



HAL
open science

Intérêts et enjeux de l'utilisation de l'ADN environnemental pour l'inventaire, le suivi et la surveillance de la biodiversité des milieux dulcicoles, marins et terrestres

Aurélie Lacoeylle, Katia Hérard, Laurent Poncet, Julien Touroult

► To cite this version:

Aurélie Lacoeylle, Katia Hérard, Laurent Poncet, Julien Touroult. Intérêts et enjeux de l'utilisation de l'ADN environnemental pour l'inventaire, le suivi et la surveillance de la biodiversité des milieux dulcicoles, marins et terrestres. *PatriNat* (OFB-MNHN-CNRS-IRD). 2024, pp.52. hal-04561160

HAL Id: hal-04561160

<https://hal.science/hal-04561160>

Submitted on 21 May 2024

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.

CENTRE D'EXPERTISE ET DE DONNÉES SUR LA NATURE

Intérêts et enjeux de l'utilisation de l'ADN environnemental

pour l'inventaire,
le suivi et
la surveillance
de la biodiversité
des milieux
dulcicoles,
marins et
terrestres.

Avril 2024

Intérêts et enjeux de l'utilisation de l'ADN environnemental pour l'inventaire, le suivi et la surveillance de la biodiversité des milieux dulcicoles, marins et terrestres.



PATRINAT
Centre d'expertise et de données
sur le patrimoine naturel

Un service commun
de l'Office français de la biodiversité,
du Muséum national d'Histoire naturelle,
du Centre national de la recherche scientifique
et de l'Institut pour la recherche et le développement

Ce document est le résultat d'un travail collectif grâce aux connaissances, réflexions, et retours d'expériences d'experts. Toutes les personnes qui y ont contribué sont chaleureusement remerciées, particulièrement les experts consultés : MNHN : Jean-Luc JUNG ; OFB : POULET Nicolas, UDO Hélène ; ONF : TILLON Laurent ; PatriNat : DENYS Gaël, DUPONT Pascal, GAZAY Camille, HAFFNER Patrick, LEONARD Lilian, LEVEQUE Antoine, de MASSARY Jean-Christophe, MASSE Cécile, PONCET Rémy, ROME Quentin, SOUQUIERE Anne, WROZA Stanislas ; Vigilife : DEJEAN Tony, GABORIAUD Coline, GIRAUD Carolane, MOUILLOT David, MULOT Baptiste, PRESSIAT Franck, PRIE Vincent, VALENTINI Alice.

Ce document est une synthèse de la littérature et d'échanges à la fois avec des experts de l'ADN environnemental (ADNe) et avec des experts de différents groupes taxinomiques, utilisateurs ou non de l'ADNe. En tant que synthèse, ce document ne vise pas l'exhaustivité du sujet et il est d'ailleurs davantage question de l'étude de l'ADNe dans les milieux aquatiques que dans les sols. Après avoir défini ce qu'est l'ADNe et souligné quelques éléments techniques, il présente les intérêts et les enjeux liés à l'ADNe dans le cadre de la connaissance et la surveillance de la biodiversité dans les milieux dulcicoles, marins et terrestres. Il identifie les attentes des experts et propose enfin quelques perspectives de recherche en écologie et en sciences de la conservation.

Il fait l'objet d'un document de 4 pages : LACOEUILHE A., HERARD K., PONCET L., TOUROULT J., (coord.) 2024. Zoom sur l'ADN environnemental - Synthèse du document : "Intérêts et enjeux de l'utilisation de l'ADN environnemental pour l'inventaire, le suivi et la surveillance de la biodiversité des milieux dulcicoles, marins et terrestres". PatriNat (OFB-MNHN-CNRS-IRD), Paris. 4p. <https://hal.science/hal-04561189>

Il est possible qu'au moment où vous le lisez, certains éléments manquent ou soient contredits ou complétés par des publications récentes, particulièrement ceux relatifs aux techniques moléculaires qui évoluent très vite. Ce document nécessitera donc d'être mis à jour périodiquement. Nous recommandons ainsi aux lecteurs de garder à l'esprit que des progrès rapides sont réalisés en ADNe actuellement et de ne pas hésiter à nous contacter pour nous signaler certaines informations.

Contact : patrinat.fr

Image de la 1^{er} de couverture : image générée avec IA Bing. Crédits photos : p6 Pixabay, pages 13-36-37 A. Lacoeuilhe, pages 16-17 Spygen, page 51 image générée avec une IA Bing.

Référence du rapport conseillée : LACOEUILHE A., HERARD K., PONCET L., TOUROULT J., (coord.) 2024. Intérêts et enjeux de l'utilisation de l'ADN environnemental pour l'inventaire, le suivi et la surveillance de la biodiversité des milieux dulcicoles, marins et terrestres. PatriNat (OFB-CNRS-MNHN), Paris. 52p. <https://hal.science/hal-04561160>

Mise en page : Thomas Sauvage - Graphiste - Freelance - www.thomas Sauvage.com



PATRINAT

CENTRE D'EXPERTISE ET DE DONNÉES SUR LA NATURE

Dans une unité scientifique associant des ingénieurs, des experts et des spécialistes de la donnée, PatriNat rapproche les compétences et les moyens de ses quatre tutelles que sont l'OFB, le MNHN, le CNRS et l'IRD. PatriNat coordonne des programmes nationaux d'acquisition de connaissance pour cartographier les écosystèmes, les espèces et les aires protégées, surveiller les tendances de la biodiversité terrestre et marine, répertorier les zones clés pour la conservation de la nature (Znieff), et produire des référentiels scientifiques et techniques (TaxRef, HabRef, etc.). Ces programmes associent de nombreux partenaires et fédèrent les citoyens à travers des observatoires de sciences participatives (tels que Vigie-Nature, INPN espèces ou Vigie-terre).

PatriNat développe des systèmes d'information permettant de standardiser, partager, découvrir, synthétiser et archiver les données aussi bien pour les politiques publiques (SIB, SINP) que pour la recherche (PNDB)

en assurant le lien avec les systèmes internationaux (GBIF, CDDA, etc.). PatriNat apporte son expertise dans l'interprétation des données pour accompagner les acteurs et aider les décideurs à orienter leurs politiques : production d'indicateurs, notamment pour l'Observatoire national de la biodiversité (ONB) et des livrets de chiffres clés, élaboration des Listes rouges des espèces et écosystèmes menacés, revues systématiques, préparation des rapportages pour les directives européennes, élaboration d'outils de diagnostic de la biodiversité pour les acteurs des territoires, ou encore évaluation de l'efficacité des mesures de restauration. PatriNat organise également l'autorité scientifique CITES pour la France. L'ensemble des informations (de la donnée brute à la donnée de synthèse) est rendu publique dans les portails NatureFrance, INPN et Compteur BIOM.

En savoir plus : www.patrinat.fr

Co-directeurs : Laurent PONCET et Julien TOUROULT



NATUREFRANCE

LE SERVICE PUBLIC D'INFORMATION SUR LA BIODIVERSITÉ

NatureFrance représente le service public d'information sur les politiques publiques de biodiversité en France. Il se décline dans plusieurs portails d'information, dont le portail général naturefrance.fr. Destiné à un public aussi large que possible, il propose des clés de lecture des grands enjeux liés à la biodiversité et à son évolution, aux pressions qu'elle subit, et aux réponses de la société. NatureFrance présente des chiffres clés, des indicateurs développés dans le cadre de l'ONB (Observatoire national de la biodiversité), des articles et des publications, issus de l'analyse scientifique des données provenant des

politiques publiques de conservation ou d'activités socio-économiques favorables ou défavorables à la biodiversité.

Dans le cadre de cette mission confiée par l'OFB, PatriNat gère ce portail et participe au traitement, à l'analyse et à l'interprétation d'une partie des données versées sur NatureFrance : par exemple, celles provenant du Système d'information de l'inventaire du patrimoine naturel (SINP) ou encore du Système d'information de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (SI CITES).

En savoir plus : naturefrance.fr



INVENTAIRE NATIONAL DU PATRIMOINE NATUREL

LE PORTAIL DE LA BIODIVERSITÉ ET DE LA GÉODIVERSITÉ FRANÇAISES, DE MÉTROPOLITE ET D'OUTRE-MER

Dans le cadre de NatureFrance, l'Inventaire national du patrimoine naturel (INPN) est le portail de la biodiversité et de la géodiversité françaises, de métropole et d'outre-mer (www.inpn.fr). Il regroupe et diffuse les informations sur l'état et les tendances du patrimoine naturel français terrestre et marin (espèces animales, végétales, fongiques et microbiennes actuelles et anciennes, habitats naturels, espaces protégés et géologie) en France métropolitaine et ultramarine.

Les données proviennent du Système d'information de l'inventaire du patrimoine naturel (SINP) et de l'ensemble des réseaux associés. PatriNat organise au niveau national la gestion, la validation, la centralisation et la diffusion de ces informations. L'inventaire consolidé qui en résulte

est l'aboutissement d'un travail associant scientifiques, collectivités territoriales, naturalistes et associations de protection de la nature, en vue d'établir une synthèse régulièrement mise à jour du patrimoine naturel en France.

L'INPN est un dispositif de référence français pour la connaissance naturaliste, l'expertise, la recherche en macroécologie et l'élaboration de stratégies de conservation efficaces du patrimoine naturel. L'ensemble de ces informations sont mises à la disposition de tous, professionnels, amateurs et citoyens.

En savoir plus : www.inpn.fr



 vigilife.org	Une alliance internationale de partenaires publics et privés pour développer un Observatoire mondial du vivant		
	NOTRE MISSION Mettre l'innovation au service de la connaissance et de la protection du vivant	NOS VALEURS Innovation / Exigence / Partage / Engagement	
NOS OBJECTIFS	Evaluer Inventorier la biodiversité grâce à des méthodes ADN standardisées et suivre ses changements sur le plus grand nombre d'écosystèmes à travers le monde.	Veiller Prévenir le déclin des espèces les plus menacées de notre planète, et améliorer la détection précoce et le suivi des espèces exotiques envahissantes et des pathogènes, notamment au niveau des principales voies d'introduction.	Comprendre Analyser et modéliser les données recueillies à l'échelle mondiale afin d'améliorer les connaissances sur la biodiversité et de mieux anticiper l'impact des changements globaux sur l'ensemble du vivant.
	Innover Poursuivre en permanence les travaux de recherche et développement afin de proposer des technologies toujours plus performantes, respectueuses de l'environnement et accessibles au plus grand nombre.	Fédérer Réunir des partenaires publics et privés engagés, afin de multiplier les sites d'observation et de permettre une large utilisation des données collectées.	Former Décentraliser les moyens d'expertise ADN, grâce à du transfert de compétences et de technologies, afin que chaque partenaire puisse traiter ses échantillons sur son territoire et que chaque pays reste souverain sur l'utilisation de ses ressources génétiques.
	Orienter Offrir à tous les décideurs des informations fiables et mises à jour, grâce à des indicateurs synthétiques et validés scientifiquement, afin de guider la mise en place d'actions de conservation, de restauration, ou de changement de pratiques.	Sensibiliser Accompagner les acteurs publics et privés pour une meilleure prise en compte de la biodiversité dans leurs activités et informer le grand public sur son importance et sa fragilité.	Valoriser Mettre en valeur les bonnes pratiques et les actions inspirantes permettant de préserver le vivant, notamment celles menées par les populations autochtones.
	Pérenniser Doter Vigilife de moyens financiers pérennes lui permettant de poursuivre sa mission sur le long terme, grâce notamment à l'engagement du monde économique dans son fonctionnement.	MEMBRES FONDATEURS	
			

TABLE DES MATIÈRES

1	→ Éléments de contexte	6
1.1	Qu'est-ce que l'ADN environnemental ?	7
1.2	Ecologie de l'ADNe	7
1.2.1	<i>Origine et production de l'ADNe</i>	8
1.2.2	<i>Etats de l'ADNe</i>	9
1.2.3	<i>Transport, sédimentation et adsorption de l'ADNe</i>	9
1.2.4	<i>Persistance et dégradation de l'ADNe</i>	9
1.3	Deux approches possibles pour l'identification des espèces à partir d'ADNe	9
1.4	Une recherche récente en plein essor	11
2	→ Considérations techniques, méthodes et protocoles	14
2.1	Du terrain à l'identification des espèces : les différentes étapes	14
2.2	Protocoles et stratégies d'échantillonnage sur le terrain	15
2.2.1	<i>Adaptation des protocoles de terrain et des stratégies d'échantillonnage en fonction des milieux et de l'objectif visé</i>	15
2.2.2	<i>Conservation des échantillons</i>	16
2.3	Techniques et méthodes de laboratoire	17
2.3.1	<i>Procédures des laboratoires d'analyse</i>	17
2.3.2	<i>Marqueurs et couples d'amorces</i>	17
2.3.3	<i>Amplification de l'ADN</i>	19
2.3.3.1	Amplification dans le cas de l'approche multispécifique par metabarcoding de l'ADNe	19
2.3.3.2	Amplification dans le cas de l'approche spécifique et quantification relative	19
2.3.4	<i>Séquençage moléculaire</i>	20
2.4	Analyses bioinformatiques	20
2.5	Bases de référence	20
2.6	Interprétation des résultats	24
3	→ Intérêts, limites actuelles et enjeux à travers les multiples applications de l'ADNe	25
3.1	Intérêts et avantages de l'ADNe	26
3.2	Limites de l'ADNe et points de vigilance	29
3.3	Besoin de standardisation	30
3.4	Exemples et enjeux de l'utilisation de l'ADNe par milieu – synthèse d'avis d'experts et de la bibliographie	30
3.4.1	<i>Exemples et enjeux de l'utilisation de l'ADNe dans les milieux dulcicoles</i>	30
3.4.1.1	Exemples d'utilisation de l'ADNe en milieu dulcicole	31
3.4.1.2	Enjeux et perspectives en milieu dulcicole	32
3.4.2	<i>Exemples et enjeux de l'utilisation de l'ADNe dans les milieux marins</i>	32
3.4.2.1	Exemples d'utilisation de l'ADNe en milieu marin	32
3.4.2.2	Enjeux et perspectives en milieu marin	33
3.4.3	<i>Exemples et enjeux de l'utilisation de l'ADNe dans les milieux terrestres</i>	35
3.4.3.1	Exemples d'utilisation de l'ADNe en milieu terrestre	35
3.4.3.2	Enjeux et perspectives en milieu terrestre	36
4	→ Perspectives de recherche	38
4.1	Détection de nouveaux taxons et approche « taxinomy free »	38
4.2	Etude des aspects fonctionnels	38
4.3	Approche quantitative	39
4.4	Exploration de nouveaux milieux	40
4.5	Utilisation de l'ARN environnemental (ARNe)	40
4.6	ADNe en complément et/ou associés à d'autres technologies	40
4.7	Réduction de la consommation des ressources	42
4.8	Approche par les sciences participatives et éducatives	42
4.9	Approche par les sciences humaines et sociales	42
5	→ Bibliographie	43

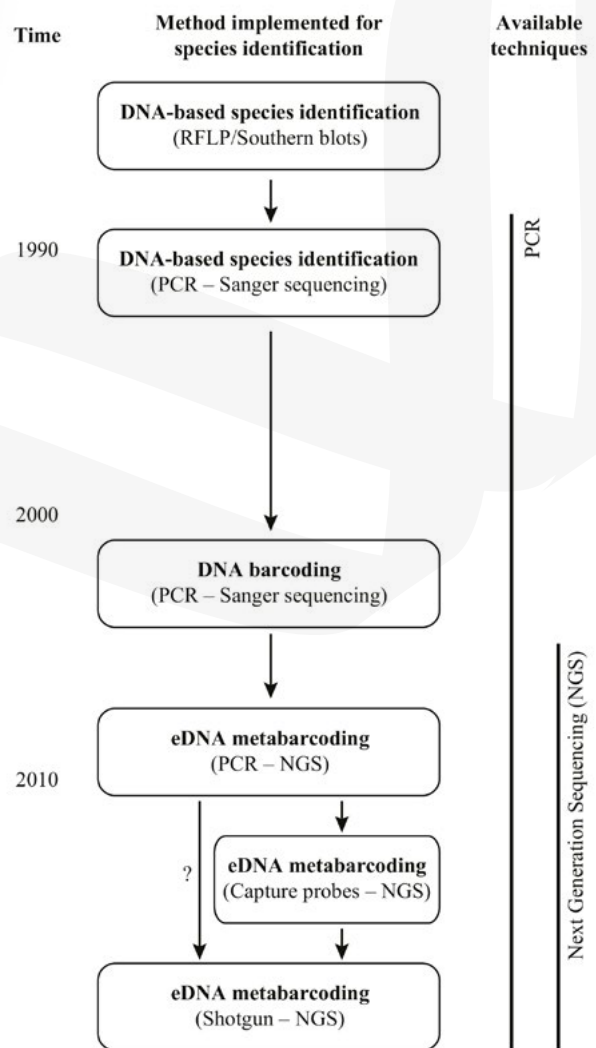
TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Evolution de l'identification des espèces fondées sur l'ADN depuis 1990 (Taberlet <i>et al.</i> , 2012 b).....	6
Figure 2 : L'ADN environnemental peut être extrait depuis l'eau, le sol, les sédiments, l'air ou les fèces (© Lacoeuilhe A. et Pixabay).7	
Figure 3 : Diagramme schématique de l'écologie de l'ADNe montrant les facteurs influant les processus de présence et de persistance de l'ADN dans l'environnement (© Lacoeuilhe A. et Pixabay, d'après Barnes & Turner, 2016 et Wang <i>et al.</i> , 2021).....	8
Figure 4 : Proposition de terminologies pour l'identification des taxons à base d'ADN selon le type de marqueur utilisé, le niveau d'identification et la complexité de la matrice d'où est extrait l'ADN d'après Taberlet <i>et al.</i> (2012 a) (images © A. Lacoeuilhe et Pixabay).....	10
Figure 5 : Nombre annuel d'articles publiés sur l'ADNe en écologie et biologie depuis 1987 (© Web of Science).....	11
Figure 6 : Domaines de recherche correspondant aux 3945 publications traitant d'ADNe regroupées selon les catégories définies dans Web of Science (© Web of Science).....	11
Figure 7 : Nombre d'études utilisant l'ADNe récupérées à partir d'une recherche documentaire avec les mots « environmental DNA » ou « eDNA » pour la période comprise entre le 1 ^{er} janvier 2008 et le 31 décembre 2019 selon l'écosystème étudié (en haut) et le groupe d'organismes étudiés (en bas) d'après Beng & Corlett (2020).....	12
Figure 8 : Un diagramme de Sankey montrant le nombre de publications, les types de systèmes aquatiques et les groupes de taxons trouvés à partir de la recherche documentaire Scopus avec les requêtes « environmental DNA » ou « eDNA » entre 2012 et 2021. À gauche, quatre méthodes d'identification de l'ADNe (spécifique, metabarcoding, métagénomique shotgun et autres) ont été trouvés, avec ce diagramme illustrant les tendances du nombre de publications, du système aquatique et des taxons cibles entre 2012 et 2021 pour chaque méthode (Takahashi <i>et al.</i> , 2023).....	12
Figure 9 : Nombre d'études ayant utilisé l'ADNe pour différents groupes taxinomiques et comparaison de résultats en fonction des approches : rouge signifie que l'utilisation de l'ADNe a été plus performant que les méthodes traditionnelles, vert que les approches étaient équivalentes, violet que les méthodes traditionnelles ont été plus performantes que l'ADNe et en bleu qu'aucune comparaison n'a été effectuée (Fediajevaite <i>et al.</i> , 2021).....	13
Figure 10 : Principales étapes d'une approche multispécifique par metabarcoding de l'ADNe dans l'eau : du prélèvement de l'échantillon sur le terrain à l'obtention d'une liste de taxons (© Lacoeuilhe A. et Pixabay).....	14
Figure 11 : Représentation schématique d'un couple d'amorces au niveau d'un marqueur, comprenant le site d'hybridation, sur un fragment d'ADN.....	18
Figure 12 : Comparaisons taxinomiques des communautés de micro-eucaryotes avant pollution et après pollution, à partir de sédiments par l'étude de l'ADNe (Bik <i>et al.</i> , 2012).....	28
Figure 13 : Comparaison des indices Infaunal Trophic Index (ITI) et AZTI's Marine Biotic Index (AMBI) obtenus par partir de méthode traditionnelle (Morpho-espèces), ADN et ARN (B- pour chaque station sont indiquées les valeurs AMBI calculées sur la base soit de la diversité de Shannon (H-AMBI ; barres peu hachurées), de la richesse spécifique (S-AMBI ; barres densément hachurées) ou des deux (M-AMBI ; barres simples) (Lejzerowicz <i>et al.</i> , 2015).....	28
Figure 14 : Carte illustrant les proportions de publications ciblant les écosystèmes aquatiques sur sept continents. Les méthodes d'identification (spécifiques à l'espèce, metabarcoding, métagénomique shotgun et autres (génotypage de type SNP et spécifiques aux animaux génétiquement modifiés)) par région sont indiquées dans les graphiques circulaires. Les études sont attribuées au pays et au continent en fonction de l'endroit où le travail de terrain a été mené (Takahashi <i>et al.</i> , 2023).....	31
Figure 15 : Changements dans les communautés du sol d'Eucaryotes (à gauche) et de bactéries (à droite) dans une parcelle d'un ha dans une forêt tropicale (réserve des Nouragues, Guyane française). La couche arable (0 à 10 cm) a été échantillonnée à l'aide de points d'échantillonnage régulièrement espacés (maillage de 10 m) en avril (saison humide) et en novembre (saison sèche) 2012 (Taberlet <i>et al.</i> , 2018).....	39
Figure 16 : Classements des technologies utilisées pour la connaissances appliquées à la conservation, de la performance globale actuelle (à gauche) à la capacité potentielle de faire progresser la conservation (à droite) (en bleu celles perçues comme ayant le potentiel inexploité le plus élevé) © WILDLABS.....	41
Tableau 1 : Régions mitochondriales, chloroplastiques ou nucléaires couramment utilisées pour la conception des marqueurs en fonction des groupes taxinomiques.....	18
Tableau 2 : Bases de référence extrait de Taberlet <i>et al.</i> (2018).....	22

1. ÉLÉMENTS DE CONTEXTE

Au regard de l'enjeu de connaissance sur les espèces dans un contexte où la perte de biodiversité n'est plus à démontrer, il est important d'utiliser toutes les techniques efficaces disponibles pour l'inventaire, le suivi et la surveillance des espèces notamment pour maintenir une connaissance actualisée et relativement fine de leur répartition. Si les suivis se font encore beaucoup par détection visuelle et comptage, les sources de données sur la biodiversité sont désormais multiples : expertise, enregistrement traité par intelligence artificielle, imagerie satellitaire et aéroportée, techniques moléculaires, etc. Ces dernières connaissent notamment une forte augmentation depuis quelques années (Makiola *et al.*, 2020), et les cas d'usage se multiplient (ex. Prié *et al.*, 2023 ; Agostinotto *et al.*, 2022 ; Arjona *et al.*, 2022 ; Waterhouse *et al.*, 2022 ; Hongsanan *et al.*, 2018 ; Kelly *et al.*, 2019 ; Valentini *et al.*, 2016 ; Taberlet *et al.*, 2012 a ; Dejean *et al.*, 2012). Le développement des techniques moléculaires au cours de ces trente dernières années a permis d'améliorer significativement la connaissance des espèces (Figure 1).

En parallèle, les compétences naturalistes et taxinomiques se raréfient avec certaines spécialités où il devient pratiquement impossible de trouver des experts capables d'identifier morphologiquement les espèces (Stroud *et al.*, 2022; Engel *et al.*, 2021; Pentinsaari, *et al.*, 2020). Or, des erreurs d'identification peuvent entraîner une cascade de problèmes, notamment dans le cadre des évaluations environnementales (Bortolus, 2008), de la gestion de la biodiversité (Browett *et al.*, 2020 ; Dudgeon *et al.*, 2006), de la santé publique et des personnes, ou de la production industrielle. Les techniques moléculaires constituent ainsi une source majeure de données complémentaires de plus en plus usitées, notamment pour des applications taxinomiques (ex. codes-barres ADN ou « DNA barcoding » (voir 1.3) d'un ou plusieurs loci¹), et pour l'évaluation pour la gestion de la biodiversité notamment avec l'utilisation de l'ADN environnemental (ADNe) (Heuertz *et al.*, 2023 ; Rourke *et al.*, 2022). Soulignons ici que **l'expertise des taxinomistes est essentielle** notamment pour la description de nouvelles espèces mais aussi pour permettre la mise au point de nouvelles séquences de référence (voir 2.5), préalable indispensable dans le processus d'assignation taxinomique.



