory is still largely incomplete. Since the nineties, breakthrough in molecular methods has revolutionized concepts and practices guiding species inventory. Here, we provide a brief overview of how molecular methods have changed ways of delimiting, identifying and sampling species. Within the framework of integrative taxonomy, species taxa are now routinely delimited both on morphological and molecular grounds. Molecular delimitation methods often provide many more taxa with smaller range size than morphology. Species molecular inventory has simultaneously shifted from the sampling of specimens to that of environmental DNA (eDNA) and from the identification of a single organism (i.e. barcoding) to the simultaneous identification of a whole community (i.e. metabarcoding). Yet, there are still a number of challenges to be addressed for eDNA and metabarcoding to be applied routinely to the inventory of subterranean biodiversity.

**KEYWORDS:** biodiversity, subterranean fauna, integrative taxonomy, DNA taxonomy, DNA barcoding, metabarcoding, environmental DNA.

**RÉSUMÉ :** Depuis les premières découvertes dans les années 1860 d'organismes souterrains en France, l'effort d'échantillonnage et d'identification des espèces souterraines est resté soutenu. Pourtant, l'inventaire des espèces est encore largement incomplet. Depuis les années 1990, la percée des méthodes moléculaires a révolutionné les concepts et les pratiques guidant l'inventaire des espèces. Ici, nous expliquons comment les méthodes moléculaires ont changé la façon de délimiter, d'identifier et d'échantillonner les espèces. Dans le cadre de la taxinomie intégrative, les espèces sont désormais délimitées à la fois sur des bases morphologiques et moléculaires. Les méthodes de délimitation moléculaire fournissent souvent beaucoup plus de taxons avec des aires de distribution plus restreintes que la morphologie. L'inventaire moléculaire des espèces est simultanément passé de l'échantillonnage des spécimens à celui de l'ADN environnemental (ADNe) et de l'identification d'un seul organisme (barcoding) à l'identification en masse de toute une communauté (metabarcoding). Toutefois, il existe encore un certain nombre de défis à relever pour que l'ADN environnemental et le metabarcoding soient appliqués en routine à l'inventaire de la biodiversité souterraine.

**MOTS-CLÉS :** biodiversité, faune souterraine, taxinomie intégrative, taxinomie moléculaire, identification moléculaire, barcoding moléculaire, ADN environnemental/

### Species inventory: a long tradition

In France, the first discoveries of subterranean organisms date back to the 1860s [Ferreira *et al.*, 2003; bibliographic synthesis in Ferreira, 2005]. Since then, sustained efforts have been made to sample and identify subterranean species, both aquatic [Gibert and Culver, 2009; Zagamajster *et al.*, 2014] and terrestrial [Juberthie and Ginet, 1994; Faille, 2006; Mammola *et al.*, 2019a]. Yet, the species inventory is still largely incomplete. Among the groundwater fauna, crustaceans have received much research attention because of their high diversity. The number of groundwater crustacean species in Europe exceeds that of surface-dwelling crustacean species [Stoch and Galassi, 2010]. A total of 247 described species and subspecies of groundwater crustacean species are known for France and 48 await description: species occurrences are more numerous in Southern and Eastern France but this distributional pattern partly reflects a sampling bias linked to the geographical location of research laboratories

### Inventaire des espèces : une longue tradition

En France, les premières découvertes d'organismes souterrains remontent aux années 1860 [Ferreira *et al.*, 2003 ; synthèse bibliographique dans Ferreira, 2005]. Depuis, des efforts soutenus ont été déployés pour échantillonner et identifier les espèces souterraines tant aquatiques [Gibert et Culver, 2009 ; Zagamajster *et al.*, 2014] que terrestres [Juberthie et Ginet, 1994 ; Faille, 2006 ; Mammola *et al.*, 2019a]. Pourtant, l'inventaire des espèces est encore largement incomplet. Parmi la faune aquatique, les crustacés souterrains ont beaucoup retenu l'attention des chercheurs en raison de leur grande diversité. Le nombre d'espèces de crustacés souterrains en Europe dépasse celui des espèces de crustacés vivant en surface [Stoch et Galassi, 2010]. Au total, 247 espèces et sous-espèces de crustacés souterrains sont connues en France et au moins 48 attendent d'être décrites. Les occurrences d'espèces sont plus nombreuses dans le Sud et l'Est de la France mais cette

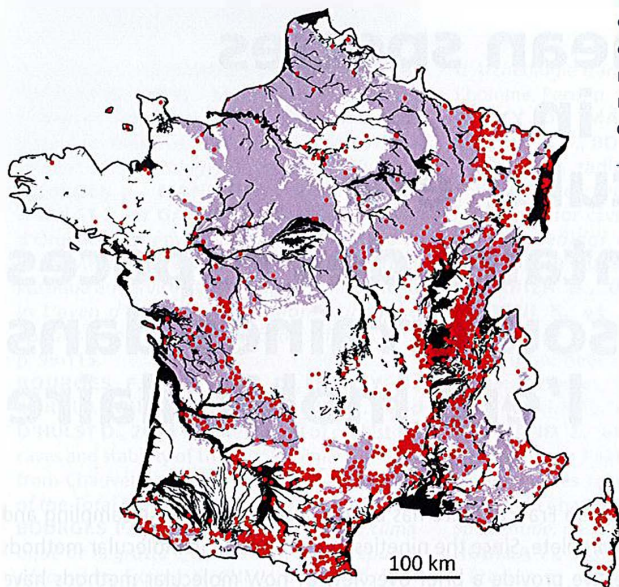


Figure 1 : Occurrence records (red dots, n=5311) of obligate groundwater crustacean species (n=295) in France. Black and purple patterns show quaternary deposits and karsts, respectively. Occurrences (points rouges, n=5311) d'espèces de crustacés souterrains (n=295) en France. Les trames noires et violettes représentent respectivement des dépôts quaternaires et des roches karstiques.

(figure 1). Since the nineties, breakthrough in molecular methods has revolutionized concepts and practices guiding species inventory.

### I. DNA taxonomy: species concept and delimitation of species taxa

We refer to DNA taxonomy as the delimitation and/or description of species using molecular methods. To understand the contribution of molecular methods to taxonomic thought, let's start by distinguishing between two separate meanings of the word "species": a concept and a taxon [de Queiroz, 2007]. The species concept accepted by most biologists treats species as evolutionary entities which are temporally delimited by speciation events. Species taxa – for example the amphipod *Niphargus rhenorhodanensis* – are hypotheses of the evolutionary entities emerging during speciation. They are used by biologists as operational taxonomic units (OTU) to quantify biodiversity. To make these hypotheses, biologists use many different criteria – among which morphological and molecular criteria – which evolve differently during speciation (figure 2). In literature, species hypotheses based on molecular criteria are often called OTU (or MOTU for molecular operational taxonomic units). However, note, that species hypotheses based on morphological criteria are also OTUs. Much of the debate around the "species problem" arose from the fact that numerous criteria were unnecessarily used to formulate multiple definitions or concepts of the species [de Queiroz, 1998; Hey, 2006]. Not surprisingly, hypotheses may differ depending on the criteria used: these hypotheses are iteratively tested in a process called "integrative taxonomy" [Yeates et al., 2011]. That process has provided newspecies databases in which individual specimens can be assigned to different species taxa according to different criteria (figure 2). A key feature of such databases is that each morphologically distinguishable species taxon can be associated to one or several DNA barcodes - a section of a DNA sequence from a specific gene. The DNA barcodes can

répartition traduit en partie un biais d'échantillonnage lié à la localisation géographique des laboratoires de recherche (figure 1). Depuis les années 1990, la percée des méthodes moléculaires a révolutionné les concepts et les pratiques guidant l'inventaire des espèces.

### I. Taxinomie moléculaire : concept d'espèce et délimitation des taxons

Nous considérons ici que la taxinomie moléculaire correspond à la délimitation et / ou à la description d'espèces à l'aide de méthodes moléculaires. Pour comprendre la contribution des méthodes moléculaires à la taxinomie, commençons par distinguer deux sens distincts du mot « espèce » : un concept et un taxon [de Queiroz, 2007]. Le concept d'espèce retenu par la grande majorité des biologistes traite les espèces comme des entités évolutives qui sont temporellement délimitées par des événements de spéciation. Les taxons – par exemple l'amphipode *Niphargus rhenorhodanensis* – sont des hypothèses d'entités évolutives émergeant au cours de la spéciation. Ils sont utilisés par les biologistes comme des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) pour quantifier la biodiversité. Pour réaliser ces hypothèses, les biologistes utilisent de nombreux critères – parmi lesquels des critères morphologiques et moléculaires – qui évoluent différemment au cours de la spéciation (figure 2). Dans la littérature, les hypothèses d'espèces réalisées sur la base de critères moléculaires sont souvent appelées OTU (ou MOTU pour *molecular operational taxonomic units*). Soulignons toutefois que les hypothèses d'espèces réalisées sur la base de critères morphologiques sont aussi des OTUs. Les débats sur ce qui a longtemps été nommé « le problème de l'espèce » sont nés du fait que ces nombreux critères ont eux-mêmes été utilisés, sans réelle nécessité, pour formuler de multiples définitions ou concepts de l'espèce [de Queiroz, 1998 ; Hey, 2006]. Ainsi, les hypothèses peuvent différer selon les critères utilisés : elles sont testées de manière itérative selon une méthode appelée « taxinomie intégrative » [Yeates et al., 2011]. Cette méthode fournit des bases de données d'un nouveau genre dans lesquelles les individus peuvent être attribués à différents taxons en fonction des critères utilisés (figure 2). Une caractéristique clé de ces bases de données est que chaque taxon morphologiquement distinct peut être associé à un ou plusieurs code(s) – barre(s) ADN – une partie d'une séquence d'ADN d'un gène spécifique. Ces codes-barres peuvent ensuite être utilisés pour identifier ce taxon s'il est à nouveau collecté dans l'environnement (voir section III ci-dessous).

Les méthodes de délimitation moléculaire sont maintenant couramment utilisées pour délimiter les espèces souterraines aquatiques et terrestres [Faille et al., 2015 ; Eme et al., 2018 ; Parimuchova et al., 2020]. Eme et al. [2018] ont utilisé 2205 séquences du gène cytochrome

be used, afterwards, to identify the taxon if it is collected once again (see section III below).

Molecular delimitation methods are now commonly used to delimit aquatic and terrestrial subterranean species [Faille et al., 2015; Eme et al., 2018; Parimuchova et al., 2020]. Eme et al. [2018] used 2205 sequences of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene to delimit species of obligate groundwater Aselloidea (Isopoda) and Niphargidae (Amphipoda) from Europe. These sequences came from 1075 sampling sites and collectively represented 263 morphologically distinguishable species (figure 3A). As is often the case, the authors found that molecular delimitation provided many more species hypotheses (OTUs) – in their study, 2.5 times as many - than morphological delimitation. Both delimitations revealed a ridge of high species richness at latitudes ranging from ca 42° to 46°N, although the ridge was more pronounced when using molecular delimitation (figure 3 B&C). Moreover, the increase in range size of species at higher latitudes was stronger using COI-based species (figure 3 D&E).

## II. An extending panel of molecular approaches and tools

DNA barcoding - defined herein as the molecular identification of individuals of already known species - has transformed the way species are identified and inventoried [Hebert et al., 2003] (figure 2). In subterranean environments, barcoding provided important information on many species for which morphological analysis was uninformative or ambiguous [Zagmajster et al., 2021]. Since 2010, the emergence of new molecular technologies has extended barcoding in two ways: 1) a shift from specimens sampling to environmental samples (i.e. environmental DNA) and 2) a shift from the identification of a single

oxydase I (COI) pour délimiter les espèces souterraines d'Aselloidea (Isopoda) et de Niphargidae (Amphipoda) en Europe. Ces séquences provenaient de 1075 stations d'échantillonnage et représentaient collectivement 263 espèces morphologiquement distinctes (figure 3A). Comme souvent, les auteurs ont constaté que la délimitation moléculaire fournissait plus d'hypothèses d'espèces (OTU) – dans leur étude 2,5 fois plus – que la délimitation morphologique. Les deux délimitations ont révélé une crête de plus forte richesse en espèces à des latitudes s'étendant de 42° à 46° N. Toutefois, cette crête est plus clairement révélée par la délimitation moléculaire (figure 3 B&C). De plus, l'augmentation de la taille de l'aire de répartition des espèces avec la latitude apparaît aussi plus clairement avec les méthodes de délimitation moléculaire (figure 3 D&E).