↑ Figure 1 : Evolution de l'identification des espèces fondées sur l'ADN depuis 1990 (Taberlet *et al.*, 2012 b)

1 - Emplacement précis d'un gène sur le chromosome qui le porte

1.1 Qu'est-ce que l'ADN environnemental ?

L'ADN environnemental, ou **ADNe**, correspond à l'**ADN² extrait à partir d'échantillons environnementaux** – comme l'eau, les sols, les sédiments, l'air ou les fèces, (Figure 2) – sans avoir besoin d'isoler les organismes au préalable (Taberlet *et al.*, 2012 a).

Figure 2 : L'ADNe peut être extrait depuis l'eau, les sols, les sédiments, l'air ou les fèces (© Lacoëuilhe A. et Pixabay). ↓



Par abus de langage ou extension, le terme « ADNe » est aussi utilisé pour désigner **l'ensemble des méthodes et/ou techniques voire technologies** qui permettent d'étudier la biodiversité à partir des fragments d'ADN prélevés dans le milieu. L'étude de l'ADNe est ainsi une approche innovante, en plein essor, qui permet d'identifier la présence actuelle ou passée d'une ou plusieurs espèces (Thomsen & Willerslev, 2015).

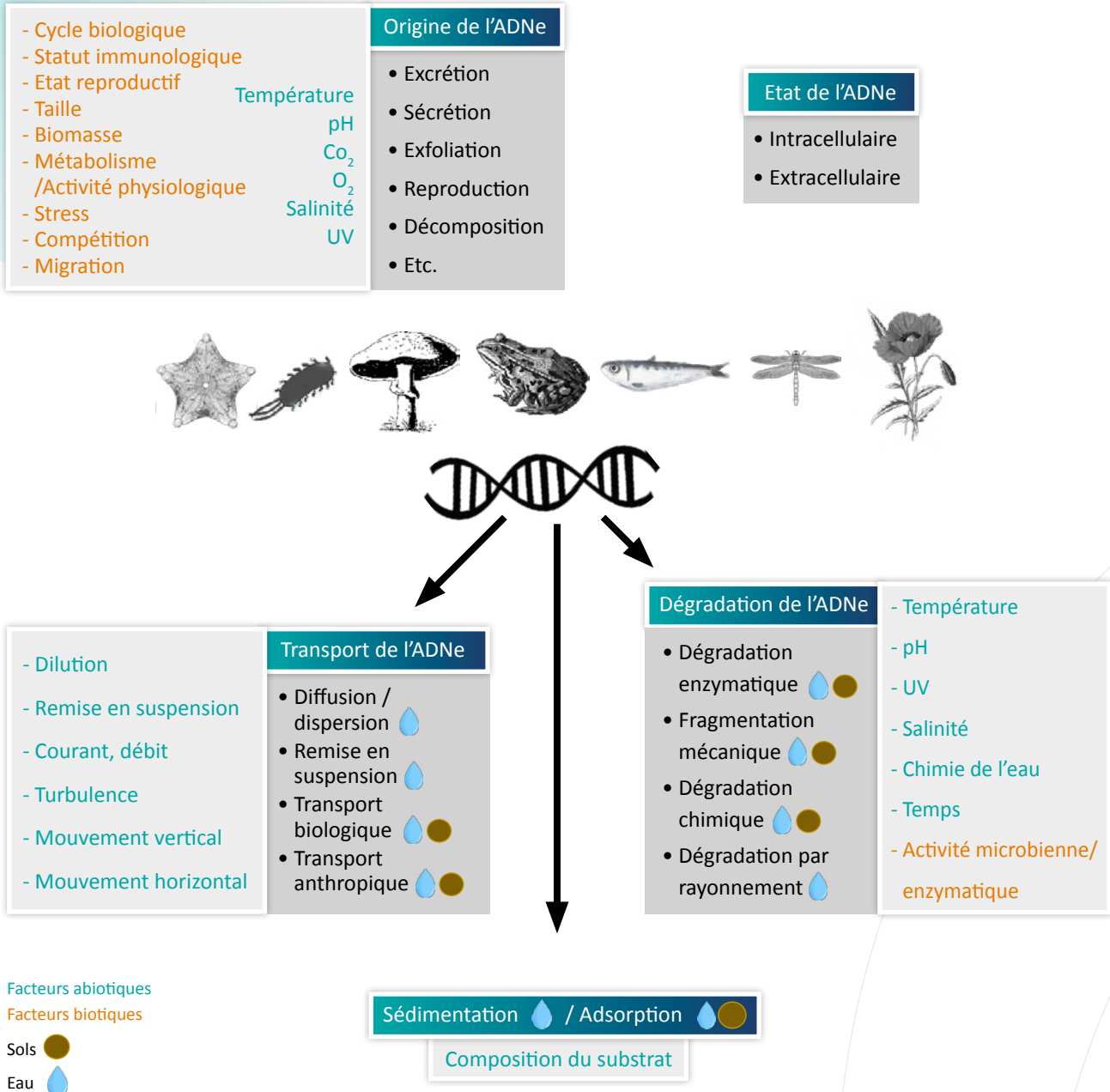
1.2 Écologie de l'ADNe

La présence et la quantité des molécules d'ADN dépendent de différents paramètres. Elles sont variables en fonction des espèces et évoluent en fonction des conditions du milieu. Les molécules d'ADN peuvent en effet être dégradées par des facteurs biotiques (bactéries, champignons, endonucléases, etc.) et abiotiques (radiations UV, acidité, température, etc.) ou persister dans le milieu en étant adsorbées sur des particules organiques ou inorganiques (souvent sous la forme de très courts fragments d'ADN³) (Stewart, 2019 ;

Levy-Booth *et al.*, 2007). Quatre processus constituent ce qu'on appelle l'« écologie de l'ADNe » définie par Barnes & Turner (2016) : 1. l'origine de l'ADNe et la production des molécules d'ADN par les organismes vivants, 2. l'état de l'ADNe dans le milieu c'est-à-dire les différentes formes physiques des molécules d'ADN, 3. sa distance de transport depuis son origine et 4. sa persistance dans le milieu. Un cinquième processus, à l'interface entre transport et dégradation, peut être distingué : la sédimentation/absorption (Figure 3).

2 - Ou acide désoxyribonucléique = molécule présente dans presque toutes les cellules ainsi que chez de nombreux virus. Les molécules d'ADN sont formées de deux brins enroulés l'un autour de l'autre pour former une double hélice. Elles sont notamment constituées de nucléotides. Chaque nucléotide est formé d'une base nucléique, ou base azotée — adénine (A), cytosine (C), guanine (G) ou thymine (T) liée à un désoxyribose lui-même lié à groupe phosphate.

3 - parfois inférieurs à 100 paires de bases.



↑ Figure 3 : Diagramme schématisque de l'écologie de l'ADNe montrant les facteurs influant les processus de présence et de persistance de l'ADN dans l'environnement (© Lacoecilhe A. et Pixabay, d'après Barnes & Turner, 2016 et Wang *et al.*, 2021)

1.2.1. ORIGINE ET PRODUCTION DE L'ADNe

Les molécules d'ADN présentes dans un milieu peuvent provenir des organismes vivants via des cellules desquamées, des excréments (ex. salive, mucus), des déjections (ex. fèces, urine), des gamètes, des œufs, du sang, ou encore des racines, des feuilles, des fruits, du pollen mais aussi d'organismes en décomposition. Notons que les micro-organismes et les organismes entiers de petite taille (larves par exemple) peuvent être contenus dans leur intégralité dans les échantillons.

La production d'ADN varie en fonction des espèces et dépend de la densité d'individus présents et de leur

biomasse⁴ mais aussi de l'âge, l'activité, le métabolisme et le cycle biologique de l'organisme (Stewart, 2019 ; Hering *et al.*, 2018 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Barnes & Turner, 2016) (Figure 3). Il s'agit plus souvent d'ADN **mitochondrial**, généralement en quantité plus importante dans le milieu, mais il peut aussi s'agir d'ADN **nucléaire ou chloroplastique**⁵ voire d'ARN.

La production d'ADN dans les milieux peut aussi parfois être d'origine anthropique (ex. piscicultures ou espèces commerciales via les stations d'épuration (voir 2.6).

4 - Une variabilité des taux d'excrétion pour des poissons de taille similaire a été trouvé (Rourke *et al.*, 2023)

5 - En général, on compte deux copies d'ADN nucléaire et des centaines voire des milliers de copies d'ADN mitochondrial dans chaque cellule eucaryote.

1.2.2 ETATS DE L'ADNe

Les états de l'ADNe correspondent aux diverses **caractéristiques physiques des molécules d'ADN**. Ces dernières peuvent en effet se trouver dans le milieu sous forme de fragment d'ADN libre mais aussi sous forme de cellule ou de morceau de tissu par exemple. Au cours du processus de dégradation, les cellules et tissus passent par des états intermédiaires dont celui de fragment libre avant de disparaître du milieu.

1.2.3 TRANSPORT, SÉDIMENTATION ET ADSORPTION DE L'ADNe

Dans les sols, les molécules d'ADN reflètent une biodiversité très localisée car elles sont peu transportées et souvent adsorbées sur des particules organiques. Dans les milieux marins et dulcicoles, les molécules d'ADN peuvent être transportées par le courant ou sédimer ou encore être adsorbées sur des substrats. En milieu lentique, bien que l'eau circule (en fonction des pentes, du vent ou de mélange de masses d'eau etc.), le transport de l'ADNe semble relativement réduit (Shu et

al., 2022). En milieu lotique, le transport varie beaucoup plus, notamment en fonction de la morphologie du cours d'eau, son débit, la pente et la saison, de quelques mètres à plusieurs dizaines de kilomètres (Thalinger et al., 2021 ; Pont et al., 2018 ; Deiner & Altermatt, 2014). Ces mécanismes restent peu étudiés alors que leur compréhension est nécessaire pour déterminer dans quelle mesure ils influencent la détection des espèces.

1.2.4 PERSISTANCE ET DÉGRADATION DE L'ADNe

Les molécules d'ADN présentes dans les milieux peuvent être dégradées par des **facteurs biotiques** (bactéries, champignons, etc.) et **abiotiques** (UV, température, pH) (Hervé et al., 2023) (Figure 3). Dans les milieux aquatiques, les molécules d'ADN restent **détectables** seulement pendant **quelques jours** (Dejean et al., 2011) bien que certaines études mentionnent une persistance variable allant de quelques jours à plusieurs semaines en microcosme (Strickler et al., 2015). En milieu marin, la persistance est de l'ordre de quelques heures. Les molécules d'ADN peuvent aussi persister dans les milieux

en étant adsorbées sur des particules organiques. Dans les sols ou des sédiments lacustres ou marins, elles peuvent ainsi refléter une biodiversité parfois ancienne. Si les températures sont froides et les conditions sèches, en général, la dégradation de l'ADN est ralentie. L'ADNe peut, par exemple, être conservé pendant des centaines de milliers d'années dans le permafrost. Une étude publiée dans *Nature* a montré que l'ADNe peut même y être conservé jusqu'à deux millions d'années (Kjær et al., 2022).

1.3 Deux approches possibles pour l'identification des espèces à partir d'ADNe

Deux approches peuvent être distinguées :

- **Approche spécifique** (parfois appelée « barcoding de l'ADNe »), lorsqu'une seule espèce cible est recherchée,
- **Approche multispécifique** par **metabarcoding de l'ADNe**, lorsque plusieurs espèces sont recherchées en même temps.

L'utilisation de codes-barres ADN (« DNA barcoding » en anglais, souvent raccourci en « barcoding »), consiste à attribuer un nom d'espèce à un fragment d'ADN en comparant la séquence provenant d'un échantillon avec une base de séquences de référence (voir 2.5) (Valentini et al., 2009 ; Hebert et al., 2003). En effet, la variabilité nucléotidique d'un fragment constitue des combinaisons uniques qui permettent d'identifier le taxon auquel il appartient. **L'approche spécifique**

de l'ADNe est à distinguer du barcoding réalisé directement sur des tissus ou des spécimens. Les approches diffèrent dans la provenance de l'ADN (tissu / spécimen vs matrice environnementale) et dans le processus d'assignation. Pour le barcoding à partir de tissu/spécimen, on amplifie généralement un marqueur **universel** qui, pour les métazoaires, est la région de 658 paires de bases à l'extrémité 5' du gène mitochondrial Cytochrome Oxydase I (**COI**) (Hebert et al., 2003), et on réalise un séquençage de type Sanger. On peut aussi utiliser d'autres gènes que le COI.

Dans le cas de l'approche spécifique de l'ADNe, le barcoding de l'ADNe consiste à identifier des taxons à l'aide d'une région d'ADN standardisée à partir d'échantillons du milieu (Valentini et al., 2009). Les fragments d'ADN de l'espèce ciblée sont recherchés dans l'échantillon grâce à un marqueur standard (voir 2.3.2) puis les fragments sont amplifiés.

Ne pas confondre DNA barcoding / eDNA barcoding / ADN massal

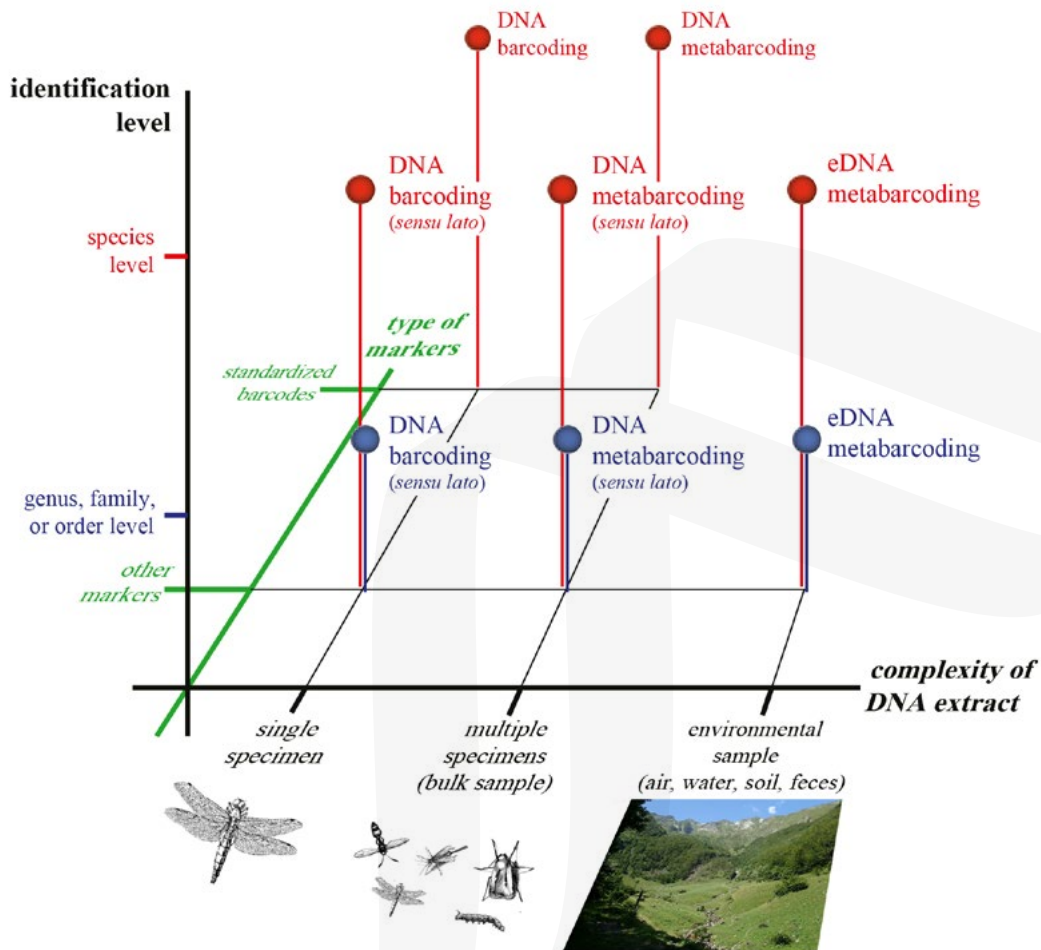
Il est possible d'avoir une approche spécifique à partir d'échantillons d'ADNe ; dans ce cas, une espèce ciblée est recherchée à partir d'échantillons prélevés dans le milieu : on parle de « **eDNA barcoding** » ou « barcoding de l'ADNe » (Valentini *et al.*, 2009).

Toutefois, il ne faut pas confondre cette approche avec le barcoding réalisé à partir d'un tissu (ex: patte d'insecte) ou d'un spécimen – dans ce cas il s'agit de « **DNA barcoding** » (Hebert *et al.*, 2003) – ou encore d'un mélange de plusieurs espèces (ex : issu de piège Barber ou de tente Malaise), auquel cas on parlera plutôt d'« **ADN massal** », car il ne s'agit pas ici d'ADNe au sens strict. Ciblant uniquement l'ADN intracellulaire, ce terme d'ADN « massal » est utilisé lorsqu'il s'agit d'un échantillonnage localisé plus proche des méthodes classiques comme c'est le cas des échantillonnages des diatomées, des analyses sur broyat d'invertébrés (*bulk samples*), ou des études des contenus stomacaux (Poulet & Basilico, 2019).

Dans le cas de l'approche multispécifique par metabarcoding, les brins d'ADN amplifiés sont ensuite séquencés avec des séquenceurs à hauts débits (voir 2.3.4), puis les séquences obtenues sont comparées à une ou plusieurs bases de référence (voir 2.5). Dans ces bases de référence figurent les séquences associées aux noms des espèces ou aux groupes taxinomiques. Ces différentes étapes permettent ainsi de mettre un nom

sur les séquences obtenues à partir d'un échantillon prélevé sur le terrain ; ce qui offre une approche holistique et une plus grande couverture d'exploration de la biodiversité (Taberlet *et al.*, 2012 a).

La Figure 4 présente différentes approches d'identifications taxinomiques par l'ADN selon trois axes : la complexité de l'échantillon d'ADN, le type de marqueur moléculaire utilisé et le niveau d'identification.



↑ Figure 4 : Proposition de terminologies pour l'identification des taxons à base d'ADN selon le type de marqueur utilisé, le niveau d'identification et la complexité de la matrice d'où est extrait l'ADN d'après Taberlet *et al.* (2012a) (images © A. Lacoëuilhe et Pixabay)

Une revue systématique de 407 articles publiés entre 2012 et 2021 montre que, dans 61 % des études ADNe en milieu aquatique, l'objectif est la détection d'une

seule espèce par qPCR ou digital PCR (voir 2.3.3), et 39 % visent l'inventaire d'espèces par metabarcoding (Takahashi *et al.*, 2023).

1.4 Une recherche récente en plein essor

Bien que le principe existait déjà, la toute première étude faisant référence à l'ADNe, et qui posera le nom, portait sur la détection de bactéries dans les sédiments marins (Ogram *et al.*, 1987). En 1990, une étude a analysé la diversité du gène codant pour l'ARNr 16S dans le bactério-plancton dans la mer des Sargasses (Giovannoni *et al.*, 1990). Toutefois le terme et les applications de l'ADNe ont commencé à vraiment se développer au début des années 2000 avec par exemple des travaux sur l'extraction d'ADN ancien de végétaux et de la mégafaune, comme le mammoth, à partir de sédiments et du pergélisol (Willerslev *et al.*, 2003) ou sur la pollution fécale en eau douce (Martellini *et al.*, 2005). A partir de 2005, le développement du séquençage haut débit a permis de faire des analyses plus rapidement et

à moindre coût (voir 2.3.4). Au début des années 2010, pour la première fois, l'ADNe est utilisée pour détecter les espèces envahissantes en eau douce (Ficetola *et al.*, 2008) et pour surveiller les mammifères marins (Thomsen *et al.*, 2012). 2012 fut l'année de la première revue de littérature (Taberlet *et al.*, 2012 a) et de la consolidation du terme « ADNe » (Miaud *et al.*, 2012). Depuis le nombre annuel de publications ne cesse d'augmenter.

Une recherche dans Web of Science des articles publiés de 1987 à février 2024, avec les mots clés « eDNA » ou « environmental DNA » restreint à la biologie et l'écologie au sens large⁶, renvoie vers 3945 articles (Figure 5) répartis dans différentes catégories (Figure 6)⁷.

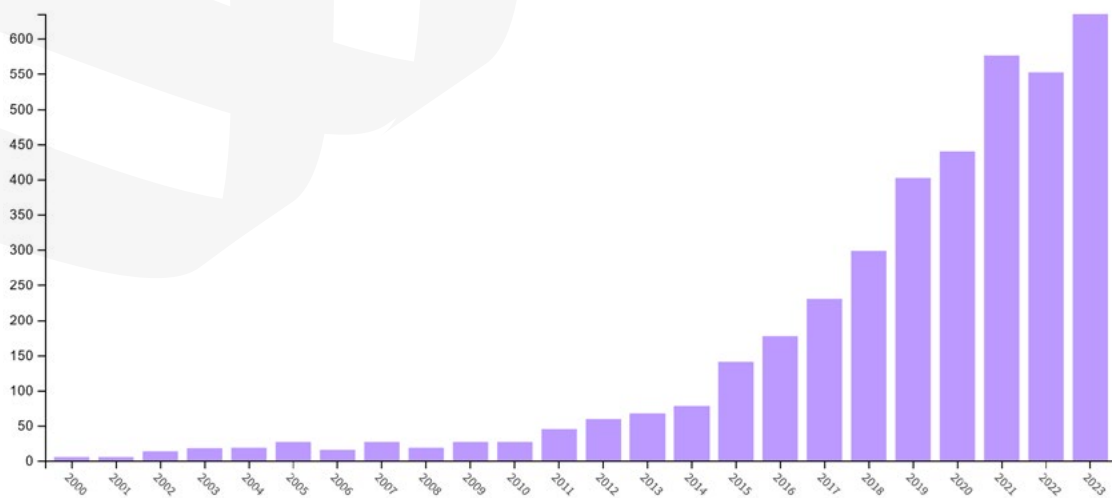


Figure 5 : Nombre annuel d'articles publiés sur l'ADNe en écologie et biologie depuis 1987 (© Web of Science) ↑

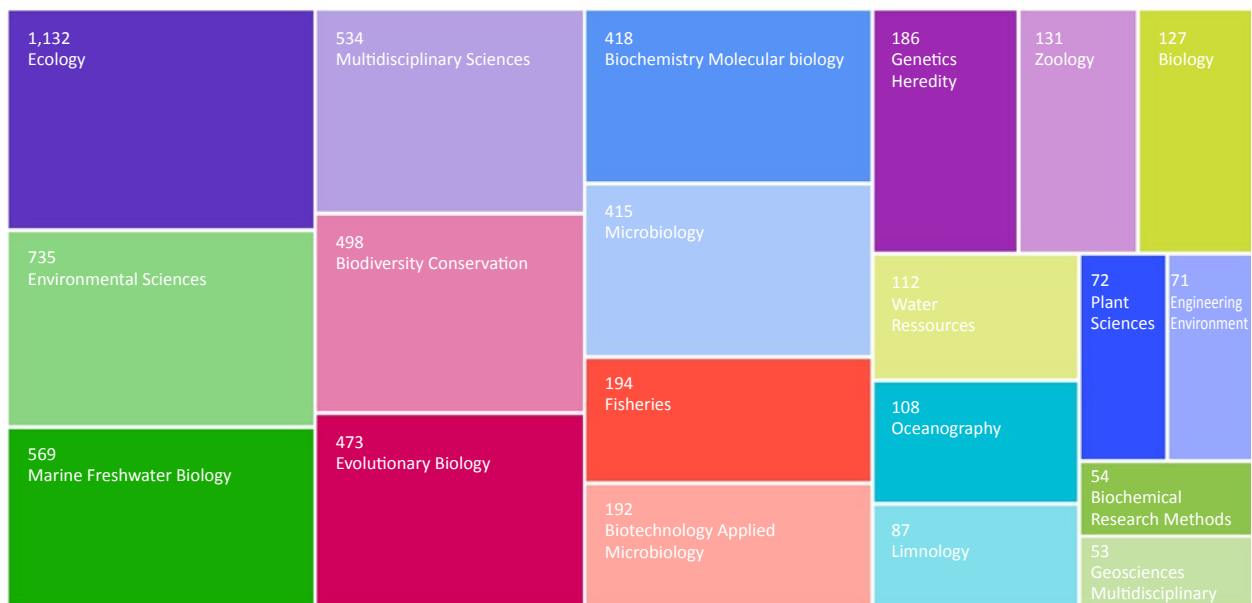


Figure 6 : Domaines de recherche correspondant aux 3945 publications traitant d'ADNe regroupées selon les catégories définies dans Web of Science (© Web of Science) ↑

6 - Equation utilisée : TS=(("eDNA" OR "environmental DNA") AND ("species" OR "community" OR "biodiversity" OR "ecology" OR "conservation" OR "biology" OR "nature")) dans la base Web of Science Core Collection (qui ne prétend pas être complète)

7 - Ces catégories sont définies par Web of Science

Les écosystèmes dulcicoles ont été les premiers étudiés et, logiquement, ce sont ceux sur lesquels le plus grand nombre de publications est disponible. Les écosystèmes marins arrivent en second et les écosystèmes terrestres en dernier (Figure 7) (Beng & Corlett, 2020). Cela illustre le niveau de maturité de la méthode ADNe pour ces différents écosystèmes. On peut y voir aussi plus généralement un témoin de l'intérêt porté aux différents

écosystèmes (même si les milieux terrestres ne se limitent pas aux sols) et les espèces qui les occupent dans la mesure où les milieux d'eau douce sont occupés par de nombreuses espèces dites « patrimoniales » tandis qu'aujourd'hui encore les sols restent peu étudiés et les espèces vivants dans les sols bénéficient rarement d'un statut de protection.

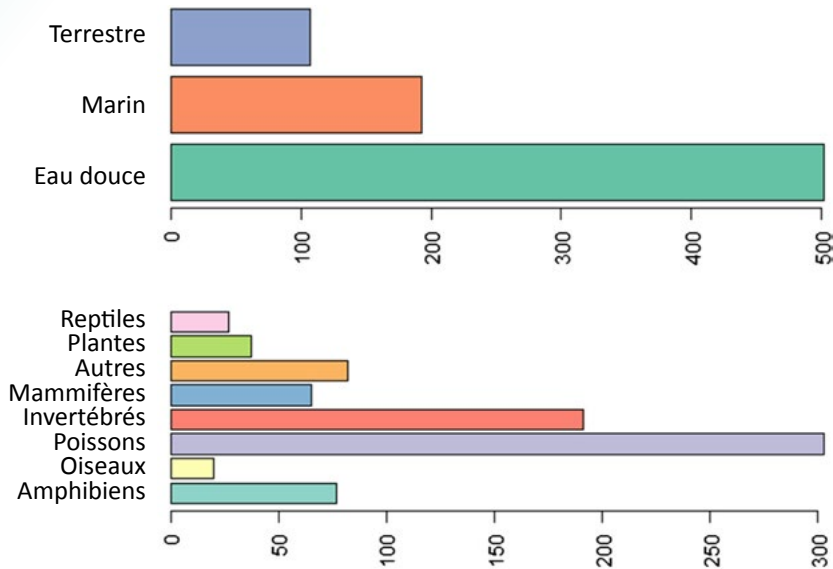


Figure 7 : Nombre d'études utilisant l'ADNe à partir d'une recherche documentaire avec les mots « environmental DNA » ou « eDNA » pour la période comprise entre le 1^{er} janvier 2008 et le 31 décembre 2019 selon l'écosystème étudié (en haut) et le groupe d'organismes étudiés (en bas) d'après Beng & Corlett (2020)

Un zoom sur les milieux aquatiques (Figure 8) montre que 48 % des études s'intéressent aux poissons, les amphibiens arrivent en troisième position après les invertébrés avec 9 % des études, les mammifères

aquatiques ainsi que les mollusques représentent chacun 6 % des études tandis que les plantes, les arthropodes, la fonge et les nématodes apparaissent dans la littérature seulement après 2018 (Takahashi *et al.*, 2023).

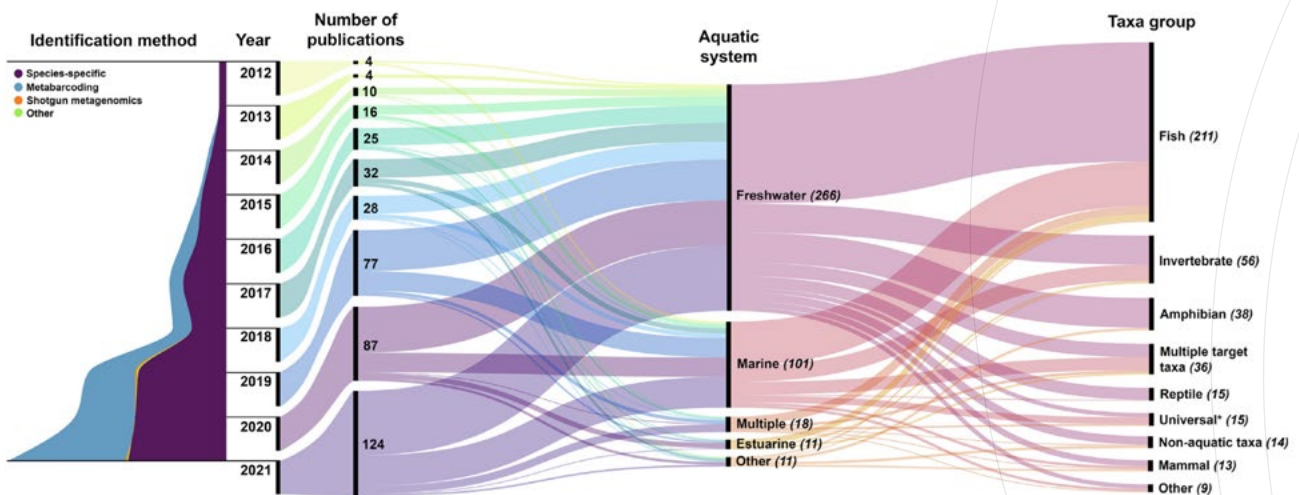


Figure 8 : Un diagramme de Sankey montrant le nombre de publications, les types de systèmes aquatiques et les groupes de taxons trouvés à partir de la recherche documentaire Scopus avec les requêtes « environmental DNA » ou « eDNA » entre 2012 et 2021. À gauche, quatre méthodes d'identification de l'ADNe (spécifique, metabarcoding, métagénomique shotgun et autres) ont été trouvées, avec ce diagramme illustrant les tendances du nombre de publications, du système aquatique et des taxons cibles entre 2012 et 2021 pour chaque méthode (Takahashi *et al.*, 2023)

Un grand nombre de publications scientifiques comparent les résultats obtenus par ADNe et par techniques dites « traditionnelles ». Fediajevaite *et al.* (2021) proposent une méta-analyse de 535 articles publiés entre 1970 et 2020 pour déterminer si et dans quelles circonstances l'ADNe est plus efficace que les techniques traditionnelles (Figure 9). Cette étude montre que, dans de nombreux cas, l'utilisation de l'ADNe se révèle moins chère, plus sensible et détecte plus d'espèces que les techniques traditionnelles principalement pour les poissons et les amphibiens. L'approche par ADNe est

aussi plus précise et efficace particulièrement pour les microorganismes. Cependant, il est aussi souligné que l'évaluation de la performance relative n'est pas toujours possible par manque d'informations dans les articles. Seuls 49 articles ont quantifié la probabilité de détection à la fois pour l'ADNe et les techniques traditionnelles, 170 articles montrent des comparaisons de la sensibilité de la méthode, 75 comparent le nombre d'espèces détectables et seulement 19 s'intéressent au rapport coût-efficacité (Fediajevaite *et al.*, 2021).

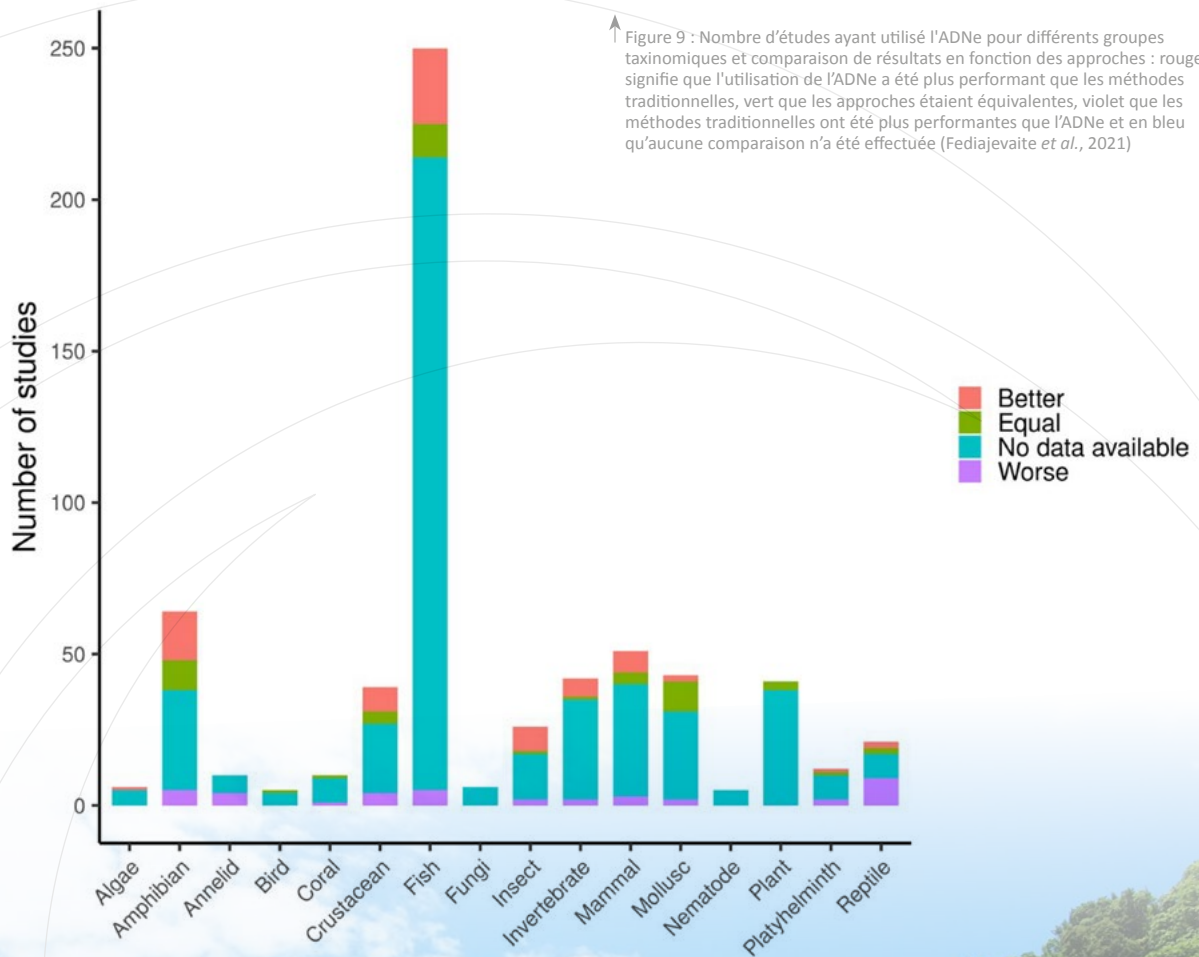


Figure 9 : Nombre d'études ayant utilisé l'ADNe pour différents groupes taxinomiques et comparaison de résultats en fonction des approches : rouge signifie que l'utilisation de l'ADNe a été plus performant que les méthodes traditionnelles, vert que les approches étaient équivalentes, violet que les méthodes traditionnelles ont été plus performantes que l'ADNe et en bleu qu'aucune comparaison n'a été effectuée (Fediajevaite *et al.*, 2021)

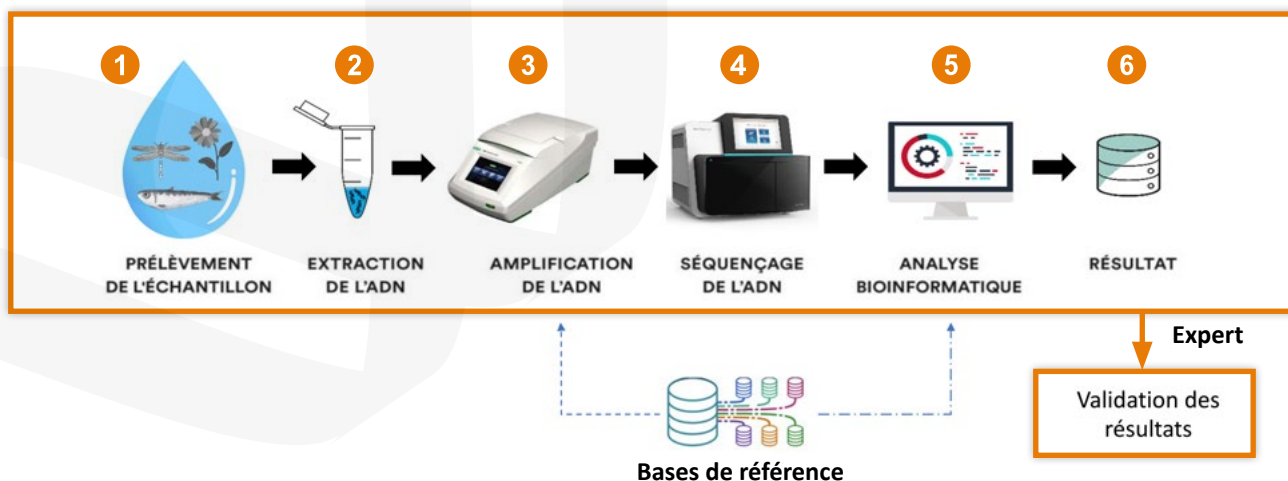
2. CONSIDÉRATIONS TECHNIQUES, MÉTHODES ET PROTOCOLES

2.1 Du terrain à l'identification des espèces : les différentes étapes

Les étapes sont **nombreuses et interdépendantes**, chacune nécessitant des choix et des compromis (Bruce *et al.*, 2021). Chaque laboratoire peut faire ses propres choix techniques et utiliser des techniques différentes pour associer un nom de taxons à un fragment d'ADN prélevé sur le terrain. Les techniques varient en fonction de la matrice étudiée (eau, sol, fèces etc.) et pour une même matrice, différentes techniques peuvent aussi être utilisées. Takahashi *et al.* (2023) ont réalisé une revue de 407 articles publiés entre 2012 et 2021 sur l'ADNe en milieu aquatique montrant en effet qu'avec l'augmentation des publications (voir 1.4), une **grande diversification** des méthodes apparaît dans toutes les étapes décrites Figure 10.

Si l'on simplifie, dans le cas d'une **approche multispécifique pour une matrice « eau »**, il s'agit de suivre, par exemple, les étapes suivantes (Figure 10) :

- 1 un échantillon est **prélevé** sur le terrain (par exemple grâce à un filtre fermé qui retient les molécules d'ADN⁸),
- 2 l'ADN⁹ est **extrait**,
- 3 puis **amplifié** grâce à une PCR (Polymerase Chain reaction), ou réaction en chaîne par polymérase¹⁰, qui repose sur le processus de réplication des molécules d'ADN par une enzyme polymérase (voir 2.3.3),
- 4 puis, éventuellement, **séquence** grâce à un séquenceur qui traduit l'information génétique en texte (bases nucléotidiques de l'échantillon où chaque lettre représente un nucléotide¹¹) (voir 2.3.4),
- 5 le résultat issu du séquenceur est ensuite **analysé** (en suivant plusieurs étapes d'analyses successives) grâce à des **logiciels de bioinformatique** (voir 2.4.)
- 6 pour permettre **d'associer** à chaque fragment d'ADN présent dans l'échantillon un taxon probable en s'appuyant sur des bases de séquences de référence (voir 2.5.).



↑ Figure 10 : Principales étapes d'une approche multispécifique par metabarcoding de l'ADNe dans l'eau : du prélèvement de l'échantillon sur le terrain à l'obtention d'une liste de taxons (© Lacoëuilhe A. et Pixabay)

On note sur la Figure 10 que les séquences de référence peuvent être utiles lors du processus long et complexe de développement de nouvelles amorces ciblant de nouveaux marqueurs (Figure 10 flèche vers 3 - voir 2.3.2 et 2.5). De plus, l'étape de bioinformatique peut aussi être réalisée sans l'utilisation d'une base de référence. On travaille alors avec des MOTUs ou ASV (voir 2.6) (Figure 10 flèche vers 5).

On note également que dans le cas d'une **approche spécifique**, la phase de séquencage (Figure 10 4)

est très rarement réalisée car l'amplification de l'ADN cible peut suffire à l'identification (voir 2.3 pour plus de détails).

Dans le cas de prélèvements de sols, l'ADN est directement extrait à partir de la matrice sol qui peut être conservée sur du gel de silice ou congelée. L'extraction d'ADN peut alors être effectuée grâce tout d'abord à l'utilisation d'une solution tampon pour lyser les cellules puis en suivant plusieurs étapes de lavage successives pour obtenir de l'ADN purifié (Taberlet *et al.*, 2012 c).

8 - Il existe différentes techniques. La filtration peut aussi être faite hors site. Pour de petits volumes d'eau, il est aussi possible d'utiliser par exemple la précipitation en ajoutant une solution à base d'éthanol, etc.

9 - Qui peut se trouver sous différentes formes (voir 1.2.)

10 - Plusieurs méthodes d'amplification sont possibles : PCR, qPCR, ddPCR décrites en 2.3.3.

11 - Chaque nucléotide est formé d'une base nucléique, ou base azotée — adénine (A), cytosine (C), guanine (G) ou thymine (T) liée à un désoxyribose lui-même lié à groupe phosphate.

2.2 Protocoles et stratégies d'échantillonnage sur le terrain

Cette partie se concentre sur les milieux d'**eaux courante et stagnante, les milieux marins et les sols**. Le milieu « air » est traité dans la partie 4 « Perspectives de recherche ».

Plusieurs paramètres influencent la présence et la persistance des molécules d'ADN décrits dans la partie 1.2 et doivent être pris en compte pour définir le protocole d'échantillonnage.

2.2.1 ADAPTATION DES PROTOCOLES DE TERRAIN ET DES STRATÉGIES D'ÉCHANTILLONNAGE EN FONCTION DES MILIEUX ET DE L'OBJECTIF VISÉ

Quel que soit le milieu, la personne réalisant le prélèvement des échantillons sur le terrain n'a pas besoin d'être spécialiste en biologie moléculaire (Biggs *et al.*, 2015) et doit **simplement être formée**, notamment pour réduire les risques de contamination (voir 2.3). En effet, l'opérateur sur le terrain doit avoir à l'esprit par exemple qu'il peut transporter des traces d'ADN voire des pathogènes (ex. chytrides) d'un site à l'autre par les bottes ou chaussures, et ainsi fausser les résultats voire contaminer une zone et ses occupants. Le piétinement peut aussi entraîner des mouvements d'eau à l'origine d'une remise en suspension des molécules d'ADN et donc à l'origine de la détection potentielle d'un organisme qui ne se trouve plus dans le milieu (voir 1.2.). Lors des prélèvements, il faut donc veiller à bien se positionner.

Les protocoles sont à adapter en fonction du **type de milieu et des objectifs visés**. Les méthodes de collecte de l'ADN sont également à adapter aux différents types d'échantillons : les microbes et le pollen peuvent être prélevés dans l'air, les biofilms écouvillonnés ou grattés, l'eau précipitée ou filtrée. Dans une logique d'inventaire, le protocole d'échantillonnage doit être le plus **intégratif** possible, c'est-à-dire le plus **représentatif** de l'ensemble de la zone étudiée. Quelques recommandations générales pratiquées dans de nombreuses études peuvent être suivies pour viser cette représentativité :

- Dans les sols et les sédiments, il est préférable d'extraire des sous-échantillons de différents endroits de la zone (Guerrieri *et al.*, 2021 ; Pawlowski *et al.*, 2020 ; Taberlet *et al.*, 2012 c). Une grande hétérogénéité dans la composition des communautés d'espèces peut être observée entre deux points de prélèvements à quelques centimètres ou mètres d'écart (Zinger *et al.*, 2019).
- Dans les milieux aquatiques stagnants de petite taille, il est souhaitable de longer les berges pour récolter plusieurs échantillons d'eau répartis sur tout le périmètre (Dufresnes *et al.*, 2020 ; Biggs *et al.*, 2015).
- Dans les milieux aquatiques stagnants de grande taille (Hervé, 2023) et les milieux marins, il est recommandé de réaliser des transects. Dans ce cas, la longueur du transect, la durée pendant laquelle le transect est parcouru ou encore la vitesse de filtration de l'eau sont à définir en fonction des caractéristiques du milieu. Les variables « profondeur de prélèvement » et « distance à la côte/berge » sont à prendre en compte car elles peuvent influencer la dilution du signal ADN.

- Dans les milieux courants, des transects berge à berge maximisent les chances de détecter l'ensemble des espèces (Prié *et al.*, 2021a ; Laporte *et al.*, 2020).

Par ailleurs, dans la mesure où l'ADN est présent en concentration parfois très faible et réparti de façon hétérogène dans les milieux, il y a toujours un risque que ces fragments ne soient pas captés lors des prélèvements (Goldberg *et al.*, 2016 ; Pilliod *et al.*, 2013). Il est donc essentiel d'optimiser le protocole de terrain et les techniques de laboratoire, en tenant compte de l'écologie de l'ADNe (voir 1.2), idéalement avec la mise en place d'une **étude pilote** afin de s'assurer que le plan d'échantillonnage est approprié (ex. localisation des points et période de prélèvement, quantité d'échantillons à prélever dans le temps et l'espace, volume ou poids à prélever nécessaire, répliques de terrain, etc.) (Patin & Goodwin, 2023 ; Falentin *et al.*, 2019 ; Deiner *et al.*, 2017 ; Goldberg *et al.*, 2016). Des échantillons contrôles ou **témoins négatifs** d'extraction d'ADN et de PCR peuvent aussi s'avérer nécessaires afin de valider les résultats et mieux évaluer les éventuels biais techniques (Falentin *et al.*, 2019).

L'échantillonnage se fait préférentiellement, dans des **conditions météorologiques favorables et stables**. Pour optimiser la stratégie d'échantillonnage, il est préférable d'organiser les prélèvements en fonction de **l'activité des espèces ciblées** (ex. reproduction, émergence des larves, périodes de mue, etc.) (Buxton *et al.*, 2017). Toutefois, s'il s'agit d'un inventaire, la présence d'une grande quantité de gamètes dans le milieu risque de « masquer » les molécules d'ADN des espèces dont ce n'est pas la période de reproduction. Pour les milieux aquatiques, les périodes à éviter sont celles de grand froid (ex. peu d'activité de certaines espèces) et de grosse chaleur (ex. possible bloom algal et donc ADN d'algues dominantes et risque de colmatage de filtre). De plus, de fortes précipitations peuvent entraîner la remise en suspension dans le milieu de sédiments (qui peuvent contenir des molécules d'ADN anciennes (voir 1.2.4) et augmenter le risque de colmatage lors de la filtration de l'eau) et apporter des molécules ADN venant des milieux terrestres via des ruissèlements. Il peut alors être plus difficile d'interpréter les résultats obtenus. Néanmoins cela dépend de la question posée car échantillonner après une crue ou de fortes précipitations peut aussi être une stratégie pour capter les molécules d'ADN provenant de plus loin notamment pour rechercher des espèces terrestres par exemple.

En milieu aquatique, le **volume d'eau** à prélever est un autre paramètre important du protocole. Il varie considérablement d'une étude à l'autre or c'est un point de vigilance à avoir car plus le volume d'eau prélevé est important, plus la quantité d'ADN récupérée et la probabilité de détecter des espèces (notamment des espèces rares) est grande (Takahashi *et al.*, 2023 ; McClenaghan *et al.*, 2020). Toutefois, il faut trouver un compromis étant donné que l'échantillonnage de grands volumes peut être difficile sur le plan logistique et mécanique (ex. filtre qui se colmate et utilisation de pompe). Les premières études d'ADNe utilisaient couramment de petits volumes (<100 ml). Aujourd'hui dans la plupart des études, la quantité d'eau filtrée pour récupérer l'ADN varie entre 0,5 et 1 L (majoritairement 1 L), ce qui semble risqué car faible pour faire de la surveillance (Takahashi *et al.*, 2023) notamment dans le cas des espèces rares. Dans les milieux marins, la concentration en ADNe est souvent très faible, il est donc recommandé de traiter de plus grands volumes d'eau (Bruce *et al.*, 2021) ; certains auteurs préconisent de filtrer 30 L pendant 30 min le long d'un transect (Dalongeville *et al.*, 2022) quand d'autres, au moins 2x 30 L par réplica (Mathon *et al.*, 2023 ; Prié *et al.*, 2023).