## II. Un panel étendu d'approches et d'outils moléculaires

Le barcoding – défini ici comme l'identification moléculaire d'individus d'espèces déjà connues – a transformé la façon dont les espèces sont identifiées et inventoriées [Hebert et al., 2003] (figure 2). En milieu souterrain, le barcoding a fourni des informations importantes sur de nombreuses espèces pour lesquelles l'analyse morphologique était non informative ou ambiguë [Zagmajster et al., 2022]. Depuis 2010, l'émergence de nouvelles technologies moléculaires a étendu le barcoding de deux manières: 1) un passage de l'échantillonnage de spécimens à des échantillons environnementaux (l'ADN environnemental) et 2) un passage de l'identification d'un seul organisme (barcoding) à l'identification de toute une communauté (métabarcoding) (figure 2). L'ADN environnemental (ADNe) – défini comme le matériel génétique obtenu directement à partir d'échantillons environnementaux (par exemple de l'eau, du

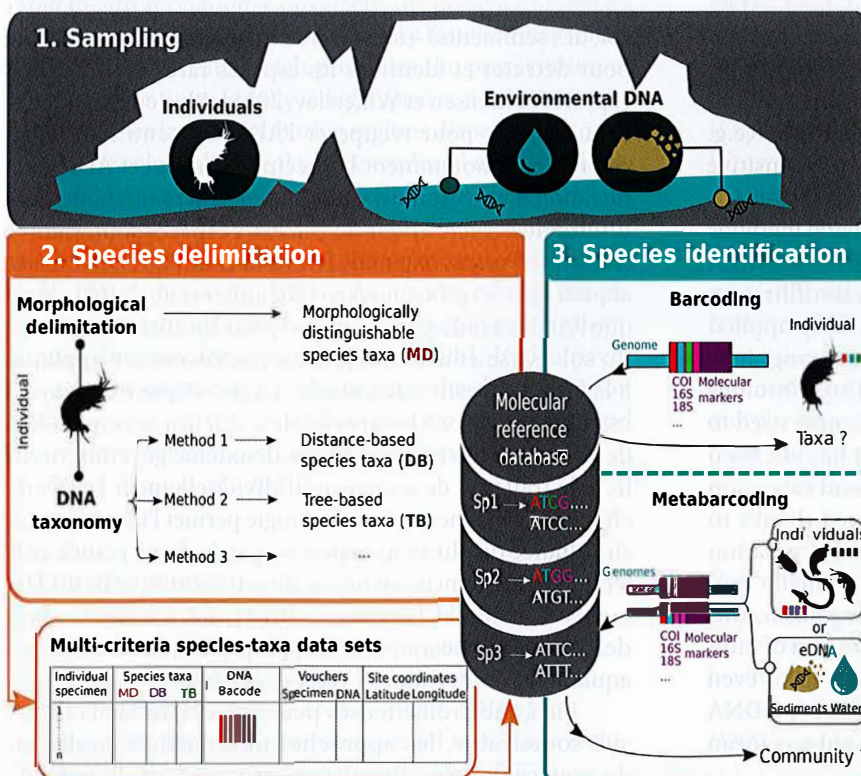


Figure 2 : Inventory of Subterranean biodiversity. 1. Sampling of specimens and environmental DNA from water and / or sediment. 2. Delimitation of species taxa (or species hypotheses, or operational taxonomic units, OTU) using morphological and molecular criteria and generation of molecular reference databases. Molecular species delimitation methods include distance-based (DB) and tree-based (TB) methods, for example [see review in Flot, 2015]. 3. Molecular species identification. Identification can be made from specimens or environmental DNA and can be performed on a single organism (barcoding) or multiple organisms (metabarcoding). Inventaire de la biodiversité souterraine. 1. Échantillonnage de spécimens et/ou de l'ADN environnemental dans l'eau ou les sédiments. 2. Délimitation des espèces (ou hypothèses d'espèces ou unités taxonomiques opérationnelles, OTU) à partir de critères morphologiques et moléculaires et génération des bases de données moléculaires de référence. 3. Identification moléculaire des espèces. L'identification a lieu à partir de spécimens ou d'ADN environnemental et elle cible un (barcoding) ou plusieurs (metabarcoding) taxon(s).

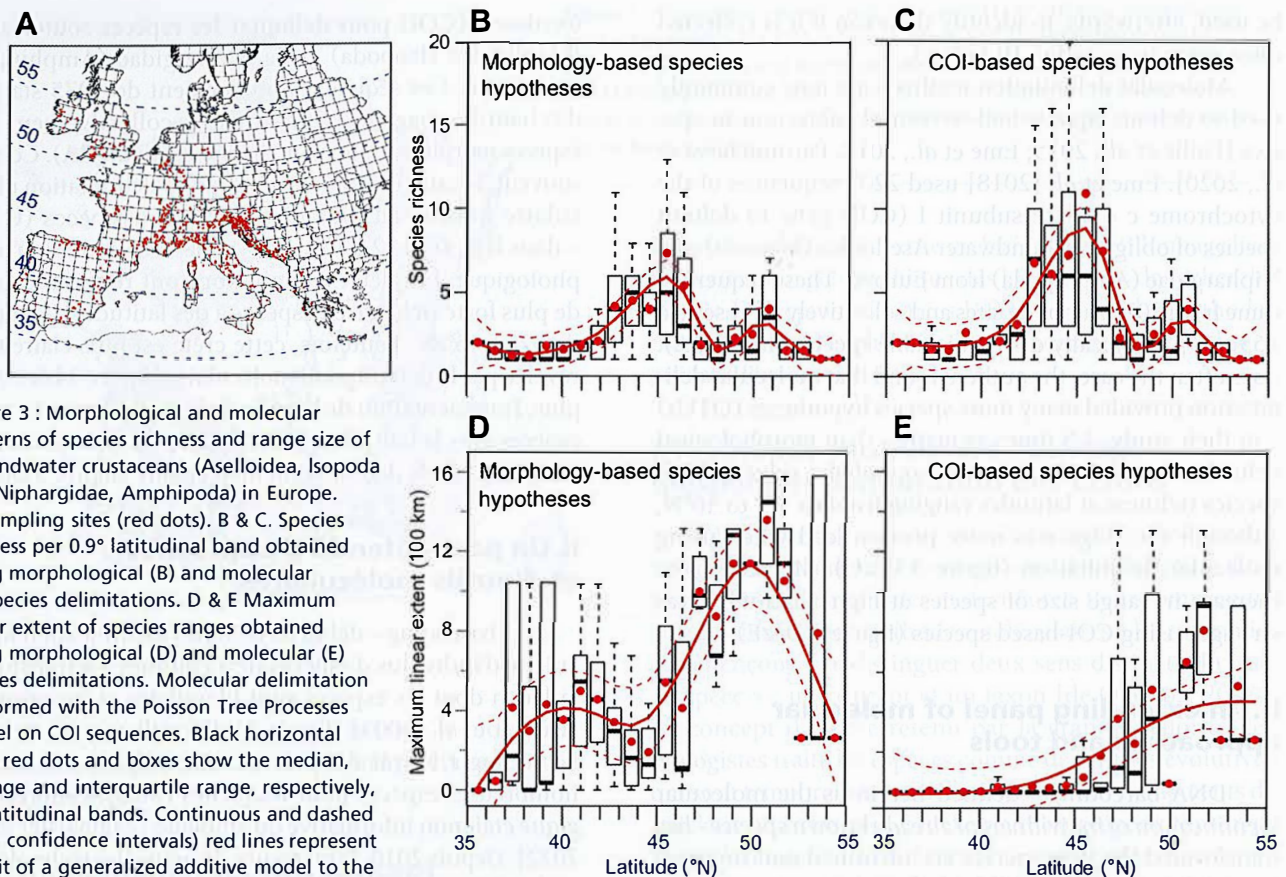


Figure 3 : Morphological and molecular patterns of species richness and range size of groundwater crustaceans (Aselloidea, Isopoda and Niphargidae, Amphipoda) in Europe. A. Sampling sites (red dots). B & C. Species richness per 0.9° latitudinal band obtained using morphological (B) and molecular (C) species delimitations. D & E Maximum linear extent of species ranges obtained using morphological (D) and molecular (E) species delimitations. Molecular delimitation performed with the Poisson Tree Processes model on COI sequences. Black horizontal bars, red dots and boxes show the median, average and interquartile range, respectively, for latitudinal bands. Continuous and dashed (95% confidence intervals) red lines represent the fit of a generalized additive model to the averages of latitudinal bands. Modified from Eme *et al.* [2018].

Approches morphologique et moléculaire de la richesse et de l'étendue des aires de distribution des crustacés aquatiques souterrains (Aselloidea, Isopoda et Niphargidae, Amphipoda) en Europe. A. Stations d'échantillonnage (points rouges) des crustacés en Europe. B & C. Richesses spécifiques des crustacés par bande latitudinale de 0,9° obtenues par délimitations morphologiques (B) et moléculaire (C) des espèces. D & E. Étendues maximales de l'aire de distribution des crustacés obtenues par délimitations morphologique (D) et moléculaire (E) des espèces. La délimitation moléculaire est effectuée par la méthode du PTP (Poisson tree processes model) sur des séquences du gène COI. Les barres horizontales noires, les points rouges et les boîtes indiquent respectivement la médiane, la moyenne et l'intervalle interquartile pour les bandes latitudinales. Les lignes rouges continues et en pointillé (intervalles de confiance à 95 %) représentent l'ajustement d'un modèle additif généralisé aux moyennes des bandes latitudinales. Modifiée d'après Eme *et al.* [2018].

organism (i.e. barcoding) to the simultaneous identification of a whole community (i.e. metabarcoding) (figure 2). Environmental DNA (i.e. eDNA) - defined as genetic material obtained directly from environmental samples (e.g. water, soil, sediment, etc.) - has proved to be a sensitive approach to detect and identify rare and hard-to-catch species [Thomsen and Willerslev, 2015]. Several methods are used to collect eDNA from water samples, among which the ethanol precipitation method and the water filtration method. Water filtration, has been successfully applied to detect subterranean species such as *Proteus anguinus* [Goricki *et al.*, 2017; Vörös *et al.*, 2017] and *Stygobromus hayi* [Niemiller *et al.*, 2018]. While eDNA is now used to inventorize soil fauna [Kirse *et al.*, 2021], it has not been applied to terrestrial cave fauna yet. The second extension - from barcoding to metabarcoding - emerged thanks to the capacity of parallel sequencing in second generation high-throughput sequencers. Instead of individually processing and sequencing the DNA of each organism, this technology allows the simultaneous identification of multiple species from a large collection of specimens or even directly from environmental DNA [Critescu 2014]. eDNA metabarcoding has recently been applied to subterranean aquatic communities [West *et al.*, 2020].

sol, des sédiments) – s'est avéré être une approche sensible pour détecter et identifier les espèces rares et difficiles à capturer [Thomsen et Willerslev, 2015]. Plusieurs méthodes sont utilisées pour récupérer l'ADN contenu dans l'eau des milieux, notamment la précipitation de cet ADN et la filtration d'un volume d'eau. Cette dernière méthode a été utilisée avec succès pour détecter des espèces souterraines telles que *Proteus anguinus* [Goricki *et al.*, 2017; Vörös *et al.*, 2017] et *Stygobromus hayi* [Niemiller *et al.*, 2018]. Alors que l'ADNe est désormais utilisé pour inventorier la faune du sol [Kirse *et al.*, 2021], il n'a pas encore été appliqué à la faune terrestre cavernicole. La deuxième extension – est apparue grâce à la capacité de séquençage en parallèle des séquenceurs à haut débit de deuxième génération. Au lieu de traiter et de séquencer individuellement l'ADN de chaque organisme, cette technologie permet l'identification simultanée de plusieurs espèces à partir d'une grande collection de spécimens ou même directement à partir d'ADN environnemental [Critescu, 2014]. Le metabarcoding de l'ADNe a récemment été appliqué aux communautés aquatiques souterraines [West *et al.*, 2020].

Bien que prometteuses pour l'inventaire de la diversité souterraine, les approches moléculaires soulèvent de nouveaux défis. Premièrement en raison de la faible

Although promising for the inventory of subterranean diversity, these new molecular approaches raise new challenges. First, most approaches developed for surface habitat may turn out to be unsuitable to sample subterranean eDNA. For example, due to the low density of organisms in subterranean habitats, eDNA is likely to be in very low concentration, requiring much larger volumes of environmental samples, whose collection may happen to be unfeasible in many situations. Second, one crucial element of a molecular identification analysis is the comprehensiveness of the reference database (figure 2). With many species or, even worse, entire groups not referenced, the identification will fail. Another pernicious effect of the lack of molecular reference data for many subterranean groups is that molecular methods are likely to be biased when applied to poorly known groups. Once collected, eDNA are extracted and then barcodes are amplified before being sequenced in parallel. At each step of the process, but particularly at the amplification one, protocols are by definition not optimized for poorly known groups. Therefore, the discovery of the latter may decrease and their mischaracterization be emphasized.

### III. Beyond species inventory

Molecular approaches also foster the understanding of processes causing geographic variation in species richness. The number of species in a region ultimately depends on three processes: speciation, extinction and dispersal. Phylogenetic inferences made from DNA sequences on the evolutionary relationships among species can, for example, help to disentangle the relative influence of the three processes in shaping the European ridge of high subterranean species richness (see figure 3) [Zagmajster et al., 2018]. The occurrence within that ridge of many short-branch closely-related species may reflect a process of recent and rapid in-situ speciation. Conversely, the presence of species showing long independent evolutionary histories may reflect a low extinction rate which promotes the preservation of diversity over time. Finally, a high species richness may be due to species from neighboring regions dispersing into the ridge. The role of dispersal can be explored using methods such as the decomposition of phylobetadiversity indices [Leprieur et al., 2012] and Bayesian phylogeographic diffusion models [Eme et al., 2013]. The growing availability of molecular datasets over large spatial scales offers a unique opportunity to understand spatial variation in subterranean species diversity [Mammola et al., 2019b]. It also paves the way for exploring factors causing the diversification [Ribera et al., 2010], as well as the morphological and molecular evolution of subterranean species [Saclier et al., 2020; Fiser et al., 2019].

#### Acknowledgments

We thank all the people, including many speleologists, who contribute to subterranean biodiversity inventory. Our acknowledgement goes to the French National Research Agency and EUR H2O'Lyons (ANR-17-EURE-0018) for their financial support. We are also grateful to A. Faille and R. Centelles Bascuas for revising an early draft of that paper.

densité d'organismes dans les habitats souterrains, l'ADNe est susceptible d'être présent en très faible concentration. Ce qui nécessitera la collecte de volumes d'échantillons environnementaux très importants. Deuxièmement, l'élément clé d'une approche d'identification moléculaire est l'exhaustivité de la base de données de référence (figure 2). Lorsque de nombreuses espèces, voire même des groupes entiers, ne sont pas référencés, l'identification peut échouer. Le manque de données moléculaires de référence pour de nombreux groupes souterrains peut également biaiser les méthodes moléculaires. Une fois collectés, les ADNe sont extraits, puis les barcodes sont amplifiés avant d'être séquencés en parallèle. À toutes ces étapes, mais particulièrement au niveau de l'amplification, les protocoles ne sont, par définition, pas optimisés pour les groupes peu connus, ce qui peut diminuer leur découverte et accentuer leur mauvaise caractérisation.

### III. Au-delà de l'inventaire des espèces

Les approches moléculaires permettent également de mieux appréhender les causes des variations géographiques du nombre d'espèces. Le nombre d'espèces dans une région dépend en fin de compte de trois processus : la spéciation, l'extinction et la dispersion. Les inférences phylogénétiques réalisées à partir des séquences d'ADN sur les relations de parenté entre les espèces permettent de démêler l'influence relative de ces trois processus sur la crête de forte richesse en espèces observée en Europe (voir figure 3) [Zagmajster et al., 2018]. Sur les arbres phylogénétiques, la présence à l'intérieur de cette crête de nombreuses espèces « jeunes » et étroitement apparentées peut refléter une forte spéciation *in situ*. Inversement, la présence d'espèces présentant de longues histoires évolutives indépendantes peut refléter un faible taux d'extinction qui favorise la préservation de la diversité au cours du temps. Enfin, une richesse spécifique élevée peut aussi provenir de la dispersion au sein de la crête d'espèces en provenance des régions voisines. Le rôle de la dispersion peut être exploré à l'aide de méthodes telles que la décomposition des indices de phylobétadiversité [Leprieur et al., 2012] et des modèles bayésiens de diffusion [Eme et al., 2013]. La disponibilité croissante de données moléculaires à de grandes échelles spatiales offre une occasion unique de comprendre les causes des variations régionales de la diversité des espèces souterraines [Mammola et al., 2019b]. Elle ouvre aussi de nombreuses possibilités comme celles de dater plus précisément les événements de diversification en milieu souterrain [Ribera et al., 2010] et de comprendre les mécanismes à l'origine de l'évolution morphologique et moléculaire en milieu souterrain [Saclier et al., 2020 ; Fiser et al., 2019].