2.2.2 CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Face aux facteurs influençant l'écologie de l'ADNe (voir 1.2.), la conservation des échantillons est essentielle pour éviter la dégradation de l'ADN entre le moment du prélèvement et celui de l'analyse des échantillons. Les méthodes évoluent et se diversifient ; pour les milieux aquatiques au moins huit techniques de conservation différentes avant extraction de l'ADN ont été enregistrées dans une revue de la littérature (Takahashi *et al.*, 2023).

En milieu aquatique, la filtration est souvent réalisée en laboratoire, pourtant il semble intéressant de réaliser la filtration directement sur site pour des raisons pratiques (ex. éviter de transporter les échantillons d'eau) et pour limiter les risques de contamination. Des changements de pratique récents allant vers une filtration sur site sont mentionnées dans les publications scientifiques. Afin de

La **stratégie d'échantillonnage** semble avoir une plus grande importance que le volume, en particulier dans les systèmes lenticques (ex. lacs ou les étangs) où l'ADN peut être réparti de façon hétérogène (Li *et al.*, 2019). Quel que soit le milieu étudié, un protocole selon lequel l'échantillon est prélevé en un point unique offre une vision moins représentative que celui qui prélève l'échantillon en plusieurs points. Le **nombre de réplicas** (ex. nombre de points de prélèvement et/ou nombre d'échantillons par points de prélèvement) réalisés sur le terrain est ainsi un élément essentiel à prendre en compte, notamment dans l'interprétation des résultats. Si pour des raisons environnementales, physiques ou biologiques, les probabilités de détection diminuent, il est recommandé d'augmenter le nombre d'échantillons collectés et le volume d'eau filtrée par échantillon (Bruce *et al.*, 2021).

Enfin, le protocole de terrain doit être pensé de **manière standardisée** (voir 3.3) si l'objectif est un suivi dans le temps d'un même site ou d'effectuer des comparaisons entre sites similaires ou proches géographiquement. Tout suivi temporel ou toute comparaison spatiale ne peut être robuste que si la méthode est reproductible, et donc standardisée, particulièrement dans le cadre de programmes de surveillance. La standardisation est moins importante dans une simple logique d'inventaire.

conserver le filtre avant extraction des molécules d'ADN, sont utilisées en général la **congélation** ou l'utilisation de solutions contenant des agents conservateurs comme l'éthanol ou de **solutions tampons** spécifiques (Creer *et al.*, 2016 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Bohmann *et al.*, 2014). Ces solutions tampons présentent l'avantage de conserver l'ADN à température ambiante. Parfois la congélation et les solutions sont utilisées ensemble.

Les filtres ou les échantillons de sols sont quant à eux généralement conservés grâce à la dessiccation (à l'aide de gel de silice), la congélation à -80 °C ou à -20°C, etc. (Bruce *et al.*, 2021). Guerrieri *et al.* (2021) comparent différentes méthodes de conservation des échantillons de sols et proposent certaines préconisations.

2.3 Techniques et méthodes de laboratoire

2.3.1 PROCÉDURES DES LABORATOIRES D'ANALYSE

Il n'existe pas aujourd'hui de standardisation des procédures de laboratoire. Chaque laboratoire conçoit ses protocoles, notamment en fonction des objectifs fixés et de la provenance des échantillons (ex. matrice d'origine de l'échantillon). Pour réaliser des analyses ADNe de qualité, notamment pour la recherche d'ADN rare dans les échantillons, des infrastructures spécifiques et des pratiques de laboratoire particulières doivent être mises en place pour limiter les contaminations, les biais techniques et humains qui peuvent générer des faux positifs ou des faux négatifs et donc fausser les résultats. Le choix du laboratoire partenaire/prestataire doit donc reposer sur les objectifs fixés et les méthodes utilisées par le laboratoire pour limiter ces biais. Afin d'éviter les contaminations, des **dispositifs particuliers** sont mis en place (pressions différentielles, filtration, renouvellement, salles séparées, etc.) d'autant plus **strictes** que de l'ADN rare ou ancien est recherché.

Les procédures de laboratoire traitant des échantillons d'ADNe doivent être réalisées dans un « **laboratoire propre** » avec un équipement adapté et des fournitures souvent à **usage unique** (embouts de pipette, gants, etc.) (Champlot *et al.*, 2010 ; Goldberg *et al.*, 2016). La salle de laboratoire et les paillasse notamment doivent être nettoyées régulièrement avec un décontaminant de l'ADN (ex : eau de Javel) afin d'éliminer les traces d'ADN. Les **rayons UV** peuvent aussi être utilisés pour réaliser des « mises à blanc » de certaines salles de laboratoire et lors des cycles de lavage pour les hottes d'amplification et d'extraction afin d'éliminer les fragments d'ADN en aérosol. Il est important d'avoir une procédure de

laboratoire qui comprend un sens de circulation entre les salles (**marche en avant**), des salles spécialisées (surpression/sous-pression, air filtré, sas, etc.) et séparées pour les étapes d'extraction d'ADN et de PCR (Cooper & Poinar, 2000). L'utilisation de contrôles positifs et de contrôles négatifs et des répliques sont aussi conseillés (Deiner *et al.*, 2017 ; Ficetola *et al.*, 2016).

En raison du potentiel élevé de contamination, l'équipement de terrain doit être séparé de la zone de laboratoire et les fournitures de laboratoire sont à séparer des zones où la PCR est réalisée et où les tissus ou organismes sont manipulés. Les consommables sont directement entreposés dans les salles où ils sont utilisés ou dans une salle de stockage neutre (particulièrement dans le cas de travaux sur de l'ADN rare). Une **décontamination** est faite entre les séries d'échantillons pour garantir leur indépendance (Goldberg *et al.*, 2016). Avant d'entrer dans la salle de laboratoire propre, le personnel doit s'équiper intégralement avec des gants, charlotte, masque, sur-chaussures et combinaison à **usage unique** (Champlot *et al.*, 2010 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Patin & Goodwin, 2023). Afin de repérer une éventuelle contamination, des contrôles négatifs sont recommandés à chaque étape au niveau laboratoire. Ils sont parfois réalisés sur le terrain, notamment dans le cas de l'utilisation de filtres ouverts. Cela peut inclure la filtration régulière d'eau propre en tant que « blancs de terrain » (Hering *et al.*, 2018 ; Goldberg *et al.*, 2016). Cela n'apparaît toutefois pas nécessaire lorsque du matériel stérile et des filtres encapsulés sont utilisés.

2.3.2 MARQUEURS ET COUPLES D'AMORCES

Les **marqueurs** (en anglais "marker") correspondent aux régions spécifiques de l'ADN ayant une localisation connue dans le génome (par exemple un gène ou une partie d'un gène) et participent notamment au processus d'assignation taxinomique. Il existe des marqueurs couramment utilisés en fonction des groupes taxinomiques : **mitochondriaux** pour les animaux par exemple et aussi **chloroplastiques** pour les plantes (Tableau 1). Pour le barcoding à partir de tissus ou de spécimens, le marqueur **universel** pour les métazoaires est la région de 658 paires de bases du gène mitochondrial Cytochrome Oxydase I (**COI**) (Hebert *et al.*, 2003) mais ce marqueur est très peu utilisé pour étudier l'ADNe.

Dans le cadre des études de l'ADNe, les marqueurs sont souvent plus courts afin de pouvoir amplifier de l'ADN souvent dégradé (voir 1.24.). Une des difficultés est donc d'obtenir la meilleure résolution taxinomique à partir de courts marqueurs (souvent moins de 100 paires de bases). Certaines régions génétiques sont couramment utilisées pour la conception de marqueurs par exemple le **gène 12S pour les poissons** (Yang *et al.*, 2023). D'autres régions peuvent être plus appropriées en fonction des groupes visés et des analyses. Les gènes codant pour les sous-unités **16S chez les procaryotes et 18S chez les eucaryotes** (Hering *et al.*, 2018 ; Deiner *et al.*, 2017 ; Creer *et al.*, 2016 ; Taberlet *et al.*, 2012c) sont les plus couramment utilisés pour les analyses de metabarcoding de l'ADNe.



Groupes taxinomiques	Régions mitochondriales ou chloroplastiques utilisées pour la conception des marqueurs	Régions nucléaires utilisées pour la conception des marqueurs
Animaux	Cytb, COI-5P, 12S, 16S, D-loop	18S
Plantes	rbcl ¹² , matK	ITS ¹³ , IST2
Fonge	COI-5P	ITS1, ITS2
Chromista et protozoaires	rbcl, COI-5P	ITS

↑ Tableau 1 : Régions mitochondriales, chloroplastiques ou nucléaires couramment utilisées pour la conception des marqueurs en fonction des groupes taxinomiques

Les marqueurs correspondent à la zone amplifiée (voir 2.3.3.). Ils sont constitués d'une partie centrale utilisée pour l'assignation taxinomique et de deux portions latérales qui s'hybrident avec le **couple d'amorces** (aussi appelé en anglais "primer pair"). On distingue l'amorce « forward » et l'amorce « reverse ». Les **amorces** (ou « primers ») sont de courtes séquences

synthétiques d'ADN qui servent de point de départ à la synthèse du brin complémentaire par une ADN polymérase lors de l'amplification (Figure 10 Etape 3). La figure 11 illustre une représentation schématique d'un couple d'amorces au niveau d'un marqueur sur un fragment d'ADN.



↑ Figure 11 : Représentation schématique d'un couple d'amorces au niveau d'un marqueur, comprenant le site d'hybridation, sur un fragment d'ADN

Le couple d'amorces est choisi en fonction de la région génétique qui doit être amplifiée. Il existe des marqueurs « spécialistes » pour une espèce ou un groupe taxinomique (ex. poissons) et des marqueurs dits « généralistes » ou « universels » qui servent ainsi à amplifier les molécules d'ADN de plusieurs groupes taxinomiques (ex. eucaryotes) et qui correspondent à des gènes partagés et conservés entre différentes espèces ou taxons au cours de l'évolution. Pour les poissons par exemple, les marqueurs du gène 12S MiFish (Miya *et al.*, 2015), 12S-V5 (Riaz *et al.*, 2011) et Teleo (Valentini *et al.*, 2016) sont les plus utilisés (Takahashi *et al.*, 2023). Notons que tous les marqueurs ne présentent pas la même performance de détection (Polanco *et al.*, 2021).

L'identification repose fortement sur les marqueurs et les amorces choisis. Le couple d'amorces cible des régions génétiques suffisamment conservées pour amplifier des régions variables ciblées. Un marqueur idéal doit ainsi être suffisamment variable pour distinguer les espèces entre elles (résolution taxinomique) mais suffisamment ubiquitaire et conservé pour permettre une amplification universelle c'est-à-dire par exemple, tous les taxons vertébrés ou toutes les espèces de poissons. Pour le metabarcoding de l'ADNe, il s'agit aussi de vérifier que la taille du fragment à amplifier est compatible avec la

longueur des séquences qu'il est possible d'obtenir avec la technologie de séquençage choisie (voir 2.3.4). De plus, la quantité d'ADN amplifiable est inversement liée à la taille de l'amplicon (Bylemans *et al.*, 2018 ; Wei *et al.*, 2018) et l'utilisation d'amorces qui amplifient un court fragment d'ADN augmente les chances de détection d'espèces rares.

Le choix des amorces a ainsi le potentiel d'influencer les résultats en amplifiant préférentiellement certaines séquences cibles plus que d'autres et en amplifiant les groupes non cibles (Cristescu, 2014). Une solution à ce problème repose sur l'utilisation de plusieurs couples. Cette méthode reste néanmoins coûteuse et chronophage (Alberdi *et al.*, 2018 ; Creer *et al.*, 2016 ; Cristescu, 2014).

Il est possible d'utiliser des amorces de blocage spécifiques pour réduire la présence de certaines séquences (particulièrement lorsque des amorces universelles sont utilisées) afin d'éviter la saturation des analyses avec des fragments d'ADN indésirables - humains souvent ou animaux domestiques - mais aussi certains groupes taxinomiques particuliers en fonction des besoins de l'étude. L'amplification de séquences non souhaitées entraîne en effet une perte de données et une augmentation des coûts (Yang *et al.*, 2023).

12 - Ribulose biphosphate carboxylase à large chaîne
13 - Internal Transcribed Spacer

2.3.3 AMPLIFICATION DE L'ADN

2.3.3.1 Amplification dans le cas de l'approche multispécifique par metabarcoding de l'ADNe

Les molécules d'ADN sont amplifiées lors de la **PCR** (« **Polymerase Chain Reaction** », ou réaction en chaîne par polymérase, qui repose sur le processus de réplication des molécules d'ADN par une enzyme polymérase) (Figure 10 Etape 3). La synthèse est initiée grâce aux amorces (voir 2.3.2). Un fragment d'ADN amplifié est appelé un « **amplicon** », qui est donc un produit de la PCR (Bruce *et al.*, 2021).

Deux facteurs importants de cette étape de PCR sont le **nombre de répliques par échantillon** (nombre de puits réalisés avec l'échantillon) et le **nombre de cycles PCR**. Ce dernier constitue un compromis : un grand nombre de cycles PCR permet d'aller rechercher d'éventuelles traces d'ADN d'espèces rares mais un trop grand nombre augmente le risque de contamination. Un cycle PCR correspond à la succession d'une phase de dénaturation du brin, d'une hybridation et d'une élongation. Un même extrait d'ADN issu d'un même échantillon est séparé en n « sous-échantillons » ou répliques. Ensuite la PCR est faite sur chacun des répliques. Plusieurs répliques PCR augmentent ainsi la détection des espèces et diminuent

la probabilité de faux négatifs¹⁴ (Alberdi *et al.*, 2018 ; Ficetola *et al.*, 2015). Notons que les cycles PCR ne peuvent pas se substituer aux répliques biologiques (c'est-à-dire aux répliques terrain ou répliques éventuellement réalisés lors de l'analyse en laboratoire (extraction et PCR)). Ainsi les deux sont nécessaires pour obtenir des résultats complets (Goldberg *et al.*, 2016).

Dans le cas du metabarcoding, et en vue d'un séquençage haut débit (voir 2.3.4.), lors de l'étape d'amplification, les amorces sont étiquetées avec de courtes séquences de nucléotides (appelé **tags** ou **index**) pour identifier de manière unique leur origine lorsque plusieurs sources d'ADN sont mélangées. En revanche le multiplexage lors de la PCR est l'étape qui consiste à mélanger plusieurs amorces dans une seule réaction (ex. mélanger les amorces correspondant à miFish et Téléo en même temps). Ces **balises/étiquettes** ou **tags**, bien qu'utiles, ont également le potentiel de biaiser les résultats ; elles nécessitent donc également des tests rigoureux avant leur utilisation .

2.3.3.2 Amplification dans le cas de l'approche spécifique et quantification relative

Les techniques décrites ci-dessous correspondent aux différentes méthodes utilisées en cas de l'approche spécifique :

- **PCR** repose sur une amplification à l'aide d'amorces spécifiques aux espèces étudiées. **Si l'amplification se réalise, cela atteste de la présence** de l'espèce recherchée. Une PCR informe seulement de la **présence ou de l'absence** d'une espèce ou du groupe cible¹⁵.
- **PCR quantitative** ou **qPCR** (ex. Biggs *et al.*, 2015) : tout comme la PCR traditionnelle, la qPCR donne une information en présence/absence d'une espèce depuis un échantillon (Taberlet *et al.*, 2018)¹⁶. La qPCR présente l'avantage de voir en temps réel le nombre de copies cibles présentes. Le signal fluorescent s'intensifie au fur et à mesure que l'ADN s'accumule et est ensuite comparé avec le signal produit par une quantité connue d'ADN (Thomsen *et al.*, 2012). Lorsque le seuil de la limite de quantification est franchi, cette approche fournit ainsi des informations sur la quantité d'ADN (semi-quantitatif) de l'espèce cible présente dans l'échantillon.

- **PCR digitale (dPCR ou ddPCR)**, qui permet d'avoir une approche **quantitative relative**. La méthode ddPCR (ou Digital Droplet PCR ou PCR digitale en gouttelettes) est la méthode utilisée par exemple par Bio-Rad et la dPCR (PCR digitale) par Qiagen. Les deux techniques reposent sur le principe de séparer la réaction d'amplification d'un fragment d'ADN cible en plusieurs petites réactions indépendantes. Autrement dit, c'est une technique PCR qui divise l'échantillon en des milliers de partitions. Une réaction PCR se produit dans chaque partition et la réussite de l'amplification est détectée par fluorescence (Pawlowski *et al.*, 2020).

Ces techniques moléculaires dites « PCR assay » sont largement utilisées pour des contrôles de détection de fraudes alimentaires, de dépistages de maladie (ex. COVID 19) ainsi que d'espèces dans le milieu naturel pour ses faibles coûts (ex. Dalmasso *et al.*, 2004 ; Gupta *et al.*, 2021). Elles ne **nécessitent en effet ni séquençage¹⁷ ni analyses bioinformatiques** mais demandent une grande rigueur dans la conception préalable des amorces spécifiques et l'interprétation des résultats.

14 - Et peut aussi augmenter les faux positifs si les conditions de laboratoire ne sont pas optimales

15 - Dans le cas du barcoding sur tissus ou spécimens défini par Herbert *et al.* (2003), l'assignation est réalisée soit en utilisant les outils de la plateforme BOLD (voir 2.5) soit des outils et base de référence propres à l'utilisateur.

16 - Dans ce cas, il est important d'ajouter un contrôle positif de l'espèce recherchée, contrôle positif qui est alors positionné sur la même plaque pour vérifier l'obtention d'un profil similaire

17 - Même si un séquençage est possible pour valider que le fragment amplifié correspond à la bonne espèce (ex. (Furlan *et al.*, 2016)

2.3.4 SÉQUENÇAGE MOLÉCULAIRE

Les séquenceurs permettent de « lire » les molécules d'ADN et de les traduire en texte¹⁸. Si la méthode de **séquençage de SANGER** (Sanger *et al.*, 1977) reste encore très utilisée pour des études en barcoding sur des tissus ou des spécimens notamment, elle présente l'inconvénient de ne pas permettre le séquençage simultané de nombreuses séquences. Depuis la fin des années 2000, de nouvelles technologies se développent notamment avec le séquençage dit de « nouvelle génération » -Next-Generation Sequencing (NGS) ou High-Throughput Sequencing (HTS) - qui regroupe l'ensemble des technologies de **séquençage haut débit** qui permet de séquencer plusieurs milliers voire millions de séquences différentes à la fois. Les séquenceurs dits de deuxième génération (Illumina, IonTorrent, etc.) nécessitent une amplification au préalable¹⁹. Ceux dits de troisième génération (ex. le Minion de Oxford Nanopore Technologies (ONT)) peuvent notamment s'utiliser sur le terrain sans amplification mais sur des séquences plus longues. On distingue les appareils qui fournissent des lectures courtes (MGI, Illumina, Ion Torrent) et des lectures longues (ONT, PacBio).

Le séquenceur étant couteux, la réalisation du séquençage est souvent confiée à des prestataires de services, *via* des plateformes de séquençage haut débit. Actuellement la technologie la plus employée est celle du séquençage par synthèse. Les technologies Illumina sont les plus utilisées pour le metabarcoding de l'ADNe. Elles surpassent actuellement les autres technologies

NGS en termes de profondeur et de précision (Deiner *et al.*, 2017). Par exemple, le séquenceur Illumina MiSeq produit environ 15 millions de lectures de 2x300 pb²⁰ et le NextSeq jusqu'à 400 millions de lectures de 2x150 pb. Plus d'informations sont disponibles sur les sites des fournisseurs, par exemple pour le séquençage Illumina²¹ ou dans des articles traitant du metabarcoding Nanopore par Oxford Nanopore (Krehenwinkel *et al.*, 2019) ou Pacific BioSciences (PacBio) (Tedesoo *et al.*, 2018).

Le séquenceur permet ainsi d'obtenir les séquences dans un format numérique et un nombre de « read » par séquence, c'est-à-dire le nombre de lectures de chaque séquence. De plus, la profondeur de séquençage (ou couverture) correspond au nombre de séquences totales pouvant être lues par échantillon. Elle dépend notamment de la plateforme de séquençage. C'est un élément important à prendre en compte car plus la profondeur de séquençage est importante plus on peut espérer trouver de l'ADN peu abondant (ex. espèces rares) dans l'échantillon analysé (en particulier dans les systèmes à forte diversité), mais plus le coût par échantillon augmente. En général, les études sur l'ADNe visent une profondeur de séquençage comprise entre 50 000 et 200 000 séquences par échantillon mais peuvent aller jusqu'à un million de séquences pour les études en milieu marin. Il est donc utile d'augmenter cette profondeur si l'objectif est la détection d'espèces rares (Bruce *et al.*, 2021).

2.4 Analyses bioinformatiques

Avec l'évolution de la technologie, des programmes informatiques ont été développés pour analyser les informations provenant des résultats des séquenceurs haut débit. Dans le cas du metabarcoding de l'ADNe, après l'étape de séquençage, différentes étapes de nettoyage et d'analyses des séquences nécessitant parfois l'utilisation de différents outils informatiques - regroupés sous le concept de « **pipelines** » - sont conçues par des spécialistes en bioinformatique (Hakimzadeh *et al.*, 2023 ; Coissac *et al.*, 2012) et doivent être adaptées en fonction de l'étude.

Les séquences peuvent être analysées à l'aide de programmes implémentés dans le package OBITools²² (Boyer *et al.* 2016). Certains pipelines sont disponibles sur Galaxy (ex. Boyer *et al.*, 2016 ; Dufresne *et al.*, 2019), R (ex. Keck & Altermatt, 2023), et des plateformes en ligne spécialisées (ex : Mitofish pour les poissons). Au cours de cette étape de bioinformatique, l'opérateur est amené à faire des choix afin de proposer *in fine*, si possible, un nom d'espèces pour chaque séquence, grâce aux bases de référence (voir 2.5.). Ces choix et les outils utilisés sont décrits dans les articles de recherche car ils peuvent influencer les résultats obtenus (Mathon *et al.*, 2021).

2.5 Bases de référence

Pour assigner une séquence issue d'un échantillon d'ADNe à une espèce, il faut la comparer aux séquences de référence disponibles pour l'espèce étudiée. Ces séquences de référence sont rassemblées dans des **bases de séquences de référence** (aussi appelées **bases**

de séquences moléculaires ou **banques de référence**). Les résultats d'assignation sont liés à la **complétude et à la précision de la base de référence** utilisée, il est donc recommandé de bien choisir la base de référence utilisée voire de combiner plusieurs bases. Ces bases

18 - Où chaque lettre représente un nucléotide.

19 - Sauf dans le cas d'une approche « shot gun » qui consiste à couper l'ADN total en morceaux d'une taille pouvant être lue par le séquenceur puis à le séquencer.

20 - En fonction de la flow cell utilisée - en paired-end (c'est-à-dire la molécule amplifiée est séquencée par les deux extrémités)

21 - <https://www.neb-online.fr/next-generation-sequencing/nebnext-kits-for-illumina/>

22 - <http://metabarcoding.org/obitools>

de référence sont alimentées principalement par les chercheurs et les organismes publics qui définissent les séquences de référence à partir de spécimens et tissus récoltés sur le terrain (Jean *et al.*, 2018). **Lors de la production d'une nouvelle séquence de référence, l'intervention d'experts, particulièrement de taxinomistes et de naturalistes, est indispensable pour garantir sa qualité.**

La majorité des revues scientifiques demandent que les données moléculaires soient rendues publiques comme condition de publication (Rourke, 2018), sans imposer de plateforme en particulier. Comme il existe de nombreuses bases de référence dans le monde et que chaque base présente des avantages et des inconvénients, il est surtout important de savoir ce que l'on manipule pour en faire bon usage et avoir une bonne interprétation des résultats. Certaines revues scientifiques demandent par exemple un enregistrement préalable (ex. via un numéro d'accès) au niveau de l'institut national américain, le **NCBI (National Center for Biotechnology Information)**, qui centralise les séquences au niveau de la base de référence GenBank (Benson *et al.*, 2006), mais elles peuvent aussi être déposées sur une plateforme de l'**Institut européen de Bioinformatique du Laboratoire européen de biologie moléculaire (EMBL-EBI)** ou sur des sites comme Dryad ou figshare ou des serveurs privés, tant que l'information est accessible.

L'INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration)²³ est une initiative de longue date entre EMBL-EBI, NCBI et National Institute of Genetics (NIG), et qui assure un échange régulier de données de couverture mondiale entre les 3 bases suivantes :

- **L'European Nucleotide Archive (ENA)**²⁴ est portée par l'**EMBL-EBI** qui est une organisation de recherche intergouvernementale financée par plus de 20 États membres et située près de Cambridge au Royaume-Uni. En décembre 2023, l'ENA contenait 20 000 milliards de bases de nucléotides dans plus de 3,2 milliards de séquences²⁵.
- **GenBank** est géré par le **NCBI**. La version de décembre 2023 contenait quant à elle 2 570 milliards de bases pour 249 millions de séquences²⁶. Toutefois dans la mesure où le NCBI a séparé schématiquement les données de GenBank et les données de WGS (Whole Genome Sequencing) qui représente plus de 24 651 milliards bases pour plus de 2,8 milliards séquences, le total représente donc plus de 3,1 milliards de séquences pour 27 222 milliards de bases²⁷.

A l'image d'autres bases publiques, GenBank présente l'avantage de centraliser beaucoup de données et d'être accessible, mais l'inconvénient de contenir de mauvaises identifications ou des identifications non vérifiables (ex. des séquences qui ne sont pas associées à un référentiel taxinomique à jour et/ou qui ne sont pas correctement associées aux spécimens dont elles proviennent) ; ce qui représente un frein réel à son utilisation en matière d'assignation taxinomique. Il n'y a pas d'étape de validation des métadonnées pour diffuser des séquences, certaines séquences ne sont pas publiées par ailleurs et le contrôle qualité et la mise à jour des données et des métadonnées sont très limités, comme cela a été montré pour les données génétiques de champignons (Nilsson *et al.*, 2006). Il est ainsi difficile (voire impossible) de corriger ou retirer une séquence erronée téléchargée dans la base. Il est estimé par certains experts qu'environ 10% seulement des mitogénomes de poissons téléostéens sont associés à un voucher dans GenBank. Il peut y être déposé tous types de données moléculaires (du génome complet aux zones non codantes...). Par ailleurs, les séquences doivent faire **au moins 200 paires de bases** (sans les amorces) pour être déposées dans GenBank, ce qui est rarement le cas pour les séquences issues d'étude de l'ADNe.

- La **DNA Data Bank of Japan (DDBJ)**²⁸ fait partie du NIG de la Research Organization of Information and Systems²⁹ à Mishima au Japon.

Le Barcode of Life Datasystem (BOLD)³⁰ (Ratnasingham & Hebert, 2007) est une plateforme d'acquisition, de stockage, d'analyse et de publication de données génétiques constituant une base de référence moléculaire à vocation d'identification des espèces. BOLD a été développé et est maintenu dans le cadre des projets portés par le consortium **iBOL** (international Barcode of Life, <https://ibol.org/>). Créé en 2018, iBOL porte aujourd'hui le projet **BIOSCAN** visant à poursuivre le développement des bases de référence ainsi que l'usage des outils génétiques dans la mise en place d'un système mondial de surveillance de la biodiversité. BOLD a été conçu et est maintenu par une équipe dédiée à l'Université de Guelph au Canada. Un miroir européen est en cours de lancement dans le cadre d'une collaboration entre iBOL et le projet Biodiversity Genomics Europe (BGE) qui porte le volet européen de BIOSCAN (BIOSCAN Europe³¹)³². Au 15/09/2023,

23 - <https://www.insdc.org/>

24 - <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>

25 - <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/about/statistics>

26 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>

27 - ENA et GenBank contiennent presque le même nombre de séquences dans la mesure où les bases sont en bonne partie synchronisées mais chacune a aussi des bases spécifiques. Par ailleurs les données de type SRA (Sequence Read Archive) ne sont visiblement pas comptées côté NCBI. Pour l'ENA en 2023, cela représente 28,7 millions de runs pour 54,1 Po de données et pour GenBank, il y avait 9 millions de runs pour 12 Po de données en 2019.

28 - <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>

29 - <https://www.nig.ac.jp/nig/>

30 - www.boldsystems.org

31 - <https://www.bioscaneurope.org>

32 - En France, le réseau FRBOL, visant à fédérer les acteurs français académiques et non-académiques (à l'instar, par exemple, de UKBOL au Royaume-Uni ou GBOL en Allemagne) impliqués dans la génération ou l'utilisation des séquences ADN a été initié dès 2019

BOLD renferme plus de 14 millions de séquences ADN (ou codes-barres ADN) représentant 251000 espèces animales, 72000 espèces végétales et 25000 espèces de fonge. Un registre automatique d'assignation des séquences à des groupements (clusters) génétiques est implémenté pour représenter un proxy des espèces indépendamment de leur identification taxinomique ; il renferme à ce jour 965000 unités moléculaires opérationnelles (MOTUs) appelés **Barcode Index Number (BINs)** (Ratnasingham & Hebert, 2013). Le moteur d'identification ne peut rechercher que des séquences faisant au minimum 100 paires de bases et BOLD est **très largement centrée sur les codes-barres ADN standards notamment le COI (DNA barcoding)** (voir 1.3), ce qui est peu propice à une utilisation pour l'ADNe. Il est cependant possible d'y intégrer d'autres marqueurs génétiques. Une autre plateforme de stockage et d'analyse, baptisée mBrave, nouvellement créée, représente le « pendant » métagénomique de BOLD, permettant la génération, le stockage, l'analyse et la publication de données issues des nouvelles technologies de séquençage. Cette plateforme est en lien direct avec BOLD pour l'intégration de bases de référence utilisées pour des analyses de metabarcoding.

Il existe aussi de très nombreuses bases de séquences de référence spécialisées (voir tableau 2) (dont les séquences sont parfois également disponibles dans les autres bases internationales décrites précédemment), comme par exemple :

- **UNITE** (User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza) Database³³ est une base de données de séquences d'ADNr (ADN ribosomique) pour l'identification de toutes les **espèces fongiques** (Xu, 2017) qui contient un peu plus de 800 000 séquences d'ITS. Cette plateforme

fournit un moyen de délimiter, identifier, communiquer et travailler avec des hypothèses d'espèces (Species Hypotheses = SH) basées sur l'ADN. Toutes les SH reçoivent un nom unique et stable sous la forme d'un DOI dans le GBIF. Les SH sont reliées à un nom de taxon et à sa classification dans la mesure du possible (phylum, classe, ordre, etc.) en prenant en compte les identifications pour toutes les séquences de la SH. Ces séquences sont publiées³⁴ pour être utilisées par la communauté scientifique dans, par exemple, des recherches de similarité de séquences locales et des pipelines d'analyse des technologies de séquençage haut débit (voir 2.3.4). Le système et les données sont mis à jour automatiquement à mesure que le nombre de séquences ITS fongiques publiques augmente (UNITE Community & Abarenkov, 2023). Il manque encore environ 50 % des séquences d'ADN des espèces fongiques connues dans les bases de séquences publiques³⁵.

- **MIDORIS**³⁶ est une base de référence pour les eucaryotes (Leray *et al.*, 2022).

- **Silva** est une des bases de référence de séquences d'ARNr 16S et 18S les plus riches pour les procaryotes (bactéries, archées) mise à jour et vérifiée fréquemment et gérée par l'Allemagne (Quast *et al.*, 2013).

- **DictDB** est une base dédiée à l'étude des flores digestives des insectes (Mikaelyan *et al.*, 2015).

- **R-SYST**, un réseau national regroupant une douzaine d'équipes de recherche³⁷ qui a pour objectif de développer un outil accessible à tous composé de bases de séquences regroupant tous les organismes étudiés par l'INRAE (insectes ravageurs, abeilles, parasitoïdes, champignons, etc.)

Database name	Organisms covered	DNA region targeted	Website	Reference
SILVA	Bacteria, Archaea, Eukaryota	16S/23S rRNA genes 18S/28S rRNA genes	www.arb-silva.de	(Quast <i>et al.</i> , 2013)
RDP	Bacteria, Archaea, Fungi	16S rRNA gene 18S rRNA gene, ITS region	rdp.cme.msu.edu	(Cole <i>et al.</i> , 2014)
Greengenes	Bacteria, Archaea,	16S rRNA gene	greengenes.lbl.gov	(DeSantis <i>et al.</i> , 2006)
EzTaxon	Bacteria, Archaea,	16S rRNA gene	www.ezbiocloud.net	(Chun <i>et al.</i> , 2007)
PR2	Protists	18S rRNA gene	Ssu-rrna.org/pr2	(Guillou <i>et al.</i> , 2013)
PHYtoREF	Photosynthetic eukaryotes	Plastidial 16S rRNA gene	phytoREF.org	(Decelle <i>et al.</i> , 2015)
BOLD	Animals, plants, Fungi	Mitochondrial COI Chloroplastic <i>rbcL</i> , <i>matK</i> ITS region	www.boldsystems.org	(Ratnasingham & Hebert, 2007)
UNITE	Fungi	ITS region	unite.ut.ee	(Kõljalg <i>et al.</i> , 2013)
MaarjAM	Arbuscular mycorrhizal, Fungi	Multiple	maarjam.botany.ut.ee	(Öpik <i>et al.</i> , 2010)
AFTOL	Fungi	Multiple	www.aftol.org	(Celio <i>et al.</i> , 2006)

↑ Tableau 2 : Bases de référence extrait de Taberlet *et al.* (2018)

33 - <https://unite.ut.ee>

34 - <https://unite.ut.ee/repository.php>

35 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4751>; <https://unite.ut.ee>

36 - <https://www.reference-midori.info/>

37 - <https://www6.inrae.fr/r-syst/Qui-sommes-nous>

Pratiques concernant les bases de référence en France

Il est d'usage dans les laboratoires de recherche d'utiliser les bases de référence internationales publiques associées à une base privée. Les chercheurs se constituent en effet souvent leur **propre base de référence** en utilisant des séquences nettoyées (ex. analyse de polymorphisme, **indice de confiance** concernant la qualité de chaque séquence) depuis une base de référence publique, auxquelles s'ajoutent des séquences de référence obtenues dans le cadre de projets de recherche.

La majorité des revues scientifiques demande lors de la publication d'un article scientifique que les données moléculaires soient rendues publiques sans imposer de plateforme en particulier. Certaines peuvent demander un enregistrement préalable, les séquences peuvent être déposées par exemple sur ENA ou sur des sites comme Zenodo, Dryad ou figshare, ou via certaines plateformes internes aux institutions de recherche ou des serveurs privés, tant que l'information est accessible.

Ces bases de référence constituent un fort enjeu pour la qualité des données issues d'ADNe. Il s'agit donc de **prioriser leur amélioration, leur exactitude et leur complétude** en fonction des **usages et des besoins** et de décider quel gène et marqueur et/ou quelle séquence pour quel taxon dans quelle zone géographique est à développer en premier. Actuellement, une « **gap analysis** » de séquences est menée au MNHN en comparant la base internationale **BOLD avec le référentiel français des espèces TaxRef** ³⁸ (200 000 espèces en France). L'objectif est d'améliorer les bases de référence en identifiant les taxons ayant des séquences dans BOLD et ceux qui n'en ont pas et de relever également les éventuelles erreurs (séquences pas toujours associées à une bonne identification ou pas toujours associées à un spécimen en collection par exemple). Citons également GAPeDNA, un outil en ligne hébergé par le CNRS, qui permet visualiser la complétude régionale des bases de référence pour les poissons, associés à leur statut de conservation (Marques *et al.*, 2021). Ce type d'outil peut

aider à identifier les zones prioritaires pour séquencer les espèces manquantes dans les bases et pourrait être développé pour d'autres taxons. Etant donné qu'il existe chez certaines espèces une grande variabilité génétique, cela souligne la nécessité de disposer, pour un marqueur donné et une espèce donnée, de plusieurs **séquences de référence représentatives de cette variabilité génétique intraspécifique**. Disposer d'une base de référence restreinte géographiquement en complément d'une base de référence publique nationale ou mondiale peut grandement **améliorer la fiabilité et le nombre d'espèces détectées** (Bourret *et al.*, 2023) ainsi que la résolution taxinomique et la connaissance sur les aires de distribution de ces espèces. La mise à disposition **d'une base de référence pour la France** (métropole et Outre-mer), qui prenne en compte le **polymorphisme intraspécifique** en mettant à disposition des séquences provenant de **différentes localités de l'aire de répartition des espèces**, représente un **enjeu pour la connaissance des espèces en vue de leur conservation**.

Enjeux :

Comme pour toutes les études fondées sur l'ADN, la qualité des données issues d'ADNe repose notamment sur la qualité des bases de référence utilisées. En s'appuyant sur les bases publiques et initiatives existantes, le développement d'une base de référence pour la France (métropole et Outre-mer) est nécessaire. Il est notamment utile de disposer de séquences de référence :

- rattachées à un spécimen en collection,
- issues de spécimens provenant de localités différentes pour tenir compte de la variabilité génétique intraspécifique.

Il est d'usage de disposer par espèce de plusieurs séquences de référence identiques issues (de spécimens différents) d'au moins trois localités différentes (ex: métropole, bassins biogéographiques, localité type). Face à ce constat, une PatriNat est à l'initiative d'un projet pour constituer un référentiel technique des séquences génétiques pour les espèces de France. Ce projet s'insère dans le cadre d'une collaboration entre le MNHN et l'OFB avec différents acteurs (Lacoeuilhe *et al.*, *in prep.*).



38 - TaxRef est le référentiel taxinomique de tous les organismes vivant en France métropolitaine et outre-mer. <https://taxref.mnhn.fr>

2.6 Interprétation des résultats

L'ADNe permet de détecter un **haplotype** (ou variant génétique)³⁹ **caractéristique d'une espèce** et d'obtenir des identifications qui correspondent à des **hypothèses de détermination** au regard de l'état des connaissances au moment de l'étude. Cette identification peut en effet évoluer dans le temps avec l'évolution des connaissances scientifiques notamment taxinomiques, des techniques moléculaires et des **bases de référence**.

Des **faux négatifs** (espèce non détectée dans l'échantillon alors qu'elle est présente sur le site de prélèvement) sont parfois constatés, par exemple dans le cas de la présence d'hybrides, d'une base de référence incomplète ou de l'utilisation d'un marqueur non adapté ou des stratégies d'échantillonnage et d'analyse non adaptées. Par ailleurs, bien que la présence d'une espèce soit connue dans le milieu échantillonné, son ADN peut être absent de l'échantillon d'ADNe pour plusieurs raisons. La principale est souvent la stratégie d'échantillonnage qui n'a pas permis de détecter l'ADN (ex. mauvaise couverture spatiale, mauvaise période, etc.). Une autre raison peut être que l'ADN, bien présent, est sous représenté par rapport aux molécules d'ADN d'autres espèces très abondantes qui masquent le signal, ou bien la séquence n'a pas pu être assignée, etc.

Des **faux positifs** (espèce détectée alors qu'elle est absente) peuvent aussi être obtenus lors d'une contamination ou d'une pollution génétique (ex. présence d'espèces strictement marines détectées dans des eaux douces ou inversement) ou d'une erreur d'assignation par exemple. Un cas classique est la détection d'espèces comestibles en aval des rejets des stations d'épuration.

Concernant les **résultats considérés suspects** - et soulignons que les méthodes dites traditionnelles ne sont évidemment pas non plus exemptes d'erreurs ou d'imprécisions dans l'identification des espèces - en toute rigueur, quelle que soit la méthode utilisée, il est recommandé de vérifier le résultat. Cela peut par exemple être fait en allant faire une **observation de visu pour valider ou invalider l'occurrence d'une nouvelle espèce dans un territoire**. Ainsi, même dans le cas d'une approche spécifique de l'ADNe, **l'absence d'une espèce ne peut pas être confirmée avec certitude** (même si une espèce n'est pas détectée dans les analyses, cela ne signifie pas qu'elle n'occupe pas le site étudié). Rappelons que, comme dans le cas des approches traditionnelles, c'est la répétition des échantillonnages sans détection qui conduit à conclure à l'absence.

L'assignation taxinomique d'une séquence repose sur sa similarité avec une séquence de référence. Pour réaliser ce travail, plusieurs plateformes mettant à disposition des bases de référence et proposent également des outils d'analyse comme par exemple l'outil Basic Local Alignment Search Tool (**BLAST**) proposé par NCBI. En sortie de séquenceur, les séquences peuvent être regroupées selon leur similarité en **MOTU (Molecular**

Operational Taxonomic Unit)⁴⁰ ou en **ASV** (Amplicon Sequence Variant ou Variant de séquence d'amplicon) (qui correspondent à deux méthodes différentes de regroupement de séquences). Ces concepts présentent l'avantage de donner certaines réponses en s'affranchissant du concept d'espèce, ce qui est particulièrement utile pour les espèces non encore décrites ou pour lesquelles les séquences de référence n'ont pas encore été définies. Ils peuvent aussi être utilisés pour calculer, par exemple, des indices de diversité ou travailler sur la diversité bêta (Marques *et al.*, 2020).

L'écologie de l'ADNe (voir 1.2) doit aussi être prise en compte pour interpréter les résultats. La vitesse de **dégradation** de l'ADN est variable en fonction des conditions environnementales. Dans les milieux aquatiques des régions tropicales chaudes, la persistance de l'ADN est moins longue, ce qui présente à la fois l'inconvénient de limiter la couverture spatiale d'un prélèvement d'ADNe, et l'avantage de limiter dans le temps la détectabilité des espèces étudiées. Dans les sols, la dégradation de l'ADN est très différente, souvent plus longue, l'ADN a tendance à s'adsorber sur les molécules organiques et à être très localisé (Taberlet *et al.*, 2012 c). Dans le cas de larges fleuves avec un débit important et quand l'ADN recherché est très abondant, l'ADN peut être **transporté** sur plusieurs dizaines de kilomètres comme cela a été montré sur le Rhône (Pont *et al.*, 2018). Toutefois d'autres résultats, qui utilisent une **approche combinée** de l'ADNe et de la pêche électrique, montrent que l'étude de l'ADNe n'offre pas une mesure intégrative de la biodiversité dans l'ensemble du bassin fluvial en amont, mais fournit une image pertinente des **assemblages de poissons locaux** (Hansen *et al.*, 2022). Le signal spatial collecté à partir d'ADNe serait ainsi comparable à celui collecté avec des méthodes fondées sur la capture qui décrivent la faune piscicole sur quelques centaines de mètres (Cantera *et al.*, 2021).

Remarquons qu'un parallèle peut être fait avec les observations à vue de nombreuses espèces mobiles (ex. oiseaux, mammifères marins, etc.) et pour la détection acoustique des chiroptères qui passent parfois à plusieurs mètres du détecteur d'ultrasons. Le point de prélèvement ou le point d'écoute n'est donc pas toujours exactement à l'endroit où se trouvait l'individu. C'est donc aussi à prendre en compte dans l'interprétation des résultats, particulièrement pour les **tendances spatio-temporelles à l'échelle locale** des espèces et des communautés (Goldberg *et al.*, 2016 ; Deiner *et al.*, 2017 ; Hering *et al.* 2018) et pour le **lien espèce/habitat**. La littérature permet d'avoir certaines estimations de la distance au-delà de laquelle le signal ADN disparaît et il serait donc intéressant de poursuivre les études pour mieux comprendre l'écologie de l'ADNe (Barnes & Turner, 2016) en fonction des contextes et des espèces étudiées.

39 - L'ensemble des haplotypes permet de rendre compte du polymorphisme génétique de l'espèce.

40 - Ensemble de séquences regroupées en fonction de leur similarité, considéré comme représentatif d'une OTU (unité taxinomique opérationnelle). Une OTU correspond au niveau taxinomique choisi pour être utilisé dans une étude (ex : l'individu, la population, l'espèce, le genre etc.). Ainsi une OTU ou une MOTU peut être considéré comme une « hypothèse d'espèce » ou SH = species hypothesis.

Du prélèvement sur le terrain au séquençage, **chaque étape demande des choix techniques et peut générer des erreurs ou de la variabilité dans les résultats** : sources de contamination (lors de l'échantillonnage sur le terrain, lors de l'extraction d'ADN, lors de l'amplification par PCR ou lors du séquençage entre échantillons du même *run* ou entre *runs* successifs), biais de quantification (ex. biais d'extraction, d'amplification par PCR ou de profondeur de séquençage), création de séquences chimériques⁴¹, assemblages artéfactuels de plusieurs séquences. Des erreurs de type substitution et insertion/délétion peuvent avoir lieu pendant ou avant la préparation des bibliothèques ou au moment du séquençage (erreurs de lecture par le séquenceur). Il est important de connaître ces biais biologiques, techniques et humains pour les corriger et les limiter autant que possible (Falentin *et al.*, 2019).

Quel que soit l'approche par ADNe choisie (spécifique ou multispécifique), l'interprétation des résultats repose aussi sur la **connaissance experte et la bibliographie**. La connaissance de l'aire géographique de répartition du taxon, de ses habitats et ses préférences écologiques peuvent permettre d'affiner les résultats et d'apporter un regard expert sur les assignations proposées.

Travailler avec des experts, notamment des **écologues**, à la fois en amont, pour définir les périodes optimales de prélèvement et le protocole adapté à la question posée, et aussi en aval, pour aider à interpréter les résultats, est donc vivement recommandé.

Soulignons que la probabilité de détection varie selon les espèces et peut être modélisée par espèce pour mieux interpréter les résultats (ex. estimer la probabilité de faux négatifs) (Prié *et al.*, 2023).

A l'avenir, l'interprétation des résultats pourrait être de plus en plus réalisée, avec le support de **l'intelligence artificielle**, en combinant les informations provenant de sources différentes (variables environnementales, données de pression, utilisation du web sémantique etc.).

Une fois les résultats interprétés, et éventuellement validés par un expert, il est important de **transmettre les données d'observation interprétées** (ou les observations d'espèces) dans les **systèmes d'information** dédiés en indiquant dans les métadonnées que les données sont issues d'ADNe⁴² ainsi que des informations permettant de comprendre les choix techniques qui ont permis d'obtenir la donnée.

Enjeux :

- Se concentrer sur la réduction des erreurs plutôt que sur la détection parfaite.
- Poursuivre le développement de nouveaux marqueurs et d'amorces plus résolutifs pour les espèces et groupes à enjeux.
- Garder à l'esprit que, comme pour toute méthode, du prélèvement sur le terrain à la phase de séquençage, chaque étape peut :
 - générer beaucoup de variabilité, ce qui constitue un enjeu en termes de comparaison de données,
 - générer des biais pouvant influencer les résultats et donc faire en sorte de les limiter au maximum.
- Organiser le stockage des différents types de données issues d'ADNe afin de pouvoir les réanalyser à la lumière de l'évolution des techniques moléculaires, de l'amélioration des bases de référence et de l'avancée des connaissances.
- Favoriser l'expertise en faisant intervenir un écologue en amont pour optimiser le protocole d'échantillonnage et en aval des projets pour aider à l'interprétation des résultats.
- Développer des indicateurs de biodiversité pertinents notamment pour répondre aux politiques publiques.

3. INTÉRÊTS, LIMITES ACTUELLES ET ENJEUX À TRAVERS LES MULTIPLES APPLICATIONS DE L'ADNe

Pour réaliser cette partie, des entretiens ont été réalisés auprès d'experts – utilisateurs ou non de l'ADNe – consultés pour recueillir leur avis concernant l'intérêt et les enjeux de l'utilisation de ADNe, ses avantages, ses limites, et identifier des priorités d'actions et certaines perspectives de recherche dans chacun de leur domaine d'expertise. Cette partie propose une synthèse de ces avis organisés par milieux - milieux dulcicoles, marins et terrestres - et est complétée d'informations issues de la littérature.

Les intérêts et les limites sont présentés dans cette partie sans prétendre à l'exhaustivité. Il faut toutefois souligner qu'ils sont souvent relatifs respectivement à l'objectif fixé et au niveau de maturité de l'approche. Les limites sont d'ailleurs davantage des points de vigilance

et il faut garder à l'esprit que l'étude de l'ADNe repose sur une recherche récente en plein essor (voir 1.4.) et que les pratiques et techniques sont amenées à évoluer et certaines des limites actuelles seront probablement dépassées.