#### Remerciements

Nous remercions tous les collecteurs, parmi lesquels de nombreux spéléologues, qui contribuent à l'inventaire de la biodiversité souterraine. Cette étude a bénéficié du soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche et de l'EUR H2O'Lyons (ANR-17-EURE-0018). Nous remercions A. Faille et R. Centelles Bascuas pour la révision de cet article.

- CRISTESCU M. E., 2014** - From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in ecology & evolution*, 29, 566-571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>
- DE QUEIROZ K., 1998** - The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation and terminological recommendations. pp. 57-75, in D. J. Howard and S. H. Berlocher (Eds.), *Endless forms: Species and speciation*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- DE QUEIROZ K., 2007** - Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879-886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- EME D., MALARD F., KONECNY-DUPRÉ L., LEFÉBURE T. & DOUADY C. J., 2013** - Bayesian phylogeographic inferences reveal contrasting colonization dynamics among European groundwater isopods. *Molecular Ecology*, 22, 5685-5699. <https://doi.org/10.1111/mec.12520>
- EME D., ZAGMAJSTER M., DELIĆ T., FIŠER C., FLOT J.-F., KONECNY-DUPRÉ L., PÁLSSON S., STOCH F., ZAKŠEK V., DOUADY C. J. & MALARD F., 2018** - Do cryptic species matter in macroecology? Sequencing European groundwater crustaceans yields smaller ranges but does not challenge biodiversity determinants. *Ecography*, 41, 424-436. <https://doi.org/10.1111/ecog.02683>
- FAILLE A., 2006** - *Endémisme et adaptation à la vie cavernicole chez les Trechinae pyrénéens (Coleoptera : Caraboidea) : approches moléculaire et morphométrique*. PhD Thesis, Muséum national d'histoire naturelle, Paris.
- FAILLE A., TÄNZLERR. & TOUSSAINT E. F. A., 2015** - On the way to speciation: shedding light on the karstic phylogeography of the microendemic cave beetle *Aphaenops cerberus* in the Pyrenees. *Journal of Heredity*, 106, 692-699. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv078>
- FERREIRA D., 2005** - *Biodiversité aquatique souterraine de France: base de données, patrons de distribution et implications en termes de conservation*. PhD thesis, University Lyon 1, Lyon.
- FERREIRA D., DOLE-OLIVIER M.-J., MALARD F., DEHARVENG L. & GIBERT J., 2003** - Faune aquatique souterraine de France: base de données et éléments de biogéographie. *Karstologia*, 42(2), 15-22. [https://www.persee.fr/doc/karst\\_0751-7688\\_2003\\_num\\_42\\_1\\_2528](https://www.persee.fr/doc/karst_0751-7688_2003_num_42_1_2528)
- FIŠER C., DELIĆ T., LUŠTRIK R., ZAGMAJSTER M. & ALTERMATT F., 2019** - Niches within a niche: Ecological differentiation of subterranean amphipods across Europe's interstitial waters. *Ecography*, 42, 1212-1223. <https://doi.org/10.1111/ecog.03983>
- GIBERT J. & CULVER D. C., 2009** - Assessing and conserving groundwater biodiversity: An introduction. *Freshwater Biology*, 54, 639-648. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02202.x>
- GORIČKI Š., STANKOVIĆ D., SNOJ A., KUNTNER M., JEFFERY W. R., TRONTELJ P., ... & ALJANČIĆ G. 2017** - Environmental DNA in subterranean biology: range extension and taxonomic implications for *Proteus*. *Scientific reports*, 7, 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep45054>
- HEBERT P. D., RATNASINGHAM S. & DE WAARD J. R., 2003** - Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- HEY J., 2006** - On the failure of modern species concepts. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 447-450. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.05.011>
- JUBERTHIE C. & GINET R., 1994** - France. pp. 665-692, in C. Jubertihie and V. Decu (eds.), *Encyclopaedia Biospeologica*, Société de Biospéologie, Moulis, France.
- KIRSE A., BOURLAT S. J., LANGEN K. & FONSECA V.G., 2021** - Unearthing the potential of soil eDNA metabarcoding - Towards best practice advice for invertebrate biodiversity assessment. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9:630560. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.630560>
- LEPRIEUR F., ALBOUY C., DE BORTOLI J., COWMAN P. F., BELLWOOD D. R. & MOUILLOT D., 2012** - Quantifying phylogenetic beta diversity: distinguishing between 'true' turnover of lineages and phylogenetic diversity gradients. *PLoS ONE*, 7, e42760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042760>
- MAMMOLA S., CARDOSO P., ANGYAL D., BALÁZS G., BLICK T., BRUSTEL H., CARTER J., ĆURČIĆ S., DANFLOUS S., DÁNYI L., DÉJEAN S., DELTSHEV C., ELVERICI M., FERNÁNDEZ J., GASPARO F., KOMNENOV M., KOMPOSCH C., KOVÁČ L., KUNT K. B., MOCK A., MOLDOVAN O., NAUMOVA M., PAVLEK M., PRIETO C. E., RIBERA C., ROZWAŁKA R., RŪŽIČKA V., VARGOVIŠH R. S., ZAENKER S. & ISAIA M., 2019a** - Continental data on cave-dwelling spider communities across Europe (Arachnida: Araneae). *Biodiversity Data Journal*, 7, e38492. <https://doi.org/10.3897/BDJ.7.e38492>
- MAMMOLA S., CARDOSO P., ANGYAL D., BALÁZS G., BLICK T., BRUSTEL H., CARTER J., ĆURČIĆ S., DANFLOUS S., DÁNYI L., DÉJEAN S., DELTSHEV C., ELVERICI M., FERNÁNDEZ J., GASPARO F., KOMNENOV M., KOMPOSCH C., KOVÁČ L., KUNT K. B., MOCK A., MOLDOVAN O., NAUMOVA M., PAVLEK M., PRIETO C. E., RIBERA C., ROZWAŁKA R., RŪŽIČKA V., VARGOVIŠH R. S., ZAENKER S. & ISAIA M., 2019b** - Local- versus broad-scale environmental drivers of continental-diversity patterns in subterranean spider communities across Europe. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 286, 20191579. <http://doi.org/10.1098/rspb.2019.1579>
- NIEMILLER M.L., PORTER M.L., KEANY J., GILBERT H., FONG D. W., CULVER D. C., HOBSON C. S., KENDALL K. D., DAVIS M. A. & TAYLOR S. J. 2018** - Evaluation of eDNA for groundwater invertebrate detection and monitoring: a case study with endangered *Stygobromus* (Amphipoda: Crangonyctidae). *Conservation Genetics Resources*, 10, 247-257. <https://doi.org/10.1007/s12686-017-0785-2>
- PARIMUCHOVA A., ZUROVCOVA M., PAPAN V. & KOVAC L., 2020** - Subterranean *Deuteraphorura* Absolon, 1901, (Hexapoda, Collembola) of the Western Carpathians-Trogglomorphism at the northern distributional limit in Europe. *PLoS ONE*, 15(1): e0226966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226966>
- RIBERA I., FRESNEDA J., BUCUR R., IZQUIERDO A., VOGLER A. P., SALGADO J. M. & CIESLAK A., 2010** - Ancient origin of a Western Mediterranean radiation of subterranean beetles. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 29 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-29>
- SACLIER N., CHARDON P., MALARD F., KONECNY-DUPRÉ L., EME D., BELLEC A., BRETON V., DURET L., LEFÉBURE T. & DOUADY C. J., 2020** - Bedrock radioactivity influences the rate and spectrum of mutation. *eLife* 2020;9:e56830 [doi: 10.7554/eLife.56830](https://doi.org/10.7554/eLife.56830)
- STOCH F. & GALASSI D. M. P., 2010** - Stygobiotic crustacean species richness: a question of numbers, a matter of scale. *Hydrobiologia*, 653, 217-234. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0356-y>
- THOMSEN P. F. & WILLERSLEV E., 2015** - Environmental DNA-An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation*, 183, 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- VÖRÖS J., MÁRTON O., SCHMIDT B. R., GÁL J. T. & JELIĆ D., 2017** - Surveying Europe's only cave-dwelling chordate species (*Proteus anguinus*) using environmental DNA. *PLoS one*, 12(1), e0170945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170945>
- WEST K. M., RICHARDS Z. T., HARVEY E. S., SUSAC R., GREALY A. & HUNCE M., 2020** - Under the karst: detecting hidden subterranean assemblages using eDNA metabarcoding in the caves of Christmas Island, Australia. *Scientific reports*, 10(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78525-6>
- YEATES D. K., SEAGO A., NELSON L., CAMERON S. L., JOSEPH L. & TRUEMAN J. W. H., 2011** - Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology*, 36, 209-217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2010.00558.x>
- ZAGMAJSTER M., BORKO S., DELIĆ T., DOUADY C. J., EME D., MALARD F., TRONTELJ P. & FIŠER C., 2022 (in press)** - Availability of DNA barcodes in subterranean amphipods in Europe. In: *Proceedings of the 18th International Congress of Speleology*, 24<sup>th</sup> - 31<sup>st</sup> July 2021, Savoie, France.
- ZAGMAJSTER M., EME D., FIŠER C., GALASSI D., MARMONIER P., STOCH F., CORNU J.-F. & MALARD F., 2014** - Geographic variation in range size and beta diversity of groundwater crustaceans: insights from habitats with low thermal seasonality. *Global Ecology and Biogeography*, 23, 1135-1145. <https://doi.org/10.1111/geb.12200>
- ZAGMAJSTER M., MALARD F., EME E., & CULVER D. C., 2018** - Subterranean biodiversity patterns from global to regional scales. In: Moldovan O.T., Kovac L. and Halse S. Eds., *Cave Ecology. Ecological Studies* 235. Springer Nature Switzerland, pp. 195-225. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-98852-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-98852-8_9)



# KARSTOLOGIA 79

1<sup>er</sup> semestre 2022

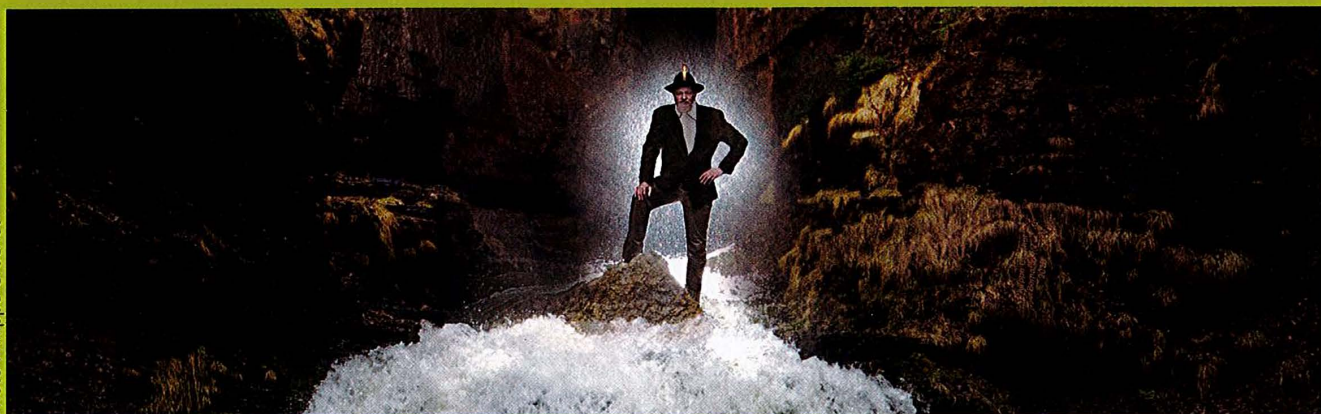
ISSN 0751 - 7688



*Karsts and karstology  
in France in the  
21st century*  
**Karsts et karstologie  
en France au 21<sup>e</sup> siècle**

Fédération française de spéléologie et Association française de karstologie  
Revue soutenue par l'Institut des sciences humaines et sociales du CNRS





## Contents Sommaire

- |   |  |
|---|--|
| <p><b>G. DANDURAND, A. DEVOS, É. HUSSON, J. BERTHE, N. BOLLOT, G. FRONTEAU, O. LEJEUNE et B. LOSSON</b> 1</p> <p><i>Karsts of sedimentary basins: A comparison between the Paris and Aquitaine Basins</i><br/>Karsts des bassins sédimentaires : comparaison entre les Bassins parisien et aquitain</p> | <p><b>S. PISTRE, H. JOURDE, A. JOHANNET, M. BAKALOWICZ, V. LÉONARDI, C. BATIOU-GUILHE, V. DE MONTETY, G. ARTIGUE et J.-L. SEIDEL</b> 61</p> <p><i>Karst hydrogeology: from early concepts to recent advances</i><br/>L'hydrogéologie karstique : des premiers concepts aux avancées récentes</p> |
| <p><b>L. BRUXELLES et D. CAILHOL</b> 11</p> <p><i>Two plateau karsts at the origin of French karstology the Grands Causses and the plateaus of the Jura</i><br/>Deux karsts de plateaux à l'origine de la karstologie française : les Grands Causses et les plateaux du Jura</p>                        | <p><b>B. LISMONDE</b> 67</p> <p><i>Karstological climatology research in France in the 21<sup>st</sup> century</i><br/>Les recherches sur la climatologie souterraine en France au XXI<sup>e</sup> siècle</p>  |
| <p><b>S. JAILLET, M. CALVET, J.-J. DELANNOY, F. HOBLÉA, R. MAIRE, Y. PERRETTE et P. VERNANT</b> 21</p> <p><i>French mountain karsts, markers of landscape evolutions</i><br/>Les karsts des montagnes françaises, marqueurs des évolutions paysagères</p>   | <p><b>F. MALARD, H. VERDIER, L. KONECNY-DUPRÉ, D. EME, C. J. DOUADY et T. LEFÉBURE</b> 73</p> <p><i>Subterranean species inventory in the molecular era</i><br/>Inventaire des espèces souterraines dans l'ère moléculaire</p>   |
| <p><b>B. ARFIB et L. MOCOCHAIN</b> 35</p> <p><i>Deep flooded karsts of south-eastern France Genesis and hydrodynamic functioning</i><br/>Karsts noyés profonds du sud-est de la France Genèse et fonctionnement</p>   | <p><b>J.-B. FOURVEL, C. GRIGGO, I. GAY, A. ARGANT et F. HOBLÉA</b> 79</p> <p><i>Quaternary palaeontology and karst environments, a long relationship...</i><br/>Paléontologie quaternaire et milieu karstique, une longue histoire...</p>  |
| <p><b>G. DANDURAND, H. CAMUS, C. PALLIER, J.-Y. BIGOT, L. BRUXELLES, D. CAILHOL, R. MAIRE et Y. QUINIF</b> 45</p> <p><i>Speleogenesis challenged by new paradigms</i><br/>La spéléogénèse à l'épreuve des nouveaux paradigmes</p>   | <p><b>P. GALANT</b> 85</p> <p><i>Another look at the archaeology of karst environments</i><br/>Un autre regard sur l'archéologie des milieux karstiques</p>  |
| <p><b>S. VERHEYDEN, C. NEHME et B. P. ONAC</b> 53</p> <p><i>Speleothem science – A short review and state of the art</i><br/>Les spéléothèmes au fil du temps</p>   | <p><b>C. GAUCHON et V. BIOT</b> 91</p> <p><i>News about underground tourism in France</i><br/>Actualités du tourisme souterrain en France</p>  |