Avant de développer quelques exemples d'utilisation de l'ADNe et les enjeux dans les différents milieux dulcicoles, marins et terrestres, il est nécessaire de préciser certaines définitions. Selon les acteurs et le contexte d'une étude, les termes utilisés recouvrent parfois des réalités différentes. En s'appuyant sur Campanule⁴³, une clarification des concepts et des définitions sont proposées afin d'harmoniser leur usage dans le cadre de ce document.

41 - les chimères sont des séquences "physiques" artéfactuelles produites au cours de la PCR

42 - En effet, par exemple ce sont les coordonnées du point de prélèvement (localisation de l'observateur) et non de l'individu détecté qui sont associées à une donnée d'occurrence issue d'ADNe.

43 - <https://campanule.mnhn.fr/concepts-et-definitions/>

Définitions

- Un **inventaire** naturaliste vise à établir une liste des espèces (ou d'habitats) présentes dans un territoire donné à une période définie. Dans le cas d'un inventaire de distribution, il s'agit de définir les lieux de présence d'un taxon ; pour un inventaire de site, il s'agit de lister les espèces observables dans le périmètre. Ces données peuvent être complétées par des informations quantitatives (effectifs, poids, etc.) ou qualitatives (comportement, etc.). Les modalités de collecte peuvent être encadrées par un protocole (inventaire protocolé) ou non (ex. recensement, contact) (ex : inventaire botanique en utilisant des quadrats entre juin et juillet dans une prairie humide).
- Un **suivi** repose sur des mesures répétées dans le temps dans le but de détecter des tendances d'évolution, généralement pour évaluer les effets d'actions de gestion sur une population, sur la dynamique d'une communauté ou sur des processus écologiques (ex : suivi botanique pluriannuel pour mesurer l'évolution des effets d'une fauche tardive dans une prairie).
- Un suivi temporel (comparable dans le temps) sans hypothèse particulière (c'est à dire qui ne vise pas à répondre à une question précise) relève de la notion de **surveillance**, qui permet de détecter des changements sans nécessairement en démontrer les causes. Un dispositif de surveillance est représentatif d'un territoire défini (ex : national) et permet d'obtenir des tendances d'évolution des populations pour répondre à des obligations réglementaires ou non (ex : l'observatoire Vigie Flore de Vigie Nature). Source : <https://campanule.mnhn.fr/>

3.1 Intérêts et avantages de l'ADNe

Un des atouts majeurs de l'utilisation de l'ADNe est la capacité d'offrir **une vision de potentiellement tout le vivant**, des microorganismes aux grands vertébrés, à partir d'un même échantillon.

Un autre atout largement mis en avant est le caractère **non invasif de l'ADNe pour les espèces**⁴⁴, ce qui est un argument majeur dans le contexte actuel d'érosion de la biodiversité. Il est facile d'imaginer que cet aspect sera regardé de plus en plus attentivement lors des publications scientifiques et par le grand public.

L'étude de l'ADNe se révèle particulièrement intéressante pour trouver et déterminer des espèces difficilement observables car **rares** (indigènes, menacées voire que l'on pense éteintes, en voie de disparition), cryptiques, en **très faible densité** localement ou de **petites tailles** (Jerde *et al.*, 2011) ou pour lesquelles leur détection ou leur identification par des méthodes traditionnelles peut être difficile, coûteuse, laborieuse ou invasive (voire létale). Certaines études montrent que l'ADNe permet la détection d'espèces **en danger** (Schmelzle & Kinziger, 2016) et des espèces **cryptiques et rares**, avec un **taux de succès plus élevé** que les méthodes traditionnelles (Schmelzle & Kinziger, 2016 ; Jerde *et al.*, 2011).

L'ADNe permet aussi de détecter précocement des **espèces non indigènes présentes en faible abondance** (Fonseca *et al.*, 2023; Fernandez *et al.*, 2022; Trebitz *et al.*, 2017), voire potentiellement **invasives** (Greenhalgh, 2023 ; Blackman *et al.*, 2022 ; Browett *et al.*, 2020 ; Dejean *et al.*, 2012 ; Jerde *et al.*, 2011). Cette détection précoce permet de mettre en place des mesures pour tenter de limiter les impacts négatifs d'un point de vue écologique, économique voire sanitaire qu'elles entraînent lorsqu'elles prolifèrent.

Grâce aux techniques moléculaires utilisées pour étudier l'ADNe, il devient **plus facile de détecter** les espèces **quel**

que soit leur stade de vie (stades larvaires difficilement visibles ou identifiables chez les insectes par exemple) comme par exemple pour les éphémères (Ball *et al.*, 2005) ou les coléoptères (Miller *et al.*, 2005).

Les territoires d'Outre-mer présentent une biodiversité particulièrement riche et de forts enjeux écologiques, comme le souligne le compteur pour Biodiversité Outre-mer⁴⁵, parmi lesquels un fort endémisme, des espèces considérées éteintes ou menacées, des espèces exotiques envahissantes : (EEE). Les études en ADNe peuvent donc notamment aider à :

- détecter **les espèces exotiques envahissantes**, comprendre les **historiques et les schémas d'invasion** (Dougherty *et al.*, 2016) comme par exemple pour l'écrevisse à griffes rouges (*Cherax quadricarinatus*) en Martinique (Baudry *et al.*, 2021) et le crabe vert à Saint-Pierre et Miquelon⁴⁶. Le sujet des EEE est majeur. A La Réunion⁴⁷ dans les milieux d'eau douce, posent soucis les NACS⁴⁸ relâchés (ex. tortue aquatique, poisson rouge) et dans les milieux terrestres, les chats et les rats menacent notamment les amphibiens et reptiles (ex. Lézard vert de Manapany menacé),
- **détecter les espèces endémiques** comme le « Poisson gale » (*Anablepsoides cryptocallus*), le seul poisson d'eau douce endémique de la Martinique et qui est une espèce dont l'aire de répartition est mal connue (Baudry *et al.*, 2023),
- **améliorer la surveillance de la mégafaune menacée et discrète** comme les **requins** et les **raies** comme le suggère une étude qui montre que l'ADNe permet d'étudier la répartition des requins dans les Caraïbes et le Pacifique (Bakker *et al.*, 2017) et une autre sur les requins et les raies à La Réunion (Mariani *et al.*, 2021),
- **surveiller les espèces emblématiques et menacées** comme les lamantins (Hunter *et al.*, 2018),

44 - Sauf si on se place à l'échelle des microorganismes

45 - <https://biodiversite-outre-mer.fr/>

46 - <http://especes-exotiques-envahissantes.fr/saint-pierre-et-miquelon-decouverte-du-crabe-vert-et-risques-associes/>

47 - <https://www.especesinvasives.re/>

48 - nouveaux animaux de compagnie

- étudier **les sols** à La Réunion (Lentendu *et al.*, 2023) et en Nouvelle-Calédonie (Fernandez Nuñez *et al.*, 2021),
- étudier la diversité des **poissons des récifs coralliens** : en étudiant par ADNe 226 échantillons d'eau de mer provenant de 100 stations dans cinq régions tropicales (Caraïbes, Pacifique central et sud-ouest, Triangle de corail et océan Indien occidental) et 2047 recensements visuels sous-marins dans 1224 stations, l'étude de l'ADNe révèle une biodiversité de poissons plus élevée (16 %), avec 2650 taxons et 25 % de familles en plus que les relevés visuels sous-marins (Mathon *et al.*, 2022),
- **retrouver des espèces difficiles à repérer sur le terrain et devenues très rares** comme les scinques (*Mabuya* sp.) ou la Couresse de la Guadeloupe (*Alsophis antillensis*) en Guadeloupe⁴⁹ voire considérées comme presque disparues comme la Chevrette leucocroce (*Macrobrychium hirtimanus*), une écrevisse de La Réunion.

Le metabarcoding de l'ADNe permet d'obtenir un **nombre d'espèces identique voire supérieur** à celui obtenu par les méthodes traditionnelles (Civade *et al.*, 2016 ; Valentini *et al.*, 2016). Une étude a montré que l'ADNe contenu dans environ 100 L d'eau filtrée provenant de différents points du Rhône permet de détecter autant d'espèces de poissons qu'en dix années d'inventaires par pêche électrique (Pont *et al.*, 2018).

Comparée aux méthodes traditionnelles, l'étude de l'ADNe semble économiser les efforts et réduire les coûts d'échantillonnage sur le terrain (Lyet *et al.*, 2021 ; Mena *et al.*, 2021), particulièrement dans le cas des espèces dont la détection est limitée. C'est le cas des mulettes qui vivent dans les sédiments, plus ou moins en profondeur et pour les petites espèces (ex. famille des Sphaeriidae, dont la taille des coquilles est inférieure à 1 cm) pour qui les méthodes par recherche visuelle (bathyscope) peuvent en effet s'avérer inefficaces. Le recours à l'ADNe, qui permet de détecter **généralement 20 à 30 % d'espèces de bivalves en plus que les méthodes traditionnelles**, semble ainsi une solution de détection à large échelle qui pourrait permettre de cibler les tronçons de présence et affiner dans un second temps les secteurs d'occurrence à l'aide de méthodes traditionnelles (bathyscopes, échantillonnages par excavation, etc.) (Prié *et al.*, 2021b).

L'approche par ADNe est une méthode qui peut être utilisée pour **l'inventaire et le suivi de nombreux groupes taxinomiques dans les milieux aquatiques, marin inclus**. Elle est de plus en plus utilisée dans les milieux d'eau douce et marins et est particulièrement prometteuse pour les sols. En détectant efficacement la communauté d'espèces présente, cette méthode permet aussi de développer des indices pour la bio-évaluation des écosystèmes et l'étude des effets des pressions ou de la restauration. Elle peut ainsi être utilisée par exemple pour suivre les effets de la **restauration d'écosystèmes** (y compris d'écosystèmes anciens à

partir de banques de graines par exemple), l'étude des **interactions plantes-pollinisateurs**, les réponses aux **pollutions** (Ruppert *et al.*, 2019). Elle est aussi utilisée pour étudier **l'effet de la gestion et des pressions anthropiques sur la biodiversité**, par exemple l'effet de la déforestation sur la biodiversité aquatique (poissons) et terrestre (mammifères) en Amazonie (Cantera *et al.*, 2022), l'effet des activités humaines sur la distribution de plusieurs espèces de mammifères le long de fleuves guyanais (Coutant *et al.*, 2021) ou encore l'influence de classer certaines zones marines en réserve (Dalongeville *et al.*, 2022 ; Boulanger *et al.*, 2021). Le metabarcoding de l'ADNe permet même d'obtenir des **dynamiques saisonnières et spatiales** des assemblages de poissons d'eau douce (Zhang *et al.*, 2023) et de vertébrés (Schjøtt *et al.*, 2023).

Enfin, l'utilisation de l'ADNe présente un avantage pour étudier certaines espèces dans les **habitats concernés par des réglementations** ou des **zones d'interdiction de prélever** que ce soit en eaux douces ou en mer (Aires Marines Protégées, cœurs de Parcs Nationaux etc.). De plus, contrairement aux méthodes qui utilisent le piégeage ou la manipulation d'espèces protégées, prélever des échantillons d'ADNe ne nécessite **pas de permis particulier**. Toutefois, comme pour toutes méthodes, cela demande de respecter la réglementation en vigueur et d'avoir **l'autorisation préalable** d'accéder au lieu de prélèvement. A cela s'ajoute le respect du **protocole de Nagoya**⁵⁰ notamment dans le cas de prélèvement d'un spécimen pour le séquençage de long fragment d'ADN pouvant générer un usage ; ce protocole s'applique aux ressources génétiques et sa déclinaison est propre à chaque pays.

Dans les zones **difficiles d'accès voire polluées ou dangereuses pour les plongeurs** (ex. les ports, certaines rivières dangereuses pour leur débit ou les espèces qui les occupent), l'utilisation de l'ADNe se révèle **pratique voire incontournable** car cela permet de mener des suivis sans avoir besoin de prendre de risques pour les opérateurs.

Afin d'améliorer rapidement la compréhension des systèmes écologiques complexes et d'aider à la conservation des écosystèmes qui subissent de grosses pressions des activités humaines, Carvalho & Leal (2023) soulignent le grand intérêt de l'ADNe pour intensifier la surveillance de la biodiversité des eaux douces. Le metabarcoding de l'ADNe et la modélisation au niveau communautaire permettent d'évaluer les facteurs complexes de la diversité des poissons et pourraient permettre des avancées en biosurveillance voire en bio-indication⁵¹. En **bio-indication**, il est possible de classer les espèces en fonction de leur sensibilité ou leur caractère opportuniste afin de calculer des indices en utilisant une somme pondérée de l'abondance relative et de leur poids écologique. Cela repose sur de l'identification taxinomique fondée sur les morpho-espèces tandis que l'ADNe peut offrir un **accès à l'intégralité des communautés** (des microbes aux animaux, même si le niveau de résolution n'est pas toujours celui de l'espèce) et permet, dans une certaine mesure, d'après certains

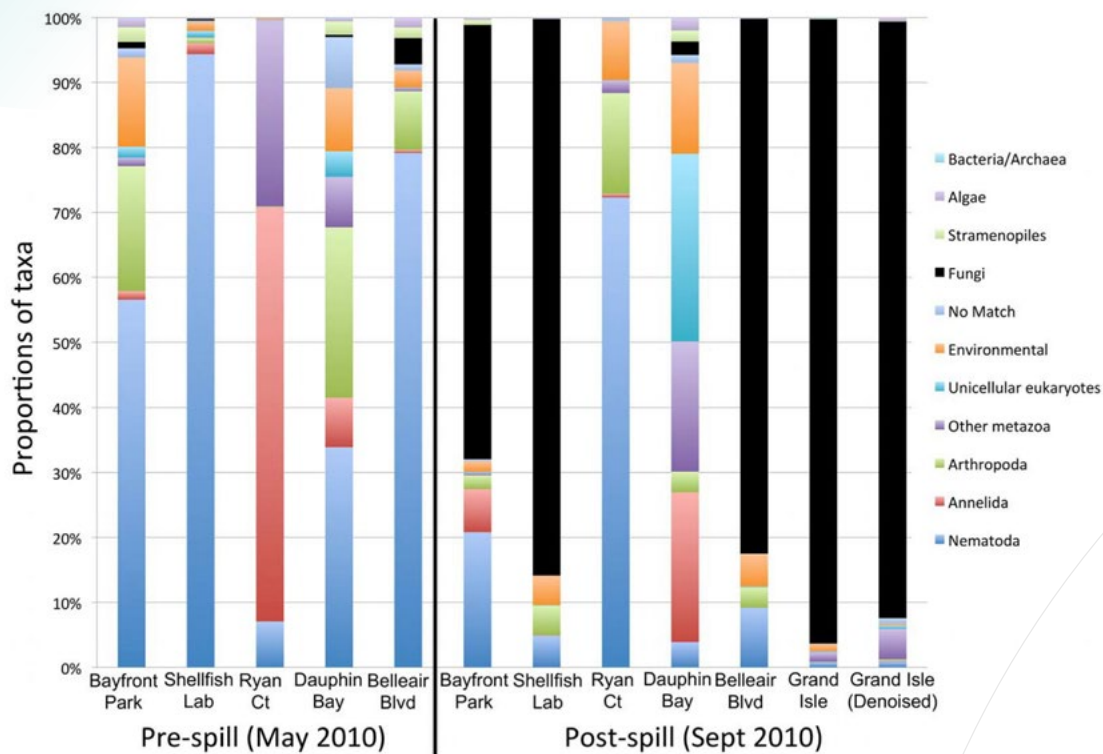
49 - <http://www.faune-guadeloupe.com/tag/scinques/>

50 - <https://biodiv.mnhn.fr/fr/documents/protocole-de-nagoya>

51 - évaluation biologique de l'état écologique des masses d'eau constitue une étape primordiale de la mise en œuvre de la directive-cadre sur l'Eau (DCE). Elle se base sur les résultats des réseaux de surveillance et les textes réglementaires en vigueur (source : <https://professionnels.ofb.fr/fr/node/317>).

auteurs, une **automatisation** de certaines étapes et une **standardisation des protocoles** facilitées par l'**absence de biais observateur** (Cordier *et al.*, 2021). L'approche par ADNe permet la **détection des changements radicaux et brutaux de communautés biologiques** pour évaluer l'état des écosystèmes comme par exemple dans le cas

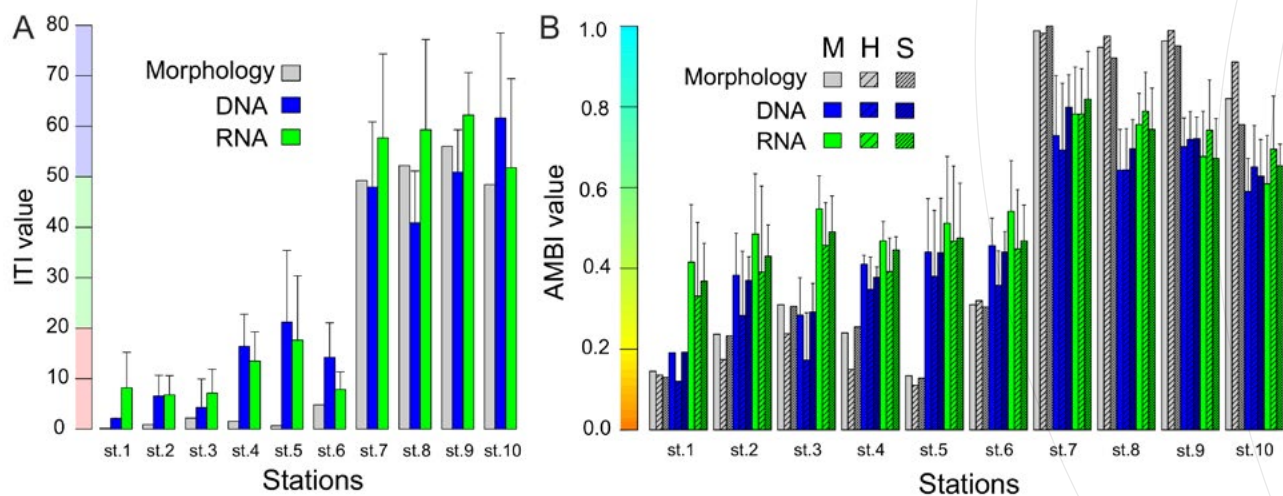
d'une étude d'une pollution au niveau d'une plateforme en mer (Bik *et al.*, 2012) (Figure 12) ou avec un gradient plus fin dans le changement des communautés dans le cas d'une aquaculture à travers des indices écologiques (Lejzerowicz *et al.*, 2015) (Figure 13).



↑ Figure 12 : Comparaisons taxonomiques des communautés de micro-eucaryotes avant pollution et après pollution, à partir de sédiments par l'étude de l'ADNe (Bik *et al.*, 2012).

Certaines études sur la bio-indication comparent les techniques traditionnelles qui s'appuient notamment sur la morphologie des espèces avec une approche utilisant l'ADNe (Figure 13). L'indice biotique déduit de la liste des taxons de macro-invertébrés obtenue à l'aide d'affectations taxinomiques fondées sur l'ADN s'avère comparable à celui déduit à l'aide de l'identification

morphologique (Aylagas *et al.*, 2016 ; Lejzerowicz *et al.*, 2015 ; Aylagas *et al.*, 2014). S'il reste des questions de bases de référence et de standardisation, ces études montrent que l'ADNe peut être utilisable pour l'évaluation de l'état des milieux et dans les programmes de surveillance (Aylagas *et al.*, 2016).



↑ Figure 13 : Comparaison des indices Infaunal Trophic Index (ITI) et AZTI's Marine Biotic Index (AMBI) obtenus par partir de méthode traditionnelle (Morpho-espèces), ADN et ARN (B- pour chaque station sont indiquées les valeurs AMBI calculées sur la base soit de la diversité de Shannon (H-AMBI ; barres peu hachurées), de la richesse spécifique (S-AMBI ; barres densément hachurées) ou des deux (M-AMBI ; barres simples) (Lejzerowicz *et al.*, 2015)

3.2 Limites de l'ADNe et points de vigilance

Plusieurs points de vigilance ont déjà été soulignés précédemment (ex. voir 1.2 et 2.3). Succinctement, rappelons par exemple les **bases de référence incomplètes ou erronées** qui limitent l'assignation taxinomique, la **localisation spatiale et temporelle imprécise** des espèces et **l'abondance ou la biomasse** des espèces difficile à obtenir pour l'instant.

D'autres points ont déjà été soulignés à la fois concernant les protocoles de terrain (voir 2.2) et l'interprétation des résultats (voir 2.6.). Toutefois, insistons sur le fait qu'il est indispensable de bien définir la **stratégie d'échantillonnage** pour qu'elle soit la plus intégrative possible, d'un point de vue spatial et temporel, si un inventaire exhaustif des espèces est visé tandis que dans le cas d'une approche spécifique, il s'agit davantage de cibler les préférences écologiques et la période d'activité optimale de l'espèce étudiée. De plus, le **nombre de points de prélèvement** et leur positionnement dans le temps et dans l'espace sont des choix majeurs du protocole. En 2021, tous milieux aquatiques confondus, toujours plus de 60 % des études par ADNe n'utilisaient que trois répliques terrain ou moins (Takahashi *et al.*, 2023). En milieu marin, la diversité détectée dans des échantillons prélevés simultanément dans les mêmes conditions peut varier considérablement, et même six répétitions (30 L chacune) peuvent sous-estimer la diversité locale (sur une surface <1km²) (Stauffer *et al.*, 2021). Les auteurs alertent sur le risque élevé de faux négatifs et/ou d'échantillons non représentatifs, qu'ils identifient comme un défi majeur dans la surveillance. Pour pallier cela, certaines études utilisent **des sous-échantillons**, c'est-à-dire plusieurs petits échantillons d'eau prélevés sur une zone, puis regroupés et homogénéisés, pour créer un seul échantillon composite qui peut être plus représentatif d'un système donné (Mena *et al.*, 2021) : cela pourrait devenir une pratique plus courante à l'avenir, en particulier lorsque l'objectif est de caractériser la diversité dans une grande masse d'eau (Miaud *et al.*, 2019). Par exemple, l'augmentation du nombre d'échantillons d'1L de 1 à 18 a entraîné une augmentation de la détection des espèces de 24,8 % pour les poissons/lamproies, 68,9 % pour les mammifères et 77,3 % pour les oiseaux (Macher *et al.*, 2021). Cantera *et al.*, (2019) ont détecté 87 % de la faune attendue avec un seul échantillon de 34 L d'eau douce tropicale. Le **positionnement du ou des points de prélèvement** d'ADNe est également un choix important pour éviter toute **contamination génétique**. Dans les milieux d'eau courants (fleuves et rivières), si une station d'épuration ou un élevage de poissons se trouve en amont du point de prélèvement initialement prévu, alors que ce sont les espèces spontanées qui sont étudiées, il est préférable de déplacer le lieu de prélèvement en amont de la station ou de s'en éloigner au maximum en aval (Verdier, 2022).

D'autres limites peuvent être ajoutées comme le fait que, comme souligné dans la partie 2.3., les techniques moléculaires présentent un **impact environnemental non négligeable** (ex. réactifs, déchets produits, matériel

à usage unique) qui est développé dans la partie perceptive de recherche (voir 4.7).

A noter que les méthodes traditionnelles (ex. détermination morphologique) permettent difficilement de distinguer les **hybrides** ; l'utilisation de l'ADNe également sauf si des marqueurs nucléaires sont utilisés. Dans le cas d'une population hybride, les résultats doivent être validés par un expert du groupe biologique concerné.