## REVIEW

## Plant–animal interactions in the era of environmental DNA (eDNA)—A review

Pritam Banerjee<sup>1,2</sup>  | Kathryn A. Stewart<sup>3</sup>  | Caterina M. Antognazza<sup>4</sup>  |  
 Ingrid V. Bunholi<sup>5</sup>  | Kristy Deiner<sup>6</sup>  | Matthew A. Barnes<sup>7</sup>  | Santanu Saha<sup>8</sup>  |  
 Héloïse Verdier<sup>9</sup>  | Hideyuki Doi<sup>10</sup>  | Jyoti Prakash Maity<sup>2</sup>  | Michael W. Y. Chan<sup>1</sup>  |  
 Chien Yen Chen<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, Graduate Institute of Molecular Biology, National Chung Cheng University, Chiayi County, Taiwan

<sup>2</sup>Department of Earth and Environmental Sciences, National Chung Cheng University, Chiayi County, Taiwan

<sup>3</sup>Institute of Environmental Sciences, Leiden University, Leiden, The Netherlands

<sup>4</sup>Department of Theoretical and Applied Science, University of Insubria, Varese, Italy

<sup>5</sup>Department of Biology, Indiana State University, Terre Haute, Indiana, USA

<sup>6</sup>Department of Environmental Systems Science, ETH Zurich, Universitätsstrasse, Zurich, Switzerland

<sup>7</sup>Department of Natural Resources Management, Texas Tech University, Lubbock, Texas, USA

<sup>8</sup>Post graduate department of Botany, Bidhannagar College, Kolkata, India

<sup>9</sup>LEHNA, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023, Villeurbanne, France

<sup>10</sup>Graduate School of Information Science, University of Hyogo, Kobe, Japan

## Correspondence

Chien Yen Chen, Department of Earth and Environmental Sciences, National Chung Cheng University, 168 University Road, Min-Hsiung, Chiayi County 62102, Taiwan. Emails: [chien-yen.chen@oriel.oxon.org](mailto:chien-yen.chen@oriel.oxon.org); [yen@eq.ccu.edu.tw](mailto:yen@eq.ccu.edu.tw)

## Abstract

Plant–animal interactions (PAI) represent major channels of energy transfer through ecosystems, where both positive and antagonistic interactions simultaneously contribute to ecosystem functioning. Monitoring PAI therefore increases the understanding of environmental health, integrity, and functioning, and studying complex interactions through accurate, cost-effective sampling can aid in the management of detrimental anthropogenic impacts. Environmental DNA (eDNA)-based monitoring represents an increasingly common, nondestructive approach for biodiversity monitoring, which could help to elucidate PAI. Here, we aim to provide an overall discussion on the potential of using eDNA to study PAI. We assessed the existing literature on this subject from 2009 to 2021 using a freely accessible web search tool. The search was conducted by using keywords involving eDNA and PAI, including both species-specific and metabarcoding approaches, recovering 43 studies. We summarized the advantages and current limitations of such approaches, and we outline research priorities to improve future eDNA-based methods for PAI analysis. Among the 43 studies identified using eDNA to measure PAI such as pollination, herbivory, mutualistic, and parasitic relationships, they have often identified higher taxonomic diversity in several direct comparisons with DNA-based gut/bulk sampling and conventional survey methods. Research needs include the following: better understanding of the influencing factors of eDNA detection involved in PAI (e.g., eDNA degradation, origin, and types), methodological standardization (sampling methods and primer development), and more inclusive sequence reference databases. If these research priorities are addressed, it will have a significant impact to enable PAI biodiversity monitoring with eDNA. In the future, the implementation of eDNA methods to study PAI can particularly benefit the scalability of environmental biomonitoring surveys that are imperative for ecosystem health assessments.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Environmental DNA* published by John Wiley & Sons Ltd.

## KEYWORDS

biodiversity loss, biodiversity sampling, conservation management, ecosystem functioning, environmental DNA (eDNA), molecular ecology, nondestructive, plant–animal interactions (PAI)

## 1 | INTRODUCTION

More than one million species are at risk of becoming threatened with extinction (IPBES, 2019), heralding the Anthropocene as the sixth mass extinction event (Myers, 1990; Román-Palacios & Wiens, 2020). The loss of species interactions may occur well before the actual extinction of individual species, thereby initiating deleterious effects on species functionality and its service to the ecosystem (Valiente-Banuet et al., 2015). This in turn further accelerates species extinction rates (Simmons et al., 2020), which is especially pertinent for specialist species (Colles et al., 2009). In fact, given that the loss of successive interactions provides an early warning system for the deterioration of ecosystem health (Valiente-Banuet et al., 2015), documenting, monitoring, and conserving such complex interactions is critical to retain ecosystem functioning.

One of the principal means by which taxa are interconnected in nature is via plant–animal interactions (PAI). These interactions can play pivotal ecological roles and materialize in multiple combinations of positive and antagonistic relationships (e.g., predation, frugivory and herbivory, parasitism, and mutualism). For example, frugivory contributes to propagation and thus facilitates plant restoration (Chama et al., 2013; Monge et al., 2020) and gene flow (Robledo-Arnuncio & Garcia, 2007). Without such mutualistic relationships, some plants may not be able to complete their life cycles, and the animals may starve due to resource deficiency. Herbivory leads to defoliation or root removal, which can regulate or diminish overall phytomass but can also increase species diversity and influence plant distribution (Castagneyrol et al., 2017; Milchunas & Lauenroth, 1993), thereby regulating ecosystem stability (Castagneyrol et al., 2017; Schallhart et al., 2012; Wirth et al., 2008). In pollinator–plant mutualisms, the former acquires feeding from the latter and in return serves as an agent of plant propagation and a vector for gene flow (Ellis & Johnson, 2012). Studies documenting the food habits of pollinators and their interactive role in sustaining ecosystems have already shed light on the complex network of species-specificity, habitat preference, and coevolution between plants and their pollinators (Sargent & Ackerly, 2008). Mutualisms also assist with growth and offer protection from pathogens (e.g., plant–insect associations; Rasmussen et al., 2021). In contrast, antagonistic interactions (e.g., parasites and parasitoids) can affect the growth of plants and result in economical and ecological loss (Derocles et al., 2015). Thus, PAI underpins many of the fundamental processes related to ecosystem structure and functioning (Pacini et al., 2008).

However, studying these multifaceted interactions using conventional methods (e.g., field observation, camera, malaise, pitfall traps, and gut content analysis) is often difficult and laborious (Thomsen & Sigsgaard, 2019). Alternatively, molecular advancements with the

analysis of trace DNA from environmental samples (i.e., environmental DNA or “eDNA”) have provided researchers and managers the ability to scale up documentation and monitoring of such relationships, and to do so at increased spatiotemporal frequencies with more cost-effectiveness (see Figure 1).

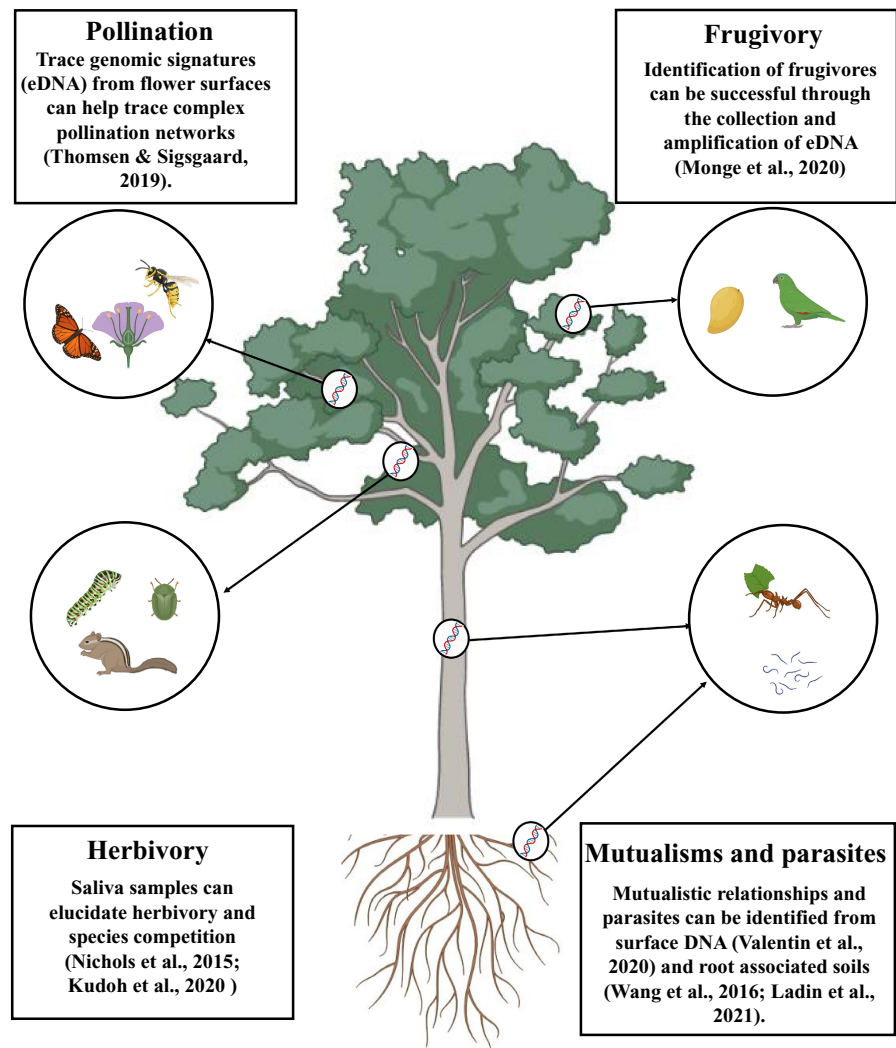
Methodological development for the application of eDNA has rapidly evolved from the presence/absence detection of organisms (Ficetola et al., 2008) and abundance quantification of eDNA signals (Taberlet et al., 2012), to the detection of whole communities (Deiner et al., 2021) and even their trophic interactions (D'Alessandro & Mariani, 2021; Thomsen & Sigsgaard, 2019). Indeed, eDNA-based methods have experienced a sharp adoption in different fields such as conservation biology (e.g., detection of endangered or invasive species; Piaggio et al., 2014; Stewart et al., 2017), ecological biomonitoring in the terrestrial and aquatic ecosystem (e.g., environmental health monitoring; Xie et al., 2017), wildlife forensics (Allwood et al., 2020), wildlife disease monitoring (Barnes et al., 2020), and animal behavior (Nichols et al., 2015). The application of eDNA methods to investigate a myriad of ecological interactions such as pollination (e.g., plant–insects, plant–animal), predation (e.g., herbivory, frugivory), and mutualism (e.g., plant–nematode, plant–insect, plant–animals) (Rasmussen et al., 2021; Thomsen & Sigsgaard, 2019; van Beeck Calkoen et al., 2019) further demonstrates the application of eDNA as a multidisciplinary approach (Deiner et al., 2021; Veilleux et al., 2021) poised to tackle complex ecological questions regarding inter-taxa relationships. However, as with every newly developed method, the use of eDNA for PAI studies remains limited.

To understand the current use and limitations of eDNA for studying PAI, we reviewed the current literature. We discuss the advantages and current limitations of such methods, and propose research priorities that may improve future eDNA-based methods for PAI analysis. Within this context, our goal is to highlight for both researchers and managers, the potential utility of noninvasive/destructive eDNA-based methods, but we also aim to identify and clarify uncertainties and research needed to advance these methods for broader application.

## 2 | METHODS

In order to understand the state-of-the-art in using eDNA detections of species to study PAI and enable an effective discussion of this application, we qualitatively reviewed studies incorporating eDNA methods into PAI research (targeted and metabarcoding approaches) by searching the literature published between 2009 to 2021 using Google Scholar (<https://scholar.google.com/>) with the following search conditions: (1) “[eDNA] AND [plant–animal

**FIGURE 1** Biological signatures in the form of eDNA or eRNA can be detected from plants noninvasively to trace out complex interactions. Illustration presents hypothetical examples of PAI (e.g., pollination, herbivory, frugivory, and mutualism) including representative examples in the literature



interactions]; (2) “[eDNA] AND [pollination]”; (3) “[pollen metabarcoding]”; (4) “[eDNA] AND [herbivory]”; (5) “[herbivory metabarcoding]”; and (6) “[fecal metabarcoding]”. The content of the top 100 publications on Google Scholar was manually verified. We selected papers that worked on nondestructive eDNA-based methods for detection. The selected publications were then evaluated to understand the potential advantages and limitations of eDNA-based methods for the study of PAI.

## 2.1 | Why use eDNA-based methods for studying PAI?

Conventional methods such as field observation, histological and biochemical analysis, various cameras, malaise, or pitfall traps, etc. have proved their utility for identifying and expanding knowledge on PAI across numerous species groups, research questions, and intended outcomes (ecological or evolutionary fundamental knowledge, agricultural/horticultural production, conservation management, and action plans). Yet historically, most studies on PAI generally focus on pairs of species (e.g., plant–insect) (Herrera

& Pellmyr, 2009), and thus, the ecologically complex interactions between species groups (e.g., plant–nematode–insect) remain less understood (Luna & Dáttilo, 2021). Indeed, numerous animal species are interconnected with plants, they may coexist or not but still have potential impacts on each other across their network (Luna & Dáttilo, 2021). These interactions are dynamic processes, and thus, their subsequent observation is often difficult using discrete means of data collection.

In direct comparison with conventional methods, for example, DNA metabarcoding has a greater ability to detect closely related taxa (Macgregor et al., 2019), is time-efficient and cost-effective, whereas the application of conventional methods may be difficult for large-scale sampling due to their larger time investment and costs. Additionally, conventional methods may be unable to resolve diverse yet morphologically conserved groups (e.g., Nematodes; Derycke et al., 2010) and particularly cryptic species (Sheth & Thaker, 2017). Thus, the implementation of DNA-based methods may help us to understand how ecological mechanisms shape different PAIs and the assembly of communities. Studying PAI in a community context would therefore require sampling methods that provide broad spatiotemporal inference, involving a wide range of species.

Indeed, DNA-based methods offer broad output with the capability of identifying multiple PAI simultaneously, and the ease at which DNA is collected and analyzed also affords multiple sampling events for an integrative approach (Evans & Kitson, 2020). DNA metabarcoding methods (e.g., metabarcoding of gut contents or bulk samples) contain several organisms from different taxonomic groups together (e.g. Kick-Net sampling or insect trap, that amalgamate entire organisms into a single sample, Taberlet et al., 2018) and have already proved useful in elucidating complex species and trophic interactions (García-Robledo et al., 2013). For instance, DNA metabarcoding analysis from gut content or bulk samples has illuminated different nodes across various food webs and reconstructed the trophic links in terrestrial (Gogarten et al., 2020; Wirta et al., 2014, 2016; Wirta, Vesterinen, et al., 2015; Wirta, Weingartner, et al., 2015), aquatic (Leray et al., 2012; Leray et al., 2015), and often inaccessible environments, such as deep-sea beds, hydrothermal vents, and cold-seeps (Olsen et al., 2014). Several reviews to date have summarized the history, achievements, and current applications of studying species interaction using DNA metabarcode methods across multiple fields (Clare, 2014; Evans et al., 2016; Kress et al., 2015; Pompanon et al., 2012; Symondson, 2002; Valentini et al., 2009). These methods, however, are still a direct DNA-based method requiring tissue from single individuals or from bulk samples like a pitfall trap and gut content samples. All of these sample types are destructive and invasive sometimes requiring the sacrifice of focal organisms, which is not ideal or practical for species of conservation concern. Both conventional and these direct DNA-based methods further (generally) focus on animal interactions with different plants, whereas the converse (plant interactions with multiple animal species) remains less understood.

Novel sampling techniques such as the collection of DNA from soil, water, or air environments (eDNA) offer a method for studying PAI with the potential capability for simultaneously identifying multiple PAI, while also facilitating a conservation-friendly, and for many species noninvasive and nondestructive (including nontarget taxa) alternative. In fact, advancements including DNA collections from the surface of organisms (e.g., DNA from leaf surfaces; Valentin et al., 2020) prevented the sacrifice of organisms and highlighted the nondestructive advantages of eDNA for measuring complex PAI.

## 2.2 | Current advancements in eDNA for the study of PAI

Although still in its infancy, species-specific assays and metabarcoding of eDNA have demonstrated a great application for understanding PAI in nature (see Table 1 and Table 2). Here, we summarize the ways in which various PAI (i.e., pollination, predation, and mutualism) can be documented for whole communities using the collection and analysis of eDNA.

Pollination is one of the most well studied PAI since it brings about gene recombination (Faegri & Pijl, 1979), and exemplifies a myriad of central ecological and evolutionary principles and

theories. In pollinator PAI, the loss of even a singular plant species can trigger the rapid extinction of specialist pollinators, a process of serious ecological and economical concern (Klein et al., 2007; UK National Ecosystem Assessment, 2011). To date, researchers have taken advantage of eDNA-based analysis to detect and monitor pollinators, their feeding preferences, species-specificity, niche separation, and coevolution (Table 1). In particular, eDNA metabarcoding of honey samples has been demonstrated to detect more taxa than conventional methods, where species-specificity (i.e., identification of generalists and specialists), foraging activity, and complex interactions have been analyzed rapidly and cost-effectively (De Vere et al., 2017; Hawkins et al., 2015). Interestingly, eDNA from honey samples can also help to identify other entomological signatures within forests or agricultural fields, such as those from plant-sucking insects whose “honeydew” droplets are incorporated in honey reserves (Utzeri et al., 2018). Bovo et al. (2018) further demonstrated the utility of eDNA tools to understand the micro-ecosystem within honey bee colonies by detecting the eDNA signals from five distinct groups (i.e., arthropods, plants, fungi, bacteria, viruses). Although not strictly PAI, this study further exemplifies eDNA-based methods as a potential avenue for information regarding wildlife diseases and epidemics.

While complex pollinator networks are typically difficult to identify and discriminate using conventional sampling, eDNA collections taken directly from flowers or leaves have further shown promise to gain an in-depth understanding of dynamic pollinator and herbivore interactions (Kudoh et al., 2020; Thomsen & Sigsgaard, 2019). For example, Thomsen and Sigsgaard (2019) detected eDNA signatures from 135 arthropod species originating from diverse ecological groups deposited on wildflowers (e.g., pollinators, parasitoids, gall inducers, predators, and phytophagous species) and suggested the potential use of eDNA approaches for estimating interactive species compositions, deducing the effects of environmental change, and monitoring endangered, cryptic and invasive species (Thomsen & Sigsgaard, 2019).

Understanding the complex interactions between frugivores and plants also remains a challenge, but recent strides using eDNA traces to detect specific interactions of fruit-eaters have now made this prospect more convenient. For example, Monge et al. (2020) successfully amplified the salivary eDNA of frugivorous birds (*Ara macao*) from tropical almond (*Terminalia catappa*) fruit remains. Albeit with limited success, this study further provided proof of concept for the use of eDNA in nondestructive sex identification, potentially ushering in a new frontier for studying sex-specific differences in PAI.

Herbivores often prefer a certain plant or group of species, which may cause shifts in plant composition. Thus, it would be beneficial to identify the diversity of plant taxa eaten by particular herbivores and the number of herbivores visiting focal plants. For herbivory, eDNA-based methods have been shown to detect large numbers of taxa more efficiently than other sampling methodologies (e.g., microscopic analysis of fecal samples, bulk DNA metabarcoding; Tournayre et al., 2021). In fact, eDNA

TABLE 1 Number of PAI studies through eDNA metabarcoding approach from 2009 to 2021 separated for different types of PAI

Types of PAI	Organisms involved	Applications	Reference
<b>Positive</b>			
Mutualism/ symbiosis	Arthropods and plants	Sustainable agricultural methods	Rasmussen et al. (2021)
Pollination	Arthropods and plants	Environmental integrity and pest management	Thomsen and Sigsgaard (2019)
	Bats and plants	Identification of plant-feeding behavior, pollen transport, and seed dispersions	Bell et al. (2021); Edwards et al. (2019)
	Honey bees and plants	Pollinator–plant preference and interactions	Bovo et al. (2018); De Vere et al. (2017); Hawkins et al. (2015); Keller et al. (2015); Milla et al. (2021); Oliver et al. (2021)
	Insects and plants	Pollen–transport interactions; ecosystem monitoring	Baksay et al. (2020); Pornon et al. (2016); Utzeri et al. (2018)
	Moths and plants	Identification of plant-feeding behavior and pollen transport networks	Chang et al. (2018); Macgregor et al. (2019)
Frugivory	Birds and plants	Species interaction and potential use in population genetics	Monge et al. (2020)
<b>Antagonistic</b>			
Parasite/ parasitoid	Parasitoid and plants	Identification of plant–parasitoid interaction, environmental integrity, and pest management	Derocles et al. (2015); Thomsen and Sigsgaard (2019)
Predation/ herbivory	Deers and plants	Forest management, foraging behaviors, dietary assessment for conservation purposes	van Beeck Calkoen et al. (2019); Iacolina et al. (2020); Nakahama et al. (2021)
	European bison and plants	Dietary assessment	Kowalczyk et al. (2019)
	Gazelle and plants	Dietary assessment for conservation purposes	Ait Baamrane et al. (2012)
	Grouse and plants	Dietary assessment for conservation purposes	Chua et al. (2021)
	Idaho ground squirrel and plants	Dietary assessment for conservation purposes	Goldberg et al. (2020)
	Insects and plants	Mesocosm validation of insect–plant interactions	Kudoh et al. (2020)
	Italian hare and plants	Dietary assessment for conservation purposes	Buglione et al. (2018)
	Lambs and plants	Dietary assessment and feeding selectivity	Pegard et al. (2009)
	Lemmings and plants	Dietary assessment and foraging behaviors	Soininen et al. (2017)
	Lemur and plants	Dietary assessment for conservation purposes	Quéméré et al. (2013)
	Mammals and plants	Dietary assessment, foraging behaviors, trophic interactions, and niche partitioning	Boukhoudou et al. (2021); Kartzinel et al. (2015); Meyer et al. (2020); ter Schure et al. (2021)
	Moose and plants	Dietary assessment for conservation purposes	Iacolina et al. (2020)
	Mouse and plants	Dietary assessment for conservation purposes	Iwanowicz et al. (2016)
	Nematodes and plants	Change to Identification of Plant–nematodes interactions	Wang et al. (2016)
	Orthoptera and plants	Dietary assessment and study the impact of climatic variation	Pitteloud et al. (2020)
	Tapir and plants	Dietary assessment and trophic interactions	Hilbert et al. (2013)
	Turtles and lotus roots	Dietary assessment and feeding activity	Koizumi et al. (2016)
	Ungulates and plants	Dietary assessment, foraging behaviors, and ecological interactions	Nichols et al. (2012); Nichols et al. (2015)
	Woodland caribou and plants	Dietary assessment for conservation purposes	Newmaster et al. (2013)

Note: Key expressions were used for study inclusion via Google Scholar: “eDNA and plant–animal interactions,” “eDNA and herbivory,” “eDNA and pollination,” “eDNA and symbiosis,” “eDNA and predation,” “eDNA and parasitism,” and “fecal DNA.”

metabarcoding has also been applied to understand the dietary overlap and competition among domestic and wild herbivores (ter Schure et al., 2021). Notably, sampling matter may be a restricted

application to large organisms with detectable fecal deposits. To overcome this limitation, salivary samples can be collected to identify herbivores that have fed upon specific plants, even

**TABLE 2** Number of PAI studies through eDNA metabarcoding approach from 2009 to 2021 separated for different types of PAI

Type of PAI	Number of peer-reviewed articles (2009–2021)
Mutualism/symbiosis	1
Parasite/parasitoid	2
Pollination	17
Predation/herbivory	25
Total	43

from small taxa (e.g., from browsed twigs, Valentin et al., 2020; or leaves, Nichols et al., 2012). For example, Nichols et al. (2015) applied eDNA analysis across a large forest landscape, proving the utility of this method for studying cryptic browsing behavior. Salivary eDNA signatures can also be used to assess foraging preferences and niche separation among species (e.g., van Beeck Calkoen et al., 2019). Impressively, salivary eDNA signals from insect herbivores within mesocosms have also shown a positive correlation between rim length (i.e., total outer edge) of feeding marks and eDNA concentration, implying eDNA signatures may be able to quantitatively delineate the amount of herbivory (Kudoh et al., 2020).

Detecting plant-pathogen/parasite interactions through eDNA has also recently become possible. Derocles et al. (2015) for example, successfully amplified trace DNA from plants-leaf miners-parasitoid interactions and Thomsen and Sigsgaard (2019) detected numerous phytophagous species, parasitoids, gall inducers, and predator insects through the metabarcoding of flowers. Although in these studies nontarget taxa were used to isolate eDNA, this also can be done in a completely nondestructive manner using newly developed surface-sampling methods (see Valentin et al., 2020). Cumulatively, these studies provide a foundation for detecting antagonistic and cryptic plant-arthropod interactions with applications for disease monitoring and pest management.

Mutualistic relationships between plants and animals (e.g., insects and nematodes) assist plant growth and development, and these relationships can also be studied effectively through eDNA analysis (Ladin et al., 2021). For example, Rasmussen et al. (2021) used eDNA metabarcoding to explore how the diversity of fungi and arthropods was affected by different agricultural management practices. For a more historical perspective of mutualistic relationships, Gous et al. (2019) applied eDNA methods to investigate pollinator interactions that had occurred over a century ago via ancient honey samples, highlighting eDNA's potential to reveal a time series of species interactions.

Certainly, eDNA methods have advanced our ability to accurately detect the occupancy of species (Deiner et al., 2021) and are highly cost and time-efficient (Qu & Stewart, 2019). Indeed, they have even outperformed conventional methods of biodiversity sampling in several comparisons (Fediajevaite et al., 2021; McElroy et al., 2020), including their ability to capture increased taxonomic diversity compared with conventional methods, which can be applicable for

large-scale monitoring (Macher et al., 2018). Thus, eDNA-based methods have gradually overcome some limitations associated with conventional monitoring techniques (e.g., field identifications). Perhaps most importantly for the assessment of ecological integrity and functionality, eDNA can rapidly detect entire communities.