Les experts interrogés soulignent que **le recul n'est pas le même en fonction des milieux**. Si pour les milieux aquatiques, l'ADNe est déployé depuis plusieurs années, pour les **sols**, il reste **encore de la recherche** à effectuer notamment pour interpréter et utiliser les résultats. Beaucoup de séquences obtenues par l'étude de l'ADNe dans les sols sont toujours en attente de pouvoir être taxinomiquement assignées. De plus, ils ajoutent que l'ADNe améliore nettement la construction d'EBV⁵² sur la répartition des espèces mais ne renseigne pas sur les autres variables essentielles (taille de population, trait de vie, etc.). Connaître l'abondance d'une espèce est nécessaire pour l'étude des populations, la diminution des effectifs étant un signal d'alerte à prendre en compte avant la disparition locale de l'espèce. La surveillance des oiseaux, par exemple, nécessite de suivre le nombre (ou une estimation du nombre) de couples nicheurs, notamment pour répondre aux obligations de rapports au titre de la directive européenne Oiseaux, ce que l'ADNe ne permet pas de faire (c'est aussi le cas pour le suivi des oiseaux migrateurs et de leurs migrations, qui nécessite observation et comptages). Certains experts interrogés pensent ainsi que les principales limites de l'ADNe restent la **difficulté d'en extraire des indicateurs de tendance des effectifs** pour la surveillance terrestre (difficultés d'interprétation de la présence effective de l'espèce dans le milieu ciblé), l'impossibilité de conserver le spécimen si besoin d'éventuellement confirmer l'identification, le fait que l'ADNe ne semble **pas utilisable pour tous les compartiments ni tous les taxons**, par exemple pour les papillons ou les oiseaux, pour l'instant. Ils considèrent donc qu'il est préférable d'utiliser l'ADNe comme **moyen complémentaire**. Ceci étant dit, il est utile de rappeler que ce n'est pas tant que l'approche ADNe ne fonctionne pas (il est en effet possible de détecter des séquences d'oiseaux via l'ADNe par exemple), mais plutôt que certaines espèces laissent très peu de traces d'ADN dans le milieu. Par exemple, si un papillon se pose sur le sol, il ne laisse pas forcément d'ADN et, même s'il en laisse, pour le détecter, il faudrait prélever très précisément à l'endroit où il s'est posé⁵³. De plus, dans les sols, l'ADN de certaines espèces est **très localisé** (Zinger *et al.*, 2019). Il s'agit donc de réfléchir au développement de protocoles d'échantillonnage adaptés en fonction des espèces ciblées et de l'écologie de l'ADNe.

Le **coût** de l'ADNe est aussi une des limites avancées : la technique est perçue comme étant « très chère » par certains experts du monde académique tandis que

52 - Essential Biodiversity Variables = Variables essentielles de biodiversité

53 - Pour les pollinisateurs, l'ADNe via les plantes est davantage préconisé (voir 3.4.3)

d'autres relativisent en rappelant les résultats obtenus en comparaison des moyens utilisés par certaines autres méthodes comme par exemple : moyens à la mer⁵⁴, survol de zone avec gyrocoptère (50 ou 100 m au-dessus de l'eau pour faire des photos), temps passé sur le terrain, etc. Les moyens à la mer restent nécessaires pour les études d'ADNe en milieu marin, par contre le temps passé en mer peut être plus court, les zones parcourues (pour faire des transects par exemple) et les zones étudiées peuvent être plus vastes.

3.3 Besoin de standardisation

Malgré un débat permanent sur la normalisation au sein de la communauté scientifique travaillant sur l'ADNe, le domaine semble évoluer dans la direction opposée. Il existe en effet une grande diversité de protocoles de terrain et de méthodes de laboratoire, notamment pour les adapter aux différents systèmes d'étude et aux questions de recherche. Il est donc important de déterminer où et comment la standardisation, voire la normalisation, pourrait être mise en œuvre tout en permettant de poursuivre le développement méthodologique en plein essor (Takahashi *et al.*, 2023). D'autant que plusieurs études scientifiques soulignent le caractère « standardisable » de l'ADNe qui utilise des critères normalisés ou normalisables, reproductibles et vérifiables (Beng & Corlett, 2020 ; Sepulveda *et al.*, 2020). Certaines affirment que différentes étapes de l'approche metabarcoding de l'ADNe **doivent être davantage standardisées** (Hering *et al.*, 2018 ; Cristescu, 2014; Coissac *et al.*, 2012). La standardisation est en effet indispensable notamment pour comparer les sites et dans le cadre de suivis et de programme de surveillance.

Pour y parvenir, certains auteurs proposent de mettre en place cette standardisation à travers une initiative coordonnée pour la recherche et les politiques publiques d'évaluation de la biodiversité (Hering *et al.*, 2018 ;

Certaines de ces limites pourraient être **surmontées** grâce au développement de nouvelles technologies ou de nouveaux modèles prenant en compte les spécificités de l'ADNe (et de son écologie notamment (voir 1.2)). Cependant, d'autres préalablement citées semblent **inhérentes** à l'approche par ADNe et il s'agit donc d'évaluer soigneusement leurs effets sur les résultats (Couton *et al.*, 2023), notamment pour choisir l'approche la plus adaptée à l'objectif fixé.

Cristescu, 2014). Une norme du Comité Européen de Normalisation (CEN) pour la collecte d'eau pour l'ADNe⁵⁵ a vu le jour en 2022 et un projet de normalisation porté par l'AFNOR vient d'être initié en 2024.

Une revue de la littérature sur les acides nucléiques environnementaux ou « ANe » (qui regroupent l'ADNe et l'ARNe (voir 4.5)) souligne qu'un problème systématique dans les études en écologie de communautés par ADNe est le manque de détails **méthodologiques**, qui **compromettent la reproductibilité** (en particulier dans les nouvelles applications émergentes de l'ARNe). Pour faciliter la normalisation de la surveillance via les ANe dans les systèmes aquatiques et permettre une intégration plus poussée des applications ANe dans la surveillance de la biodiversité, il est recommandé d'une part d'améliorer les **bases de référence** et d'autre part de mettre en place des **lignes directrices qui encouragent la transparence méthodologique** (Bunholi *et al.*, 2023). Enfin, un des enjeux est notamment de proposer des formats cohérents de données et d'améliorer leur accessibilité sur des plateformes afin d'en faciliter la réutilisation et d'en exploiter pleinement la valeur en les associant à d'autres couches d'information (Berry *et al.*, 2021).

3.4 Exemples et enjeux de l'utilisation de l'ADNe par milieu – synthèse d'avis d'experts et de la bibliographie

3.4.1 EXEMPLES ET ENJEUX DE L'UTILISATION DE L'ADNe DANS LES MILIEUX DULCICOLES

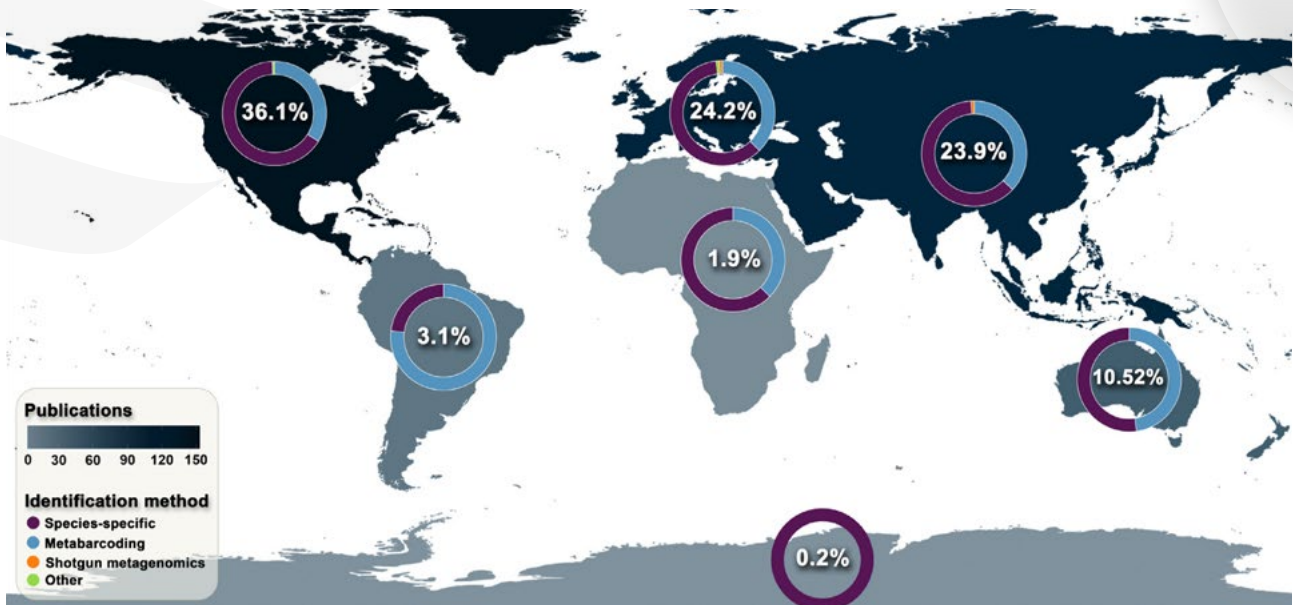
Les amphibiens et les odonates utilisent à la fois les milieux d'eaux douces et terrestres, le choix a été fait de les évoquer dans la partie 3.4.1 « Milieux dulcicoles » car c'est en eaux douces qu'ils sont le plus souvent étudiés par ADNe. Comme d'autres taxons, ils auraient pu être évoqués dans la partie 3.4.3 « Milieux terrestres ».

Les études utilisant l'ADNe ont commencé dans les milieux aquatiques (notamment les milieux d'eau douce), qui sont toujours aujourd'hui les milieux les plus étudiés (voir 1.4). Tandis que les forts enjeux touchant les écosystèmes d'eau douce sont connus depuis des années (Dudgeon *et al.*, 2006), la littérature montre que les travaux utilisant l'ADNe en eau douce se concentrent pour plus de la moitié sur les sciences de la conservation

avec l'étude des espèces envahissantes et en voie de disparition, suivies par celles sur les développements méthodologiques et 11 % seulement portent sur la diversité des espèces (Belle *et al.*, 2019). Un biais géographique évident est constaté quand sur 300 publications sur l'utilisation de l'ADNe et l'ARNe dans les systèmes aquatiques, environ **50 % sont réalisées dans six pays à revenu élevé**, tandis que **moins de 10 %** sont réalisées **en Amérique du Sud et en Afrique** (Bunholi *et al.*, 2023). L'Afrique, l'Amérique du Sud et les tropiques sont ainsi sous-représentés, quelques pays industrialisés de l'hémisphère Nord contribuent à plus de 70 % des études (Belle *et al.*, 2019 ; Takahashi *et al.*, 2023) (Figure 14).

54 - Instrumentation de terrain et embarquée, moyens nautiques, plongée

55 - Qualité de l'eau - Échantillonnage, collecte et conservation de l'ADN environnemental prélevé dans l'eau NF EN 17805 (source <https://norminfo.afnor.org/consultation/pr-nf-en-17805/echantillonnage-deau-pour-capturer-ladn-environnemental-macro-bien-dans-les-milieux-aquatiques/111213>)



↑ Figure 14 : Carte illustrant les proportions de publications ciblant les écosystèmes aquatiques sur sept continents. Les méthodes d'identification (spécifiques à l'espèce, metabarcoding, métagénomique shotgun et autres (génotypage de type SNP et spécifiques aux animaux génétiquement modifiés)) par région sont indiquées dans les graphiques circulaires. Les études sont attribuées au pays et au continent en fonction de l'endroit où le travail de terrain a été mené (Takahashi *et al.*, 2023)

3.4.1.1 Exemples d'utilisation de l'ADNe en milieu dulcicole

En 2008, une des toutes premières études utilisant l'ADNe visait à détecter, à partir d'échantillons d'eau douce, la présence de la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*), une **espèce exotique envahissante** en France métropolitaine (Ficetola *et al.*, 2008). Puis il a été montré que l'ADNe surpasse les méthodes traditionnelles d'étude des amphibiens en termes de **sensibilité et d'effort d'échantillonnage** et permet une détection précoce des espèces même à de très faibles densités et à tout stade de vie (Dejean *et al.*, 2012). Une étude récente montre que l'ADNe permet de **faciliter la détection**, le contrôle et l'éradication de la Grenouille taureau dès la première étape du processus d'invasion (Sanz *et al.*, 2023). L'efficacité de l'approche a aussi été montrée depuis presque dix ans maintenant pour des espèces d'Amphibiens non exotiques comme le Triton crêté (*Triturus cristatus*) (Biggs *et al.*, 2015). Plus récemment, l'approche par ADNe a permis d'étudier l'utilisation de l'habitat par les amphibiens à une échelle fine en zone humide (Guenat *et al.*, 2023).

L'utilisation de l'ADNe a permis de caractériser la **distribution, les associations d'habitats et l'état de conservation** d'un crustacé, l'écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*) (Baudry *et al.*, 2023 ; Quebedeaux *et al.*, 2023). Toutefois d'autres études suggèrent que la détection d'ADN de crustacé n'est **pas si simple** dans le cas de l'écrevisse invasive (*Procambarus clarkii*) en eau douce de milieu tempéré (Tréguier *et al.*, 2014). Une hypothèse avancée serait que la détection dépend de la capacité des individus à relarguer de l'ADN dans le milieu et donc de leur cycle de vie (plus d'ADN lors des périodes de mue et donc lorsque les populations sont jeunes).

Des études ont mis en évidence l'efficacité de l'ADNe pour étudier les probabilités de détection et déduire la répartition des de l'ADNe pour étudier les probabilités

de détection et déduire la répartition des **bivalves dulçaquicoles de France** (Prié *et al.*, 2023 ; Prié *et al.*, 2021b ; Prié *et al.*, 2021c). L'ADNe a notamment permis de réévaluer les enjeux de conservation des bivalves de France (Prié *et al.*, 2023)⁵⁶.

L'approche par ADNe présente l'avantage de rendre possible l'échantillonnage en grand milieu ou en période de hautes eaux, alors qu'un inventaire en « pêche électrique » ne serait pas représentatif ou pas possible techniquement. La haute **efficacité et sensibilité** de l'ADNe a été montrée dans les rivières et aussi dans les lacs (Meng *et al.* 2023 ; Chin, 2023). **Les taux de détection d'espèces de poissons atteignent ou dépassent ceux des études par capture** (avec des taux inférieurs de faux négatifs) (Chin, 2023). Sans représenter une mesure intégrative de l'ensemble du bassin versant en amont, l'étude de l'ADNe est capable de fournir une **image de la communauté piscicole sur quelques centaines de mètres**. En effet, le signal spatial recueilli à partir de l'ADNe semble **comparable à celui recueilli avec des méthodes fondées sur la capture** (Cantera *et al.*, 2022). Toutefois, la détection des espèces cibles par ADNe dépend des conditions hydrologiques, de la densité des espèces ou leur capacité à sécréter de l'ADN dans le milieu et d'un point de vue général de **l'écologie de l'ADN**.

Par ailleurs, l'utilisation de l'ADNe **occasionne moins de dérangement pour localiser une frayère** d'une espèce cible (Vautier *et al.*, 2023), ce qui est particulièrement important à certaines phases du cycle de vie comme la reproduction. Par une approche spécifique, l'ADNe permet en effet de confirmer la présence de l'espèce concernée voire, grâce à une ddPCR ou une qPCR (voir 2.3.3.2), d'avoir une estimation semi-quantitative des gamètes dans le milieu.

56 - Qui propose une méthode donnant une probabilité de détection de plus de 95 % pour la plupart des espèces de bivalves.

3.4.1.2 Enjeux et perspectives en milieu dulcicole

Pour pallier les difficultés d'amélioration des **connaissances de la biogéographie** des espèces rares et/ou « discrètes » vis-à-vis de l'observation humaine, utiliser l'ADNe se révèle particulièrement intéressant et efficace pour étudier les **Amphibiens** depuis de nombreuses années (Dejean *et al.*, 2012 ; Ficetola *et al.*, 2008). L'utilisation de l'approche spécifique de l'ADNe pourrait être envisagée pour étudier la répartition des Grenouilles du groupe des **Pelophylax**, dont les taxons présents en France sont difficiles à reconnaître ; on peut aussi citer le **cas des Crapauds communs** (*Bufo bufo*) et épineux (*Bufo spinosus*) dont la zone de contact est en cours d'étude, entre autres, par la Société Herpétologique de France (SHF), ou encore dans le cas d'espèces rares et menacées comme la Grenouille des champs (*Rana arvalis*) (trace retrouvée sur le territoire de Belfort sans voir l'individu (Vacher, 2019) ou de la petite salamandre (*Hynobius boulengeri*) au Japon pour laquelle l'ADNe s'est révélée être une méthode de détection efficace (Sakata *et al.*, 2023).

Un autre fort enjeu porte sur la détection et la surveillance **des parasites et des agents pathogènes** (Bass *et al.*, 2023) et notamment **la surveillance des pathogènes pour les amphibiens** avec particulièrement

l'espèce pathogène envahissante de chytride, le *Batrachochytrium dendrobatidis*, qui prolifère dans l'eau sous forme de spores et se répand soit au contact d'un amphibien soit en se déplaçant dans l'eau (Osman *et al.*, 2022)⁵⁷, et le Ranavirus que l'ADNe permet de détecter (Miaud *et al.*, 2019). L'efficacité de l'utilisation de l'ADNe pour la détection des **pathogènes des poissons** (Duval, 2022) et **des écrevisses** (Johnsen *et al.*, 2020 ; Rusch *et al.*, 2020) a aussi été montrée.

Les **odonates** constituent un groupe d'espèces emblématiques dites « sentinelles » des milieux stagnants et courants. Actuellement peu d'études existent sur l'utilisation de l'ADNe pour ce groupe alors que l'ADNe présente *a priori* un fort potentiel pour détecter les stades larvaires, témoins de la reproduction.

Cette approche fournit ainsi un moyen **prometteur et puissant** sur lequel fonder les futurs efforts de biosurveillance et d'évaluation des espèces (Meng *et al.*, 2023) et aussi pour la recherche et la **conservation des écosystèmes aquatiques** (Sahu *et al.*, 2023) et d'autant plus dans les écosystèmes riches en biodiversité comme les milieux tropicaux d'eau douce des **Outre-mer**.

3.4.2 EXEMPLES ET ENJEUX DE L'UTILISATION DE L'ADNe DANS LES MILIEUX MARINS

3.4.2.1 Exemples d'utilisation de l'ADNe en milieu marin

Les experts reconnaissent la puissance de l'étude de l'ADNe, le gain de temps et d'énergie qu'elle permet pour détecter la présence des espèces en milieu marin. Un avantage majeur souligné est son caractère **non destructif**, ce point est d'autant plus fondamental lorsque les prélèvements sont faits par exemple dans des zones de protection renforcée des Aires Marines Protégées (AMP) où il est interdit de pêcher ou plonger. Dans les zones portuaires, l'ADNe se révèle **pertinent** car cela permet de mener des suivis sans avoir besoin de réaliser des comptages dans ces zones qui peuvent être très polluées et dangereuses pour les plongeurs mais aussi interdites à la pêche (Manel *et al.*, 2024). La surveillance et les inventaires des espèces marines nécessitent des techniques notamment basées sur les méthodes visuelles et la capture par pêche qui peuvent se révéler biaisées et chronophages, ce qui limite notre compréhension de la répartition et de l'état des populations marines.

En utilisant la modélisation spatiale, Schmelzle & Kinziger (2016) ont montré les **limites des méthodes de capture traditionnelles** et notamment leur faible rendement par rapport aux coûts élevés et aux délais importants qu'elles nécessitent par rapport à l'ADNe. Les détections issues d'ADNe, validées grâce à la présence connue de gobies (*Eucyclogobius newberryi*) et aux qPCR, étaient **plus efficaces** pour représenter avec précision l'occurrence de ces espèces **que les détections effectuées par pêche à la senne** (Schmelzle & Kinziger, 2016). De même pour un **poisson cryptique**

endémique en Martinique, *Anablepsoides cryptocallus*, également appelé « poisson gale », l'utilisation de l'ADNe s'est révélée efficace tout en prenant moins de temps que la pêche conventionnelle (Baudry *et al.*, 2023). Dans le cas de l'étude d'une espèce de Gobi en danger (*Eucyclogobius newberryi*), l'approche par ADNe a permis de préciser les sites occupés notamment dans des endroits où il n'avait jamais été observé auparavant voire où l'espèce était considérée comme localement éteinte (Schmelzle & Kinziger, 2016). Le metabarcoding de l'ADNe a permis d'inventorier **plus de 90 % des taxons capturés** et de reconstruire la **structure globale des assemblages d'espèces** des sites étudiés, reflétant les différences attendues liées aux principaux facteurs socio-environnementaux (profondeur, distance de la côte et effort de pêche) (Giulia *et al.*, 2023).

En identifiant des espèces à la fois pélagiques, associées aux récifs et crypto-benthiques, le metabarcoding de l'ADNe offre une nouvelle vision des assemblages d'espèces marines. Le metabarcoding de l'ADNe a en effet permis d'obtenir la trace d'**espèces pélagiques non capturables** au chalut mais présentes dans le milieu (Giulia *et al.*, 2023) et révèle une biodiversité de poissons plus élevée (16 %), avec 2 650 taxons et 25 % de familles en plus que les relevés visuels sous-marins au niveau global (Mathon *et al.*, 2022).

La détection de l'ADN d'individus de Grands Requins blancs (*Carcharodon carcharias*), en danger critique d'extinction, a permis d'extrapoler leur répartition spatio-temporelle et de développer une stratégie dans

57 - Les auteurs proposent dans cet article des suggestions pour un programme national de surveillance par ADNe pour la Norvège

une zone peu connue pour cette espèce (Jenrette *et al.*, 2023). De plus, notons la redécouverte en Corse du Requin Ange (en danger critique sur la liste rouge IUCN) grâce à l'ADNe (Faure *et al.*, 2023). Comme le soulignent ces études, la **surveillance systématique** par ADNe est un **outil prometteur** pour élaborer des **politiques de conservation** des derniers bastions de requins de Méditerranée.

L'utilisation de l'ADNe permet également de détecter les **Mammifères marins** (Haderlé *et al.*, 2023 ; Fellgren, 2022 ; Vigilife, 2021 ; Cartier *et al.*, 2021). L'ADNe peut même être utilisé en **sciences participatives** pour réaliser des **suivis d'espèces rares** comme le **Phoque moine** (*Monachus monachus*), l'une des espèces de pinnipèdes les plus menacées au monde et la seule espèce de Phoque de la mer Méditerranée (Valsecchi *et al.*, 2023).

Les espèces endémiques peuvent être supplantées par les **espèces non indigènes** (ENI), ce qui souligne l'importance d'étudier et surveiller les zones avec un fort taux d'endémicité comme cela a été montré en mer Rouge (Fonseca *et al.*, 2023 ; Fernandez *et al.*, 2022). L'intérêt d'utiliser l'ADNe pour la **détection précoce des ENI marines** a été montré notamment dans le cas d'études ciblées et pour la surveillance temporelle et spatiale des ENI (Couton *et al.*, 2022 ; Holman *et al.*, 2019).

La National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) des Etats-Unis a récemment proposé d'utiliser l'ADNe par exemple pour détecter les espèces marines considérées comme « nuisibles », surveiller les impacts de l'aquaculture, gérer les pêcheries, et suivre la biodiversité à valeur commerciale (Lodge, 2022). Par ailleurs, le développement de l'**éolien offshore** nécessite

3.4.2.2 Enjeux et perspectives en milieu marin

L'utilisation de l'ADNe apparaît comme un outil potentiel pour évaluer la biomasse et les populations de poissons afin de faciliter les évaluations des stocks, essentielles pour éclairer les décisions en matière de gestion durable des pêches. Pour modéliser la biomasse à partir d'ADNe, des **tests spécifiques (qPCR)** ont notamment été conçus pour trois espèces de poissons économiquement importantes : le Bar noir (*Centropristis striata*), la Plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*) et la Plie d'été (*Paralichthys dentatus*) (Kirtane *et al.*, 2021). L'ADNe permet l'identification des poissons au stade de larves, ce qui peut aussi avoir un intérêt dans la gestion des pêches (Satterthwaite *et al.*, 2023).

Quand de nombreuses études suggèrent que l'ADNe a ainsi le potentiel de **révolutionner le suivi des pêches** (ex. Kirtane *et al.*, 2021), d'autres soulignent que c'est un outil **complémentaire** qui ne doit pas remplacer les méthodes d'évaluation éprouvées et que l'enjeu

d'apprendre à concevoir, implanter et exploiter de vastes structures artificielles tout en minimisant leurs impacts sur les milieux. Le Bureau of Ocean Energy Management (BOEM) du Département américain de l'intérieur a financé des recherches en vue d'utiliser l'ADNe pour surveiller la distribution et l'abondance des espèces, comme cela a déjà été fait dans les installations énergétiques offshore européennes (Lanzén *et al.*, 2021). L'ADNe pourrait se révéler utile pour travailler à la fois dans des sites **d'implantation d'EMR** (Energies Marines Renouvelables) et aussi dans des Aires Marines afin d'étudier par exemple le plancton et pour mieux connaître les poissons en fonction de leur milieu de vie,⁵⁸.