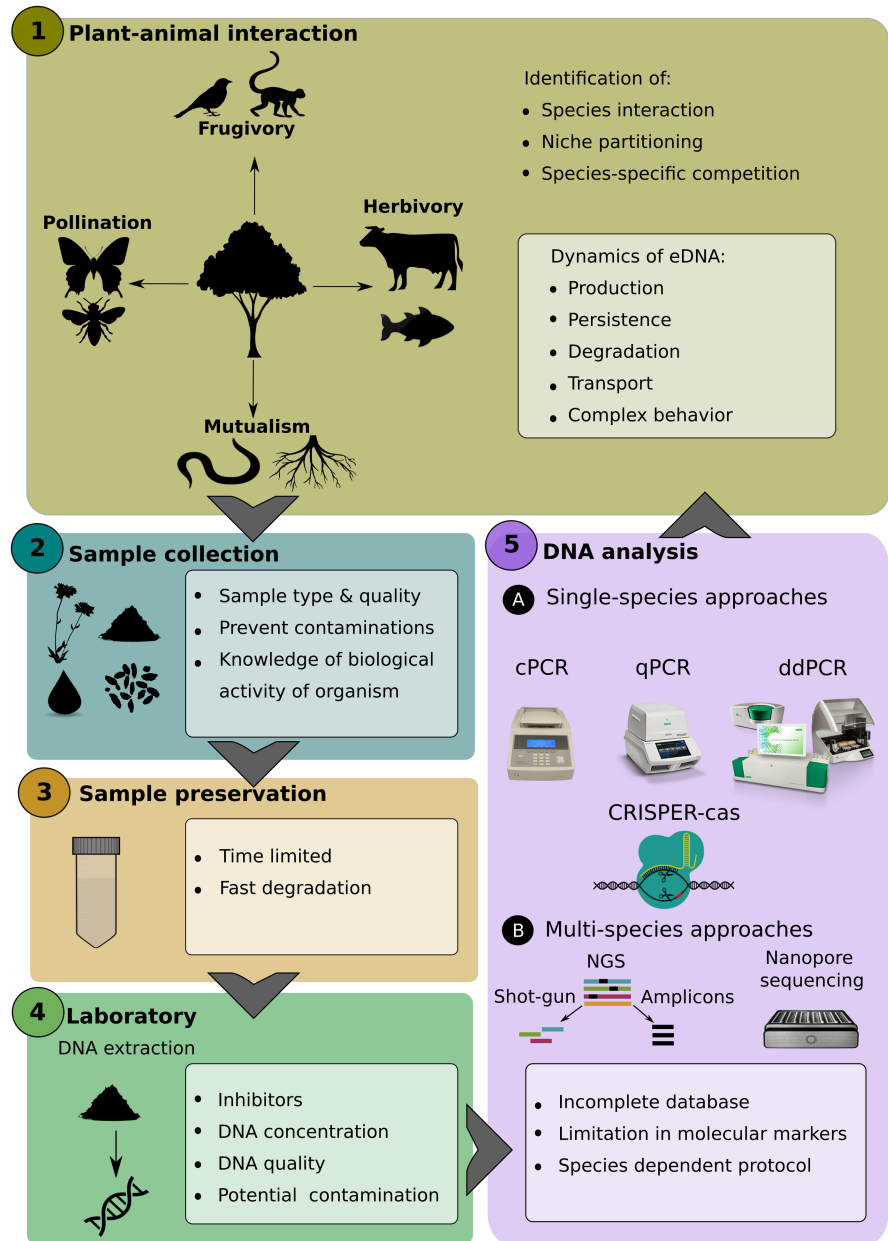
### 2.3 | Current limitations

There remains a need to understand the current limitations of eDNA analysis, especially when it pertains to PAI detection and interpretation. Limitations are found at each step of the collection-analysis-interpretation process (Figure 2). The existing limitations of this method are:

- I The complex, and often idiosyncratic, ecology of eDNA. In effect, practitioners may sample different sources of eDNA (cellular, extracellular, extraorganismal, etc.) (Rodriguez-Ezpeleta et al., 2021; Stewart, 2019), which may lead to different PAI interpretations. For example, pollen and spores (extraorganismal DNA) are ubiquitous in the atmosphere, travel long distances (through wind or water), and contain adaptations to persist in dormant stages for long periods of time. These transport mechanisms of eDNA, when settled and collected on nontargeted and noninteracting organisms, can lead to misinterpretation of interaction when there is not one. Alternatively, extracellular DNA and cellular DNA are generally specific to places where organisms recently moved and are subject to easy degradation. Thus, clear differentiation of eDNA in different states and their behavior may help to draw more precise conclusions about when a species was present (Mauvisseau et al., 2022).
- II The production and release of eDNA into the environment can also occur at different rates, where eDNA concentration can depend on many variables such as life stage, metabolic activity, or breeding season (Stewart, 2019). What's more, the production rate of eDNA is most likely influenced by species interactions themselves (e.g., competition between/among species) (Stewart, 2019). In fact, mixed-species populations have been shown to increase eDNA production rates when housed together compared with single-species populations (Sassoubre et al., 2016). Besides the aforementioned characteristics, the persistence of eDNA (Barnes & Turner, 2016; Deiner et al., 2017; Kudoh et al., 2020), and its transport in and between environmental media (air, water, soil) should also be considered (Barnes & Turner, 2016; Lacoursière-Roussel & Deiner, 2021), especially given that these parameters have yet to be standardized for many taxa.
- III Translating eDNA quantification metrics to organismal abundance has been controversial (Marshall et al., 2021), although recent research has advanced the possibility of absolute quantification (Hoshino et al., 2021; Tillotson et al., 2018) and even predicting the dispersion time of eDNA within the environment (Marshall et al., 2021).



**FIGURE 2** Workflow including potential limitations (inserted box) in each step for eDNA analysis in plant-animal interactions (PAI) detection (cPCR, conventional PCR; CRISPR-cas, clustered regularly interspaced short palindromic repeats—CRISPR-associated protein; ddPCR, droplet digital PCR; NGS, next generation sequencing; qPCR, quantitative PCR)



IV A universal limitation to any genetic-based species identification reliant on databases, is certainly missing species sequences, sequencing error, cloning vector contamination, and the redundancy of data (Singh, 2015). These issues may cause species misidentification, which may also lead to the failure in decrypting accurate PAI (Roslin & Majaneva, 2016; Sheppard et al., 2005).

V As eDNA methods sometimes struggle with low detection rates, more comparisons are needed between eDNA and conventional surveys (e.g., camera, malaise traps) for translation of results and inferences between these different methods.

VI The detection of niche partitioning using eDNA-based methods is only just beginning (ter Schure et al., 2021) and fine-scale partitioning (e.g. different herbivory behavior on the same plant) may be difficult with current eDNA analysis techniques.

VII Unsurprisingly, and similar to conventional approaches, eDNA methods also encounter some technical field and laboratory

challenges. This is often because eDNA samples frequently contain PCR inhibitors thereby further reducing already low DNA concentrations (McKee et al., 2015). Besides this, false-positive and false-negative detections are also a matter of concern.

VIII Laboratory protocols, including the method of standardization, are directly dependent on sampling procedures, sample quality, environmental factors, and molecular markers design. Although recent studies show evidence of overcoming some technical limitations, such as primer development, chloroplast and nuclear primer for plants (rbcl, matK, trnH-psbA, ITS2, etc.), group-specific primers for animals (MiFish, MiBird, etc.), protocol standardization, and removing the barrier of inhibitors (Burian et al., 2021), collection, and analysis, optimization may still be required. Mitochondrial COI is the most common universal barcode for animals demonstrating good species discrimination (Che et al., 2012), but in plants, no single universal barcode

provides suitable taxonomic resolution (Jones et al., 2021). For plants, multiple primers from two primary plastid regions in the chloroplast (e.g., *rbcl* and *matK*), frequently combined with nuclear regions (e.g., *ITS2*), have been used for barcoding, but none of these have been found to be suitable across all species due to rampant introgressive hybridization and polyploidy (Jones et al., 2021).

## 2.4 | Future perspectives

The advent of eDNA quantification has offered an exciting but as yet untapped future in discovering the complex and dynamic pattern of species interactions. Implementation of eDNA analysis has thus far proved helpful in studying rapid changes in ecosystems (e.g., diversity and species interaction changes due to anthropogenic pressure; DiBattista et al., 2020) and may also advance our understanding of the effect of habitat fragmentation, sudden natural calamities, or rapid climatic changes (Bartlett et al., 2016). Environmental DNA may even demonstrate utility in assessing how range or phenological shifts via climate change alter PAI. For example, will climate change maintain or dismantle entire networks of integrated species? We envision research into the congruence or discordance of plant flowering time and their pollinators. Certainly, the ease of collecting eDNA is a major advantage to questions requiring successive time-series data (e.g., coevolution or niche separation), and we expect this to be a major avenue for investigation in the near future.

The ease and rapidity of eDNA analysis particularly lend itself to the monitoring of invasive species (Kim et al., 2018), and here too, eDNA methodology may illuminate how invasive species change complex species interactions on an ecosystem scale. While it is true that invasive species, at least initially, add to the net biodiversity of a region, will these species also add to species interactions, weaken specialized species interactions, or break them altogether? Here, eDNA analysis may be especially important for these assessments early during colonization events, when invasive species removal and thus their impact on well-established species interactions, may be circumvented.

Recent methodological developments to collect and extract environmental RNA (eRNA) might also be leveraged to understand changes in gene expression with physical and biological pressure (functional genomics; Tsuru et al., 2021), with possibilities of expansion into ecological epigenetics, ecosystem health, functional metagenomics, population-level inference, or even the interface of species-species interactions (e.g., Stewart & Taylor, 2020; Veilleux et al., 2021). Unlike eDNA, eRNA can go beyond species and PAI quantification, such as understanding life histories, ages, metabolic activities, physiological conditions, and health of interacting organisms. Functional information of a species, population, or community and their functional genes can be detected from mRNA profiling or miRNA for studying the health of organisms. Furthermore, the short

persistence time of eRNA and resulting low concentration within the environment may help to avoid false-positive results and even potentially provide an estimate for the relative time of eDNA deposition and thus organismal origin (Marshall et al., 2021). However, to date, detection methods for eRNA are not yet well-established, lack broad validation in the field, and insufficient reference data may raise concerns.

## 3 | CONCLUSIONS

In the context of global biodiversity decline where ecosystems are under heavy stress and subjected to rapid changes, it is critical to increase our knowledge of species interactions to support the restoration and conservation of ecosystems effectively. Threats to species and ecosystem integrity are often assessed in terms of habitat loss, overharvesting, or over-predation (Kerr & Deguise, 2004). Yet, populations may also decline through successive loss of species interactions (Simmons et al., 2020; Valiente-Banuet et al., 2015), and studying species in isolation may limit our full understanding of the changes and threats to the entire ecosystem of interacting species (Roslin & Majaneva, 2016). In fact, positive and antagonistic interactions synergically work to maintain the stability, health, and function of an ecosystem, demanding a fast, reliable, and noninvasive/destructive approach. Currently, eDNA-based methods exhibit accurate information about species-specificity, community dynamics, and ecological networks. Although to date there remains a limited number of investigations using eDNA to critically assess and identify PAI, we propose eDNA methods to herald a revolutionary era for studying complex and cryptic ecological links in nature.

### AUTHOR CONTRIBUTION

P.B. conceived of the review; P.B., K.A.S., C.M.A., I.V.B., C.Y.C., H.V., and S.S. prepared the first draft and revised the manuscript. All authors gave extensive edits and revised the manuscript, from conception to final draft. P.B. and H.V. prepared the figure with input from all authors; I.V.B. prepared the table with input from all authors.

### ACKNOWLEDGMENTS

P.B. has been supported by Overseas Research Scholarships (ORS) from National Chung Cheng University as well as Ministry of Education (MOE)- Industry-Academia project (Taiwan). The authors would like to thank the Ministry of Science and Technology (Taiwan) for financial support (MOST 109-2811-M-194-502; MOST 108-2811-M-194-510).

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed during the current study.

## ORCID

- Pritam Banerjee  <https://orcid.org/0000-0002-1818-5096>  
 Kathryn A. Stewart  <https://orcid.org/0000-0001-6132-6627>  
 Caterina M. Antognazza  <https://orcid.org/0000-0001-5344-8245>  
 Ingrid V. Bunholi  <https://orcid.org/0000-0001-5489-276X>  
 Kristy Deiner  <https://orcid.org/0000-0001-9755-3223>  
 Matthew A. Barnes  <https://orcid.org/0000-0002-5550-8587>  
 Santanu Saha  <https://orcid.org/0000-0002-9832-207X>  
 Héloïse Verdier  <https://orcid.org/0000-0002-5006-7137>  
 Hideyuki Doi  <https://orcid.org/0000-0002-2701-3982>  
 Jyoti Prakash Maity  <https://orcid.org/0000-0003-4702-335X>  
 Michael W. Y. Chan  <https://orcid.org/0000-0003-0314-2437>  
 Chien Yen Chen  <https://orcid.org/0000-0003-1130-669X>

## REFERENCES

- Ait Baamrane, M. A., Shehzad, W., Ouhammou, A., Abbad, A., Naimi, M., Coissac, E., Taberlet, P., & Znari, M. (2012). Assessment of the food habits of the Moroccan dorcas gazelle in M'Sabih Talaa, west Central Morocco, using the trn L approach. *PLoS One*, 7(4), 35643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035643>
- Allwood, J. S., Fierer, N., & Dunn, R. R. (2020). The future of environmental DNA in forensic science. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(2), e01504–e01519. <https://doi.org/10.1128/AEM.01504-19>
- Baksay, S., Pornon, A., Burrus, M., Mariette, J., Andalo, C., & Escaravage, N. (2020). Experimental quantification of pollen with DNA metabarcoding using ITS1 and trnL. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61198-6>
- Barnes, M. A., Brown, A. D., Daum, M. N., de la Garza, K. A., Driskill, J., Garrett, K., Goldstein, M. S., Luk, A., Maguire, J. I., Moke, R., Ostermaier, E. M., Sanders, Y. M., Sandhu, T., Stith, A., & Suresh, V. V. (2020). Detection of the amphibian pathogens chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and ranavirus in West Texas, USA, using environmental DNA. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(3), 702–706. <https://doi.org/10.7589/2019-08-212>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Bartlett, L. J., Newbold, T., Purves, D. W., Tittensor, D. P., & Harfoot, M. B. (2016). Synergistic impacts of habitat loss and fragmentation on model ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1839), 20161027. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1027>
- Bell, K. L., Batchelor, K. L., Bradford, M., McKeown, A., Macdonald, S. L., & Westcott, D. (2021). Optimisation of a pollen DNA metabarcoding method for diet analysis of flying-foxes (*Pteropus* spp.). *Australian Journal of Zoology*, 68, 273–284. <https://doi.org/10.1071/ZO20085>
- Boukhoud, L., Saliba, C., Kahale, R., & Bou Dagher Kharrat, M. (2021). Tracking mammals in a Lebanese protected area using environmental DNA-based approach. *Environmental DNA*, 3(4), 792–799. <https://doi.org/10.1002/edn3.183>
- Bovo, S., Ribani, A., Utzeri, V. J., Schiavo, G., Bertolini, F., & Fontanesi, L. (2018). Shotgun metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a multi-kingdom honey bee derived environmental DNA signature. *PLoS One*, 13(10), e0205575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205575>
- Buglione, M., Maselli, V., Rippa, D., de Filippo, G., Trapanese, M., & Fulgione, D. (2018). A pilot study on the application of DNA metabarcoding for non-invasive diet analysis in the Italian hare. *Mammalian Biology*, 88, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.10.010>
- Burian, A., Mauvisseau, Q., Bulling, M., Domisch, S., Qian, S., & Sweet, M. (2021). Improving the reliability of eDNA data interpretation. *Molecular Ecology Resources*, 21(5), 1422–1433. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13367>
- Castagneyrol, B., Bonal, D., Damien, M., Jactel, H., Meredieu, C., Muiruri, E. W., & Barbaro, L. (2017). Bottom-up and top-down effects of tree species diversity on leaf insect herbivory. *Ecology and Evolution*, 7(10), 520–531. <https://doi.org/10.1002/ece3.2950>
- Chama, L., Berens, D. G., Downs, C. T., & Farwig, N. (2013). Habitat characteristics of forest fragments determine specialisation of plant-frugivore networks in a mosaic forest landscape. *PLoS One*, 8(1), e54956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054956>
- Chang, H., Guo, J., Fu, X., Liu, Y., Wyckhuys, K. A., Hou, Y., & Wu, K. (2018). Molecular-assisted pollen grain analysis reveals spatio-temporal origin of long-distance migrants of a noctuid moth. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 567. <https://doi.org/10.3390/ijms19020567>
- Che, J., Chen, H. M., Yang, J. X., Jin, J. Q., Jiang, K. E., Yuan, Z. Y., Murphy, R. W., & Zhang, Y. P. (2012). Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources*, 12(2), 247–258. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03090.x>
- Chua, P. Y., Lammers, Y. Y., Menoni, E., Ekrem, T., Bohmann, K., Boessenkool, S., & Alsos, I. G. (2021). Molecular dietary analyses of western capercaillies (*Tetrao urogallus*) reveal a diverse diet. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.08.443436>
- Clare, E. L. (2014). Molecular detection of trophic interactions: Emerging trends, distinct advantages, significant considerations and conservation applications. *Evolutionary Applications*, 7(9), 1144–1157. <https://doi.org/10.1111/eva.12225>
- Colles, A., Liow, L. H., & Prinzing, A. (2009). Are specialists at risk under environmental change? Neoecological, paleoecological and phylogenetic approaches. *Ecology Letters*, 12(8), 849–863. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01336.x>
- D'Alessandro, S., & Mariani, S. (2021). Sifting environmental DNA metabarcoding data sets for rapid reconstruction of marine food webs. *Fish and Fisheries*, 22, 822–833. <https://doi.org/10.1111/faf.12553>
- De Vere, N., Jones, L. E., Gilmore, T., Moscrop, J., Lowe, A., Smith, D., Hegarty, M. J., Creer, S., & Ford, C. R. (2017). Using DNA metabarcoding to investigate honey bee foraging reveals limited flower use despite high floral availability. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep42838>
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., De Vere, N., & Pfrender, M. E. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Deiner, K., Yamanaka, H., & Bernatchez, L. (2021). The future of biodiversity monitoring and conservation utilizing environmental DNA. *Environmental DNA*, 3(1), 3–7. <https://doi.org/10.1002/edn3.178>
- Derocles, S. A., Evans, D. M., Nichols, P. C., Evans, S. A., & Lunt, D. H. (2015). Determining plant-leaf miner-parasitoid interactions: A DNA barcoding approach. *PLoS One*, 10(2), e0117872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117872>
- Derycke, S., De Ley, P., Tandingan De Ley, I., Holovachov, O., Rigaux, A., & Moens, T. (2010). Linking DNA sequences to morphology: Cryptic diversity and population genetic structure in the marine nematode *Thoracostoma trachygaster* (Nematoda, Leptosomatidae). *Zoologica Scripta*, 39(3), 276–289. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2009.00420.x>
- DiBattista, J. D., Reimer, J. D., Stat, M., Masucci, G. D., Biondi, P., De Brauer, M., Wilkinson, S. P., Chariton, A. A., & Bunce, M. (2020). Environmental DNA can act as a biodiversity barometer of anthropogenic pressures in coastal ecosystems. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64858-9>

- Edwards, C. E., Swift, J. F., Lance, R. F., Minckley, T. A., & Lindsay, D. L. (2019). Evaluating the efficacy of sample collection approaches and DNA metabarcoding for identifying the diversity of plants utilized by nectivorous bats. *Genome*, 62(1), 19–29. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0102>
- Ellis, A. G., & Johnson, S. D. (2012). Lack of floral constancy by bee fly pollinators: Implications for ethological isolation in an African daisy. *Behavioral Ecology*, 23(4), 729–734. <https://doi.org/10.1093/behec o/ars019>
- Evans, D. M., & Kitson, J. J. (2020). Molecular ecology as a tool for understanding pollination and other plant–insect interactions. *Current Opinion in Insect Science*, 38, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.01.005>
- Evans, D. M., Kitson, J. J., Lunt, D. H., Straw, N. A., & Pocock, M. J. (2016). Merging DNA metabarcoding and ecological network analysis to understand and build resilient terrestrial ecosystems. *Functional Ecology*, 30(12), 1904–1916. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12659>
- Faegri, K., & Pijl, V. D. L. (1979). *The principles of pollination ecology* (Vol. 64, 3d rev. ed., pp. 6–7). Pergamon Press.
- Fediajevaite, J., Priestley, V., Arnold, R., & Savolainen, V. (2021). Meta-analysis shows that environmental DNA outperforms traditional surveys, but warrants better reporting standards. *Ecology and Evolution*, 11(9), 4803–4815. <https://doi.org/10.1002/ece3.7382>
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- García-Robledo, C., Erickson, D. L., Staines, C. L., Erwin, T. L., & Kress, W. J. (2013). Tropical plant–herbivore networks: Reconstructing species interactions using DNA barcodes. *PLoS One*, 8(1), e52967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052967>
- Gogarten, J. F., Hoffmann, C., Arandjelovic, M., Sachse, A., Merkel, K., Dieguez, P., Agbor, A., Angedakin, S., Brazzola, G., Jones, S., Langergraber, K. E., Lee, K., Marrocoli, S., Murai, M., Sommer, V., Kühl, H., Leendertz, F. H., & Calvignac-Spencer, S. (2020). Fly-derived DNA and camera traps are complementary tools for assessing mammalian biodiversity. *Environmental DNA*, 2(1), 63–76. <https://doi.org/10.1002/edn3.46>
- Goldberg, A. R., Conway, C. J., Tank, D. C., Andrews, K. R., Gour, D. S., & Waits, L. P. (2020). Diet of a rare herbivore based on DNA metabarcoding of feces: Selection, seasonality, and survival. *Ecology and Evolution*, 10(14), 7627–7643. <https://doi.org/10.1002/ece3.6488>
- Gous, A., Swanevelder, D. Z., Eardley, C. D., & Willows-Munro, S. (2019). Plant–pollinator interactions over time: Pollen metabarcoding from bees in a historic collection. *Evolutionary Applications*, 12(2), 187–197. <https://doi.org/10.1111/eva.12707>
- Hawkins, J., de Vere, N., Griffith, A., Ford, C. R., Allainguillaume, J., Hegarty, M. J., Baillie, L., & Adams-Groom, B. (2015). Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS One*, 10(8), e0134735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134735>
- Herrera, C. M., & Pellmyr, O. (2009). *Plant animal interactions: An evolutionary approach*. John Wiley & Sons.
- Hilbert, F., Taberlet, P., Chave, J., Scotti-Saintagne, C., Sabatier, D., & Richard-Hansen, C. (2013). Unveiling the diet of elusive rainforest herbivores in next generation sequencing era? The tapir as a case study. *PLoS One*, 8(4), e60799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060799>
- Hoshino, T., Nakao, R., Doi, H., & Minamoto, T. (2021). Simultaneous absolute quantification and sequencing of fish environmental DNA in a mesocosm by quantitative sequencing technique. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83318-6>
- Iacolina, L., Lukassen, M. B., Fløjgaard, C., Buttenschøn, R., Nielsen, J. L., & Pertoldi, C. (2020). eDNA and metabarcoding for rewinding projects monitoring, a dietary approach. *Mammalian Biology*, 100(4), 411–418. <https://doi.org/10.1007/s42991-020-00032-y>
- IPBES. (2019). Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services. E.S. Brondizio, J. Settele, S. Díaz, and H.T. Ngo (Eds.), IPBES secretariat, Bonn, Germany. pp. 1–56. <https://ipbes.net/global-assessment>
- Iwanowicz, D. D., Vandergast, A. G., Cornman, R. S., Adams, C. R., Kohn, J. R., Fisher, R. N., & Brehme, C. S. (2016). Metabarcoding of fecal samples to determine herbivore diets: A case study of the endangered Pacific pocket mouse. *PLoS One*, 11(11), e0165366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165366>
- Jones, L., Twyford, A. D., Ford, C. R., Rich, T. C., Davies, H., Forrest, L. L., Hart, M. L., McHaffie, H., Brown, M. R., Hollingsworth, P. M., & De Vere, N. (2021). Barcode UK: A complete DNA barcoding resource for the flowering plants and conifers of the United Kingdom. *Molecular Ecology Resources*, 21(6), 2050–2062. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13388>
- Kartzinel, T. R., Chen, P. A., Coverdale, T. C., Erickson, D. L., Kress, W. J., Kuzmina, M. L., Rubenstein, D. I., Wang, W., & Pringle, R. M. (2015). DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African large herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26), 8019–8024. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503283112>
- Keller, A., Danner, N., Grimmer, G., Ankenbrand, M. V. D., Von Der Ohe, K., Von Der Ohe, W., Rost, S., Härtel, S., & Steffan-Dewenter, I. (2015). Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples. *Plant Biology*, 17(2), 558–566. <https://doi.org/10.1111/plb.12251>
- Kerr, J. T., & Deguise, I. (2004). Habitat loss and the limits to endangered species recovery. *Ecology Letters*, 7(12), 1163–1169. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00676.x>
- Kim, P., Kim, D., Yoon, T. J., & Shin, S. (2018). Early detection of marine invasive species, *Bugula neritina* (Bryozoa: Cheilostomatida), using species-specific primers and environmental DNA analysis in Korea. *Marine Environmental Research*, 139, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.015>
- Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Koizumi, N., Mori, A., Mineta, T., Sawada, E., Watabe, K., & Takemura, T. (2016). Exploratory environmental DNA analysis for investigating plant-feeding habit of the red-eared turtle using their feces samples. *Jurnal Teknologi*, 78(1–2), 9–12. <https://doi.org/10.11113/jt.v78.7253>
- Kowalczyk, R., Wójcik, J. M., Taberlet, P., Kamiński, T., Miquel, C., Valentini, A., Craine, J. M., & Coissac, E. (2019). Foraging plasticity allows a large herbivore to persist in a sheltering forest habitat: DNA metabarcoding diet analysis of the European bison. *Forest Ecology and Management*, 449, 117474. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117474>
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.008>
- Kudoh, A., Minamoto, T., & Yamamoto, S. (2020). Detection of herbivory: eDNA detection from feeding marks on leaves. *Environmental DNA*, 2(4), 627–634. <https://doi.org/10.1002/edn3.113>
- Lacoursière-Roussel, A., & Deiner, K. (2021). Environmental DNA is not the tool by itself. *Journal of Fish Biology*, 98(2), 383–386. <https://doi.org/10.1111/jfb.14177>
- Ladin, Z. S., Ferrell, B., Dums, J. T., Moore, R. M., Levia, D. F., Shriver, W. G., D'Amico, V., Trammell, T. L., Setubal, J. C., & Wommack, K. E. (2021). Assessing the efficacy of eDNA metabarcoding for measuring

- microbial biodiversity within forest ecosystems. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80602-9>
- Leray, M., Boehm, J. T., Mills, S. C., & Meyer, C. P. (2012). Moorea BIOCDE barcode library as a tool for understanding predator-prey interactions: Insights into the diet of common predatory coral reef fishes. *Coral Reefs*, 31, 383–388. <https://doi.org/10.1007/s00338-011-0845-0>
- Leray, M., Meyer, C. P., & Mills, S. C. (2015). Metabarcoding dietary analysis of coral dwelling predatory fish demonstrates the minor contribution of coral mutualists to their highly partitioned, generalist diet. *PeerJ*, 3, e1047. <https://doi.org/10.7717/peerj.1047>
- Luna, P., & Dáttilo, W. (2021). Disentangling plant-animal interactions into complex networks: A multi-view approach and perspectives. In K. Del-Claro & H. M. Torezan-Silingardi (Eds.), *Plant-Animal Interactions* (pp. 261–281). Springer.
- Macgregor, C. J., Kitson, J. J., Fox, R., Hahn, C., Lunt, D. H., Pocock, M. J., & Evans, D. M. (2019). Construction, validation, and application of nocturnal pollen transport networks in an agro-ecosystem: A comparison using light microscopy and DNA metabarcoding. *Ecological Entomology*, 44(1), 17–29. <https://doi.org/10.1111/een.12674>
- Macher, J. N., Vivancos, A., Piggott, J. J., Centeno, F. C., Matthaei, C. D., & Leese, F. (2018). Comparison of environmental DNA and bulk-sample metabarcoding using highly degenerate cytochrome c oxidase I primers. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1456–1468. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12940>
- Marshall, N. T., Vanderploeg, H. A., & Chaganti, S. R. (2021). Environmental (e) RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82205-4>
- Mauvisseau, Q., Harper, L., Sander, M., Hanner, R. H., Kleyer, H., & Deiner, K. (2022). The multiple states of environmental DNA and what is known about their persistence in aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, 56(9), 5322–5333. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07638>
- McElroy, M. E., Dressler, T. L., Titcomb, G. C., Wilson, E. A., Deiner, K., Dudley, T. L., Eliason, E. J., Evans, N. T., Gaines, S. D., Lafferty, K. D., & Lamberti, G. A. (2020). Calibrating environmental DNA metabarcoding to conventional surveys for measuring fish species richness. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 276. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00276>
- McKee, A. M., Spear, S. F., & Pierson, T. W. (2015). The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. *Biological Conservation*, 183, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.031>
- Meyer, J. M., Leempoel, K., Losapio, G., & Hadly, E. A. (2020). Molecular ecological network analyses: An effective conservation tool for the assessment of biodiversity, trophic interactions, and community structure. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 360. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.588430>
- Milchunas, D. G., & Lauenroth, W. K. (1993). Quantitative effects of grazing on vegetation and soils over a global range of environments: Ecological archives M063-001. *Ecological Monographs*, 63(4), 327–366. <https://doi.org/10.2307/2937150>
- Milla, L., Sniderman, K., Lines, R., Mousavi-Derazmahalleh, M., & Encinas-Viso, F. (2021). Pollen DNA metabarcoding identifies regional provenance and high plant diversity in Australian honey. *Ecology and Evolution*, 11(13), 8683–8698. <https://doi.org/10.1002/ece3.7679>
- Monge, O., Dumas, D., & Baus, I. (2020). Environmental DNA from avian residual saliva in fruits and its potential uses in population genetics. *Conservation Genetics Resources*, 12(1), 131–139. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1074-4>
- Myers, N. (1990). Mass extinctions: What can the past tell us about the present and the future? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 82(1–2), 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(12\)80031-9](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(12)80031-9)
- Nakahama, N., Furuta, T., Ando, H., Setsuko, S., Takayanagi, A., & Isagi, Y. (2021). DNA meta-barcoding revealed that sika deer foraging strategies vary with season in a forest with degraded understory vegetation. *Forest Ecology and Management*, 484, 118637. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118637>
- Newmaster, S. G., Thompson, I. D., Steeves, R. A., Rodgers, A. R., Fazekas, A. J., Maloles, J. R., McMullin, R. T., & Fryxell, J. M. (2013). Examination of two new technologies to assess the diet of woodland caribou: Video recorders attached to collars and DNA barcoding. *Canadian Journal of Forest Research*, 43(10), 897–900. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2013-0108>
- Nichols, R. V., Cromsigt, J. P., & Spong, G. (2015). DNA left on browsed twigs uncovers bite-scale resource use patterns in European ungulates. *Oecologia*, 178(1), 275–284. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3196-z>
- Nichols, R. V., Koenigsson, H., Danell, K., & Spong, G. (2012). Browsed twig environmental DNA: Diagnostic PCR to identify ungulate species. *Molecular Ecology Resources*, 12(6), 983–989. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03172.x>
- Oliver, A. E., Newbold, L. K., Gweon, H. S., Read, D. S., Woodcock, B. A., & Pywell, R. F. (2021). Integration of DNA extraction, metabarcoding and an informatics pipeline to underpin a national citizen science honey monitoring scheme. *MethodsX*, 8, 101303. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101303>
- Olsen, B. R., Troedsson, C., Hadziavdic, K., Pedersen, R. B., & Rapp, H. T. (2014). A molecular gut content study of *Themisto abyssorum* (Amphipoda) from a rctic hydrothermal vent and cold seep systems. *Molecular Ecology*, 23(15), 3877–3889. <https://doi.org/10.1111/mec.12511>
- Pacini, E., Viegi, L., & Franchi, G. G. (2008). Types, evolution and significance of plant-animal interactions. *Rendiconti Lincei*, 19(1), 75–101. <https://doi.org/10.1007/s12210-008-0005-9>
- Pegard, A., Miquel, C., Valentini, A., Coissac, E., Bouvier, F., François, D., Taberlet, P., Engel, E., & Pompanon, F. (2009). Universal DNA-based methods for assessing the diet of grazing livestock and wildlife from feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5700–5706. <https://doi.org/10.1021/jf803680c>
- Piaggio, A. J., Engeman, R. M., Hopken, M. W., Humphrey, J. S., Keacher, K. L., Bruce, W. E., & Avery, M. L. (2014). Detecting an elusive invasive species: A diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 14(2), 374–380. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12180>
- Pitteloud, C., Walsler, J. C., Descombes, P., Novaes de Santana, C., Rasmann, S., & Pellissier, L. (2021). The structure of plant-herbivore interaction networks varies along elevational gradients in the European Alps. *Journal of Biogeography*, 48(2), 465–476. <https://doi.org/10.1111/jbi.14014>
- Pompanon, F., Deagle, B. E., Symondson, W. O., Brown, D. S., Jarman, S. N., & Taberlet, P. (2012). Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 1931–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x>
- Pornon, A., Escaravage, N., Burrus, M., Holota, H., Khimoun, A., Mariette, J., Pellizzari, C., Iribar, A., Etienne, R., Taberlet, P., & Vidal, M. (2016). Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Scientific Reports*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep27282>
- Qu, C., & Stewart, K. A. (2019). Evaluating monitoring options for conservation: Comparing traditional and environmental DNA tools for a critically endangered mammal. *The Science of Nature*, 106(3), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00114-019-1605-1>
- Quéméré, E., Hibert, F., Miquel, C., Lhuillier, E., Rasolondraibe, E., Champeau, J., Rabarivola, C., Nusbaumer, L., Chatelain, C., Gautier, L., & Ranirison, P. (2013). A DNA metabarcoding study of a primate dietary diversity and plasticity across its entire fragmented range. *PLoS One*, 8(3), e58971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058971>

- Rasmussen, A. J., Nielsen, M., Mak, S. S., Döring, J., Klincke, F., Gopalakrishnan, S., Dunn, R. R., Kauer, R., & Gilbert, M. T. P. (2021). eDNA-based biomonitoring at an experimental German vineyard to characterize how management regimes shape ecosystem diversity. *Environmental DNA*, 3(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/edn3.131>
- Robledo-Arnuncio, J. J., & Garcia, C. (2007). Estimation of the seed dispersal kernel from exact identification of source plants. *Molecular Ecology*, 16(23), 5098–5109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03427.x>
- Rodriguez-Ezpeleta, N., Morissette, O., Bean, C. W., Manu, S., Banerjee, P., Lacoursière-Roussel, A., Beng, K. C., Alter, S. E., Roger, F., Holman, L. E., Stewart, K. A., Monaghan, M. T., Mauvisseau, Q., Mirimin, L., Wangenstein, O. S., Antognazza, C. M., Helyar, S. J., Boer, H., Monchamp, M., ... Deiner, K. (2021). Trade-offs between reducing complex terminology and producing accurate interpretations from environmental DNA: Comment on “environmental DNA: What’s behind the term?” by Pawlowski et al., (2020). *Molecular Ecology*, 30, 4601–4605. <https://doi.org/10.1111/mec.15942>
- Román-Palacios, C., & Wiens, J. J. (2020). Recent responses to climate change reveal the drivers of species extinction and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(8), 4211–4217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913007117>
- Roslin, T., & Majaneva, S. (2016). The use of DNA barcodes in food web construction—Terrestrial and aquatic ecologists unite! *Genome*, 59(9), 603–628. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0229>
- Sargent, R. D., & Ackerly, D. D. (2008). Plant–pollinator interactions and the assembly of plant communities. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(3), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.11.003>
- Sassoubre, L. M., Yamahara, K. M., Gardner, L. D., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2016). Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environmental Science & Technology*, 50(19), 10456. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03114>
- Schallhart, N., Tusch, M. J., Wallinger, C., Staudacher, K., & Traugott, M. (2012). Effects of plant identity and diversity on the dietary choice of a soil-living insect herbivore. *Ecology*, 93(12), 2650–2657. <https://doi.org/10.1890/11-2067.1>
- Sheppard, S. K., Bell, J., Sunderland, K. D., Fenlon, J., Skervin, D., & Symondson, W. O. C. (2005). Detection of secondary predation by PCR analyses of the gut contents of invertebrate generalist predators. *Molecular Ecology*, 14, 4461–4468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02742.x>
- Sheth, B. P., & Thaker, V. S. (2017). DNA barcoding and traditional taxonomy: An integrated approach for biodiversity conservation. *Genome*, 60(7), 618–628. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0167>
- Simmons, B. I., Wauchope, H. S., Amano, T., Dicks, L. V., Sutherland, W. J., & Dakos, V. (2020). Estimating the risk of species interaction loss in mutualistic communities. *PLoS Biology*, 18(8), e3000843. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000843>
- Singh, G. B. (2015). *Fundamentals of bioinformatics and computational biology*. Springer.
- Soininen, E. M., Zinger, L., Gielly, L., Yoccoz, N. G., Henden, J. A., & Ims, R. A. (2017). Not only mosses: lemming winter diets as described by DNA metabarcoding. *Polar Biology*, 40(10), 2097–2103. <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2114-3>
- Stewart, K. A. (2019). Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation*, 28(5), 983–1001. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01709-8>
- Stewart, K., Ma, H., Zheng, J., & Zhao, J. (2017). Using environmental DNA to assess population-wide spatiotemporal reserve use. *Conservation Biology*, 31(5), 1173–1182. <https://doi.org/10.1111/cobi.12910>
- Stewart, K. A., & Taylor, S. A. (2020). Leveraging eDNA to expand the study of hybrid zones. *Molecular Ecology*, 29(15), 2768–2776. <https://doi.org/10.1111/mec.15514>
- Symondson, W. O. C. (2002). Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 11(4), 627–641. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01471.x>
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- ter Schure, A. T., Pillai, A. A., Thorbek, L., Bhavani Shankar, M., Puri, R., Ravikanth, G., de Boer, H. J., & Boessenkool, S. (2021). eDNA metabarcoding reveals dietary niche overlap among herbivores in an Indian wildlife sanctuary. *Environmental DNA*, 3(3), 681–696. <https://doi.org/10.1002/edn3.168>
- Thomsen, P. F., & Sigsgaard, E. E. (2019). Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods. *Ecology and Evolution*, 9(4), 1665–1679. <https://doi.org/10.1002/ece3.4809>
- Tillotson, M. D., Kelly, R. P., Duda, J. J., Hoy, M., Kralj, J., & Quinn, T. P. (2018). Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, 220, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.01.030>
- Tournayre, O., Leuchtman, M., Galan, M., Trillat, M., Piry, S., Pinaud, D., Filippi-Codaccioni, O., Pontier, D., & Charbonnel, N. (2021). eDNA metabarcoding reveals a core and secondary diets of the greater horseshoe bat with strong spatio-temporal plasticity. *Environmental DNA*, 3(1), 277–296. <https://doi.org/10.1002/edn3.167>
- Tsuri, K., Ikeda, S., Hirohara, T., Shimada, Y., Minamoto, T., & Yamanaka, H. (2021). Messenger RNA typing of environmental RNA (eRNA): A case study on zebrafish tank water with perspectives for the future development of eRNA analysis on aquatic vertebrates. *Environmental DNA*, 3(1), 14–21. <https://doi.org/10.1002/edn3.169>
- UK National Ecosystem Assessment. (2011). *The UK national ecosystem assessment: Synthesis of the key findings*. UNEP-WCMC <https://www.unep-wcmc.org/resources-and-data/the-uk-national-ecosystem-assessment-synthesis-of-the-key-findings-and-technical-reports>
- Utzeri, V. J., Schiavo, G., Ribani, A., Tinarelli, S., Bertolini, F., Bovo, S., & Fontanesi, L. (2018). Entomological signatures in honey: An environmental DNA metabarcoding approach can disclose information on plant-sucking insects in agricultural and forest landscapes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27933-w>
- Valentin, R. E., Fonseca, D. M., Gable, S., Kyle, K. E., Hamilton, G. C., Nielsen, A. L., & Lockwood, J. L. (2020). Moving eDNA surveys onto land: Strategies for active eDNA aggregation to detect invasive forest insects. *Molecular Ecology Resources*, 20(3), 746–755. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13151>
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011>
- Valiente-Banuet, A., Aizen, M. A., Alcántara, J. M., Arroyo, J., Cocucci, A., Galetti, M., García, M. B., García, D., Gómez, J. M., Jordano, P., & Medel, R. (2015). Beyond species loss: The extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology*, 29(3), 299–307. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12356>
- van Beeck Calkoen, S. T., Leigh-Moy, K., Cromsigt, J. P. G. M., Spong, G., Lebeau, L. C., & Heurich, M. (2019). The blame game: Using eDNA to identify species-specific tree browsing by red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in a temperate forest. *Forest Ecology and Management*, 451, 117483. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117483>

- Veilleux, H. D., Misutka, M. D., & Glover, C. N. (2021). Environmental DNA and environmental RNA: Current and prospective applications for biological monitoring. *Science of the Total Environment*, 46891, 146891. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146891>
- Wang, K., Xie, H., Li, Y., Wu, W. J., & Xu, C. L. (2016). Morphology and molecular analysis of *Paratylenchus nanjingensis* n. sp.(Nematoda: Paratylenchinae) from the rhizosphere soil of *Pinus massoniana* in China. *Journal of Helminthology*, 90(2), 166–173. <https://doi.org/10.1017/S0022149X14000819>
- Wirta, H. K., Hebert, P. D. N., Kaartinen, R., Prosser, S. W., Várkonyi, G., & Roslin, T. (2014). Complementary molecular information changes our perception of food web structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 111, 1885–1890. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316990111>
- Wirta, H., Várkonyi, G., Rasmussen, C., Kaartinen, R., Schmidt, N. M., Hebert, P. D. N., Bartak, M., Blagoev, G., Disney, H., Ertl, S., Gjelstrup, P., Gwiazdowicz, D. J., Huldén, L., Ilmonen, J., Jakovlev, J., Jaschhof, M., Kahanpää, J., Kankaanpää, T., Krogh, P. H., ... Roslin, T. (2016). Establishing a community-wide DNA barcode library as a new tool for arctic research. *Molecular Ecology Resources*, 16(3), 809–822. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12489>
- Wirta, H. K., Vesterinen, E. J., Hambäck, P. A., Weingartner, E., Rasmussen, C., Reneerkens, J., Schmidt, N. M., Gilg, O., & Roslin, T. (2015). Exposing the structure of an Arctic food web. *Ecology and Evolution*, 5(17), 3842–3856. <https://doi.org/10.1002/ece3.1647>
- Wirta, H. K., Weingartner, E., Hambäck, P. A., & Roslin, T. (2015). Extensive niche overlap among the dominant arthropod predators of the high Arctic. *Basic and Applied Ecology*, 16(1), 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2014.11.003>
- Wirth, R., Meyer, S. T., Leal, I. R., & Tabarelli, M. (2008). *Progress in botany*. Plant herbivore interactions at the forest edge (pp. 423–448). Springer.
- Xie, Y., Wang, J., Yang, J., Giesy, J. P., Yu, H., & Zhang, X. (2017). Environmental DNA metabarcoding reveals primary chemical contaminants in freshwater sediments from different land-use types. *Chemosphere*, 172, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.117>

**How to cite this article:** Banerjee, P., Stewart, K. A., Antognazza, C. M., Bunholi, I. V., Deiner, K., Barnes, M. A., Saha, S., Verdier, H., Doi, H., Maity, J. P., Chan, M. W., Chen, C. Y. (2022). Plant–animal interactions in the era of environmental DNA (eDNA)—A review. *Environmental DNA*, 4, 987–999. <https://doi.org/10.1002/edn3.308>