Le projet **Aires Marines Sentinelles**, porté par Vigilife et les unités de recherche MARBEC et CEFE de l'Université de Montpellier vise notamment à étudier, par metabarcoding de l'ADNe, les effets du **changement climatique sur les communautés de poissons** au niveau des côtes françaises métropolitaines. La mission BiodivMed⁵⁸ utilise l'ADNe pour déployer des inventaires de biodiversité à larges échelles : en 2023, 700 échantillons ont été prélevés sur 2 000 km dans les eaux marines et saumâtres.

Enfin, deux études en Méditerranée ont développé, grâce à des résultats obtenus par ADNe, des indicateurs fondés sur les caractéristiques des poissons, la phylogénie et la vulnérabilité à la pêche (ex : diversité fonctionnelle et phylogénique, richesse en espèces démerso-pélagiques et benthiques) et ont montré que l'ADNe permet de réaliser des **analyses comparatives** à partir de ces indicateurs entre des milieux gérés différemment, par exemple **entre des zones classées en réserve et hors réserve** (Dalongeville *et al.*, 2022).

consiste désormais principalement à **standardiser voire normaliser** les méthodes. Ils ajoutent alors que la recherche doit se focaliser sur le **développement de tests** d'une part pour traiter les effets des facteurs environnementaux et d'autres part pour valider les protocoles afin de pouvoir tirer des **conclusions fiables** (Ramírez-Amaro *et al.*, 2022). Les experts consultés insistent donc sur la **complémentarité** des approches traditionnelles et de l'étude de l'ADNe :

- le comptage visuel et la pêche offrent une information sur la démographie des populations, spectre de taille des poissons par espèce ;
- l'échosondage permet de travailler à des surfaces plus grandes qu'en plongée pour les poissons pélagiques et benthopélagiques ;
- l'ADNe est capable d'apporter une liste d'espèces notamment les poissons cryptobenthiques.

58 - <https://www.umontpellier.fr/articles/mission-biodivmed-2023-ladn-environnemental-pour-une-cartographieinedite-de-la-biodiversite-marine-mediterrannee>

Ils ajoutent que l'ADNe, couplé aux méthodes traditionnelles, a toute sa place dans la **stratégie de surveillance en France** et pourrait ainsi être utile pour la surveillance des littoraux et des milieux marins, pour les foraminifères, pour la **classification des milieux benthiques** et pour les **mammifères marins**. Selon les experts consultés, les enjeux se révèlent toutefois différents selon les groupes :

- Espèces non indigènes, poissons, céphalopodes, crustacés : utilisation en cours ;
- Oiseaux marins : s'agissant surtout d'un besoin de connaître le nombre de couples reproducteurs, le succès reproducteur et les lieux de reproduction, l'ADNe s'avère peu utile pour l'instant sauf peut-être pour l'étude des zones de chasse de certains oiseaux pélagiques ;
- Tortues marines : s'agissant surtout d'un besoin de connaître leur utilisation de l'espace, les zones fonctionnelles, les interactions avec la pêche, la télémétrie répond mieux que l'ADNe aujourd'hui.
- Mammifères marins : la sous-famille des *Delphininae*, qui comprend entre autre les genres *Tursiops*, *Delphinus* et *Stenella*, est connue pour constituer un challenge en matière de systématique moléculaire, et nécessite une révision approfondie. De plus, les distances génétiques peuvent être importantes au sein des espèces, à l'exemple des 2 écotypes connus chez le Grand Dauphin (*Tursiops truncatus*) : une forme pélagique et une forme côtière. Cela peut se traduire par des **différences génétiques au sein des espèces parfois plus importantes qu'entre individus de différentes espèces**. Les amorces généralistes « mammifères » ne semblent en effet pas suffisamment « résolutive » pour ce groupe, ce qui constitue un enjeu de développement supplémentaire, et une piste de recherche pour travailler à l'échelle des individus (Alfonsi *et al.*, 2013 ; Perrin *et al.*, 2013).

Même si le metabarcoding de l'ADNe a des limites et des biais, son efficacité pour la surveillance des ENI notamment lors de l'arrivée des premiers individus et pour les **premiers stades de développement** (ex. le ciblage de stades larvaires pélagiques dans le zooplancton), permettrait de soutenir les stratégies de gestion comme la **Directive-Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM)** (Couton *et al.*, 2019).

Les experts consultés ajoutent l'intérêt de :

- sécuriser **tel couple d'amorces associé à tel marqueur pour telle espèce dans telle région géographique** avec par exemple la création de **bases de référence locales**, car beaucoup d'utilisateurs se plaignent de mauvaise assignation dans les bases de référence publiques ;
- travailler sur la **reproductibilité des études et inter-calibration** entre laboratoires ;

- mettre en place un système de **validation des méthodes** ;
- mettre en œuvre des suivis systématiques utilisant l'ADNe lorsque les protocoles sont aboutis et que le rapport coût / efficacité est favorable ou lorsque la plongée est difficile ou non autorisée ;
- mettre l'accent sur la surveillance de sites à enjeux, comme par exemple dans la Baie de Fort-de-France en Martinique, relativement peu étudiée, et où il y a beaucoup d'espèces de poissons et d'élaémobranches.

Plusieurs experts soulignent l'importance et l'urgence de mettre en place des **formations** à destination des gestionnaires et du plus grand nombre pour augmenter les échantillonnages afin de **déployer en routine** l'utilisation de l'ADNe. Certains experts identifient que l'enjeu pour les milieux marins est désormais de faire rentrer l'utilisation de l'ADNe dans les **plans de gestion** avec des prélèvements hebdomadaires ou bimensuels et disposer d'un **réseau en routine pour la DCSMM** et donc, pour cela, de disposer de moyens, de déployer la technique de façon opérationnelle, d'optimiser les réseaux de surveillance, de co-développer des protocoles avec des experts, d'optimiser les points de prélèvements. Aujourd'hui, certains experts regrettent que chaque aire marine fasse ses propres suivis et qu'il n'y ait pas de système d'observation à l'échelle de la façade maritime entière et pensent que l'étude de l'ADNe permettrait d'apporter de la **cohérence aux suivis**. Enfin, il est souligné la nécessité de comprendre ce qui se passe à des échelles plus vastes pour bien comprendre ce qui se passe localement, et donc, pour parvenir à cela, l'importance des réseaux d'acteurs et de la remise en contexte dans les suivis.

Plusieurs projets de recherche ambitieux (ex. **ATLASEA**⁵⁹, **FUTURE-OBS**⁶⁰), liés de près ou de loin à l'ADNe, se lancent actuellement, ce qui montre une **dynamique sur les milieux marins**. Des recherches récentes portent sur l'amélioration des techniques, par exemple sur :

- la **collecte passive de l'ADNe** dans les systèmes marins tropicaux et tempérés, en submergeant directement les membranes filtrantes (nylon chargé positivement et ester de cellulose non chargé) dans la colonne d'eau (Bessey *et al.*, 2021) ;
- **l'utilisation de plusieurs types de bateaux** pour les prélèvements d'eau afin d'étudier les mammifères marins en Guadeloupe. Si globalement cela ne semble pas avoir d'influence, les résultats en cours d'analyse permettront de le confirmer ou non.

D'autres soulignent les thématiques de recherche de davantage étudier comme le développement de séquences de référence pour certains groupes moins étudiés comme par exemple les **macroinvertébrés** dans les substrats meubles ou les coraux. L'étude de l'ADNe est **prometteuse pour la détection d'espèces en haute mer** afin de mieux prendre en compte la **structure tridimensionnelle de l'océan dans le suivi et**

59 - Programme de recherche français qui vise à séquencer 4500 génomes d'espèces (Eucaryotes) du domaine maritime. ATLASEA, à travers son référencement dans ERGA (<https://www.erga-biodiversity.eu/>), sera affilié au projet international Earth Biogenome Project, qui vise à séquencer la totalité des espèces vivantes. Les séquençages seront réalisés par le Genoscope du CEA et les résultats attendus pour 2028 seront intégrés à une base de données « open source ». Le MNHN fait partie du comité de pilotage tout comme Sorbonne Université, Paris Sciences Lettres, Aix-Marseille Université, Ifremer. Ce projet contribuera donc forcément à l'amélioration des bases de référence.

60 - Observatoire augmenté pour les socio-écosystèmes côtiers. <https://www.sorbonne-universite.fr/actualites/ocean-lagence-nationale-de-recherche-soutient-un-projet-porte-par-sorbonne-universite>.

la **conservation de la biodiversité marine** (Duhamet *et al.*, 2023). Toutefois, les applications de l'ADNe **en haute mer restent rares** pour l'instant et les questions concernant les stratégies d'échantillonnage restent à approfondir. Une des autres perspectives de recherche consiste à **compléter les bases de référence publiques**, notamment pour les **espèces «endémiques profondes»** (Duhamet *et al.*, 2023). Une revue récente de Suarez-Bregua *et al.*, (2022) souligne un énorme potentiel de l'ADNe, comme outil complémentaire des relevés visuels traditionnels, pour améliorer les **programmes de surveillance** pour l'évaluation et la conservation des mammifères marins, et permettrait de combler certaines **des lacunes dans les connaissances** de nombreuses

espèces menacées et en voie de disparition. Elle souligne également que les études doivent désormais porter sur **l'influence des facteurs environnementaux** (par exemple, température, courants, marées, etc.) sur la détection de l'ADNe dans l'environnement marin, afin **d'optimiser l'échantillonnage** et **d'améliorer l'interprétation** des détections et des non-détections obtenues par l'ADNe (Suarez-Bregua *et al.*, 2022).

Enfin, si l'ADNe ne permet pas directement d'étudier les habitats, en accédant à la liste des espèces, cette approche pourrait permettre d'obtenir des indices fonctionnels utiles à l'évaluation de l'état des habitats notamment pour répondre aux attentes du « règlement restauration ».

3.4.3 EXEMPLES ET ENJEUX DE L'UTILISATION DE L'ADNe DANS LES MILIEUX TERRESTRES

3.4.3.1 Exemples d'utilisation de l'ADNe en milieu terrestre

L'ADNe peut être utilisé pour étudier les espèces des milieux terrestres à partir des zones d'eau qu'elles fréquentent soit directement (pour boire ou effectuer une partie de leur cycle de vie) soit indirectement (eau de ruissellement par exemple). Plusieurs études ont montré le potentiel de l'utilisation de l'ADNe pour évaluer les communautés de mammifères à travers les fleuves et les cours d'eau en Amazonie (Cantera *et al.*, 2022 ; Coutant *et al.*, 2021 ; Mena *et al.*, 2021). En 2018, une étude explore la possibilité d'inventorier les mammifères terrestres en étudiant l'ADNe extrait à partir d'échantillons d'eau. 60 pièges photos sont déployés sur 1 000 kilomètres carrés au Canada. L'échantillonnage ADNe a permis de détecter davantage de mammifères, dont des espèces menacées, que les pièges photos (Lyet *et al.*, 2021).

Son potentiel est aussi identifié pour répondre à l'enjeu grandissant des **espèces exotiques envahissantes (EEE)** (ex. Tortue de Floride (*Trachemys scripta elegans*), Tortue serpentine (*Chelydra serpentina*), Couleuvre asiatique (vendue dans les animaleries et naturalisée en Belgique) ou encore de certains Amphibiens retrouvés dans les plantes cultivées).

Etant donné que les connaissances des espèces vivant **dans les sols** sont encore imparfaites et les bases de référence très incomplètes, les séquences génétiques obtenues par ADNe ne sont parfois pas toutes assignées (au niveau de l'espèce, voire même à des niveaux taxinomiques supérieurs). Elles peuvent néanmoins être utilisées sous la forme de MOTU (ou ASVs) (voir 2.6). L'ADN a été utilisé pour réaliser **l'Atlas français des bactéries du sol** (Karimi *et al.*, 2018), qui inclut une cartographie par grand groupe de bactéries, réalisée à partir des échantillons de sol composites prélevés sur les sites du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS)⁶¹. Ces échantillonnages ont également permis d'étudier la **richesse** et la **diversité microbienne** par extraction d'ADN

bactérien et fongique (Génosol).⁶² Il n'existe aujourd'hui aucun réseau de surveillance qui s'intéresse à l'ensemble de la biodiversité des sols. Certains travaux sur les **vers de terre** montrent des résultats concordants avec les tris manuels (Bienert *et al.*, 2012) quand quelques années plus tard le metabarcoding de l'ADNe permet d'obtenir une plus grande diversité de vers de terre qu'une approche morphologique (Lilja *et al.*, 2023). Toutefois, il semble que les méthodes d'extraction de l'ADN des sols aient un impact significatif sur l'estimation de la diversité des vers de terre (Lilja *et al.*, 2023) et il s'agit donc de rester prudent sur les conclusions. Par ailleurs, un vaste **programme de suivi de la biodiversité des sols** dans les Alpes françaises utilise l'ADNe pour étudier les **réseaux multitrophiques** des sols dans différents habitats forestiers et prairiaux (Calderón-Sanou *et al.*, 2023).

L'utilisation de l'ADNe pour étudier les **plantes** est plus récente mais semble également bien fonctionner (Johnson *et al.*, 2023 a). Les sujets d'étude ne manquent pas, que ce soit à partir d'une partie de la plante (pollen, fragment de fleur ou de feuille par exemple), terrestre ou aquatique, l'ADN ancien de plantes ou l'ADN provenant de sols ou de sédiments (Johnson *et al.*, 2023 a).

Les prélèvements d'ADNe à partir du miel permettent de **connaître les ressources florales disponibles** pour les abeilles (Jones *et al.*, 2021). L'ADNe se révèle ainsi utile pour **identifier et authentifier les origines florales et géographiques** du miel en révélant les signatures ADN bactériennes, végétales et d'abeilles mellifères (Pathiraja *et al.*, 2023). Concernant les **pollinisateurs**, quelle que soit la méthode utilisée, ils sont très souvent tués pour être identifiés. **L'identification non létale des individus** représente un enjeu pour l'étude des populations et la conservation de ces insectes. Des protocoles d'extraction d'ADN ont été récemment mis au point à partir de **traces** (poils, excréments etc.) **laissés par les abeilles sur les fleurs** butinées (Canale-Tabet *et al.*, 2021).

61 - <https://www.gissol.fr/>

62 - https://www2.dijon.inrae.fr/plateforme_genosol/

3.4.3.2 Enjeux et perspectives en milieu terrestre

Une revue de la littérature de 2012 à 2023 met en avant que, malgré de nombreuses avancées scientifiques, l'étude de l'ADNe dans les milieux terrestres offre encore un **vaste champ d'exploration scientifique**, tout en soulignant les contraintes techniques (ex. standardisation, détectabilité et transports de l'ADNe dans les sols d'une part et, échantillonnage, extraction et séquençage de l'ADN d'autre part) ainsi que les défis à relever (ex. standardisation des protocoles, gestion des données) (Hassan *et al.*, 2022). Certaines espèces dites « terrestres » nécessitent par exemple **des protocoles adaptés**, pour être étudiées par ADNe. Des chercheurs ont réussi à extraire, à partir de toiles d'araignées, de l'ADN d'araignées (Blake *et al.*, 2016). Plus récemment, les toiles ont été utilisées comme des "biofiltres passifs" pour en extraire de l'ADN de vertébrés vivant à proximité des toiles étudiées (Newton *et al.*, 2024).

Certains experts consultés pensent que les techniques utilisant l'ADNe vont se développer rapidement à l'avenir car elles sont à la fois **efficaces (au sens du ratio informations récoltées/coûts)**, déployables en routine et qu'elles ont un grand **potentiel de déploiement en matière d'inventaire pour les groupes peu connus** (ex. **Nématodes et Acariens de la faune des sols**)⁶³ et pour préciser la répartition d'espèces à enjeu difficiles à détecter (ex. Grenouille des champs dans le Grand-Est). Toutefois, cela est possible à condition de disposer des **séquences de référence fiables** pour les espèces concernées, au risque de se retrouver avec de nombreuses **séquences «orphelines»**. Si les bases de référence s'améliorent de jour en jour pour de nombreux groupes taxinomiques, pour les **Hyménoptères** (notamment les abeilles) par exemple il demeure encore de gros problèmes d'identification qui nécessitent de réviser des familles entières, et donc de pouvoir **revenir sur les spécimens** - ce qui est aussi le cas pour de nombreux autres groupes d'insectes.

La pollinisation représentant un enjeu majeur pour la consommation humaine et l'habitabilité de la planète, un projet européen a pour objectif d'établir une **base de séquences de référence pour les abeilles sauvages liées à la pollinisation** qui serait par la suite étendue à tous les groupes taxinomiques qui sont liés à la pollinisation. L'ADNe pourrait être utilisé pour le suivi

des espèces impliquées dans le service de pollinisation ; toutefois une analyse des données d'un point de vue **fonctionnel** ne peut être pertinente qu'avec le **développement d'une base de trait en parallèle**. Il est probable que de telles approches ADNe, au sens strict, relatives aux pollinisateurs ne remplaceront pas des approches ADN par metabarcoding sur tissus/spécimens (ex. issus de tentes Malaise) mais pourraient s'avérer complémentaires.

Concernant les **Mollusques**, le Vertigo de Des Moulins (*Vertigo moulinsiana*) se trouve notamment dans les zones de ressuyage des marais et des cours d'eau. S'il est connu dans certains sites, les experts pensent que sa présence pourrait être plus importante. La Planorbé naine (*Anisus vorticulus*) est une espèce de la Directive «Habitats-Faune-Flore» dont l'écologie et la répartition nationale sont mal connues. La détectabilité de ces deux espèces pourrait être améliorée par l'étude de l'ADNe, ce qui améliorerait en conséquence la connaissance de leurs aires de distribution et de leurs écologies.

Concernant les **Mammifères**, les experts soulignent les enjeux forts concernant :

- la connaissance des limites géographiques d'espèces fousseuses cryptiques difficilement capturables récemment séparées taxinomiquement telles que la Taupe d'Aquitaine (*Talpa aquitania*) et la Taupe d'Europe (*Talpa europaea*), particulièrement dans la partie orientale de la chaîne pyrénéenne (les sols des taupinières pourraient être étudiés via l'ADNe) ;
- la connaissance de la répartition des espèces semi-aquatiques d'une part celles des espèces exotiques comme le Vison d'Amérique (*Mustela vison*) pour une meilleure gestion ou détection précoce, et d'autre part celles d'espèces pour lesquelles il peut y avoir des enjeux forts de conservation tels que le Vison d'Europe (*Mustela lutreola*) la Loutre d'Europe (*Lutra lutra*), le Castor d'Europe (*Castor fiber*) ou les campagnols aquatiques : Campagnol amphibie (*Arvicola sapidus*) et forme aquatique du Campagnol terrestre (*Arvicola amphibius*) (bien qu'actuellement il n'est pas possible de distinguer ces derniers grâce à l'ADNe) ;

63 - Egalement par manque de taxinomistes et spécialistes de ces groupes

- la connaissance de l'évolution de la répartition des musaraignes du genre *Crocidura* ; l'ADNe du sol de terriers pourrait venir compléter les méthodes traditionnelles de détection, assez lourdes (piégeage) ou chronophages (analyse de pelotes de rejection de rapaces), pour vérifier l'hypothèse selon laquelle la Crocidure musette (*Crocidura russula*), plus opportuniste et qui remonte vers le nord, pourrait remplacer la Crocidure des jardins (*Crocidura gueldenstaedtii*) en la faisant changer d'habitats, ou documenter la disparition progressive de la Crocidure leucode (*Crocidura leucodon*), de moins en moins présente dans les pelotes de rejection.

Les experts reconnaissent un fort **potentiel pour de la surveillance à moyen terme** autour de la **surveillance moléculaire de la biodiversité terrestre** (l'approche ADNe pouvant tout à fait compléter l'approche actuelle (BIOSCAN⁶³ -France - vers un FrBOL) qui s'appuie plutôt sur le metabarcoding de l'ADN) et du **projet Barcodrain** (projet de R&D en cours en Guyane, relatif à la surveillance dans les Outre-mer, pour travailler sur l'utilisation de l'ADNe d'eaux de pluies pour le suivi de la biodiversité de la canopée et des sols en milieu tropical).

L'Office National des Forêts (ONF) développe des programmes de **suivi de la biodiversité terrestre dans les forêts** grâce aux animateurs des réseaux naturalistes et aux référents des directions territoriales de l'ONF qui réalisent des relevés sur le terrain. Actuellement, il est mis en place en forêt dans les zones de réserves avec îlots de sénescence et dans les sites en forêts exploitées, à la fois des suivis à long terme dans le cadre de PopAmphibien⁶⁵, des suivis des reptiles avec PopReptile⁶⁶, le programme

annuel de suivis des Mammifères, avec l'étude des micromammifères notamment les suivis musaraignes sur plusieurs réserves grâce à des quadras avec des pièges INRA avec dortoir⁶⁷ (avec relevés des peuplements, information sur la régénération, pose de piège photo pour les Carnivores et évaluation de l'herbivorie sur les jeunes arbres) et sur ces mêmes sites, le programme Vigie Chiro⁶⁸ réalisé en routine.

En complément de ces suivis annuels réalisés par le réseau, l'ONF montre un intérêt à développer un réseau de surveillance de la forêt française (métropole) en mettant en place des suivis standardisés à long terme par ADNe dans les sols et les mares forestières en complément des suivis réalisés annuellement, particulièrement pour les 250 réserves (et les 50 autres en attente de création) et les 100 forêts en réserve intégrale avec îlots de sénescence. Des sites pourraient être identifiés pour réaliser des suivis en routine afin de produire des indicateurs.

La restauration écologique des écosystèmes terrestres relève d'une importance mondiale pour lutter contre la perte de biodiversité. L'ADNe peut aussi être utilisé dans le cadre de la **restauration écologique** comme outil de la surveillance des écosystèmes terrestres restaurés comme le montre une revue de la littérature sur 75 publications scientifiques (van der Heyde *et al.*, 2022). Les auteurs y montrent que les études sont principalement menées en Europe, en Amérique du Nord et en Australie, que près de la moitié ont été publiées en 2021 et 2022 et étudient principalement les communautés microbiennes, les sols et les forêts.

64 - <https://ibol.org/bioscan/>

65 - <http://lashf.org/popamphibien-2/>

66 - <http://lashf.org/popreptile/>

67 - <https://hal.inrae.fr/hal-02665413/document>

68 - <https://www.vigienature.fr/fr/chauves-souris>

4. PERSPECTIVES DE RECHERCHE

L'ADNe offre de telles perspectives de recherche qu'une revue internationale, *Environmental DNA*, y est entièrement consacrée depuis 2019 et que le nombre annuel de publications ne fait qu'augmenter ces dernières années (Figure 5). L'ADNe a été qualifié de « **révolution** » pour la science de la conservation notamment pour la détection des espèces et la quantification de la biodiversité (Lodge *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2023).

L'étude de l'ADNe gagne en maturité mais reste relativement récente et en plein essor (voir 1.4). Plusieurs perspectives de recherche ont déjà été évoquées tout au long du document dont celle de mieux comprendre l'écologie de l'ADNe (Barnes & Turner, 2016) en fonction des contextes et des espèces étudiées, indispensable pour interpréter finement les résultats. D'autres perspectives de recherche sont soulignées dans cette partie.

4.1 Détection de nouveaux taxons et approche « taxonomy free »

La littérature révèle des disparités dans les taxons étudiés par ADNe (voir Figures 7, 8 et 9). Si les poissons et les amphibiens sont bien étudiés, en revanche les coraux, le plancton et les algues restent sous-étudiés (Takahashi *et al.*, 2023). Pour pallier ces manques, l'amélioration des méthodes d'échantillonnage et d'extraction, de la spécificité des amorces et des bases de référence est indispensable. Sans spécimens physiques ni même parfois de noms scientifiques acceptés ou disponibles (voir 2.6), les observations fondées sur l'ADNe ne rentrent pas dans les systèmes taxinomiques formels de dénomination, laissant souvent ces taxons négligés par la science, par les actions de conservation et les politiques publiques. Il est donc important que la recherche porte sur le **développement de nouvelles amorces et de marqueurs plus résolutifs** notamment pour les taxons à enjeux et les espèces ne disposant pas encore de séquences de référence. L'idée est de pouvoir répondre à la question : dispose-t-on des marqueurs et des couples d'amorces associés pour détecter tous les groupes taxinomiques d'intérêt ?

En parallèle, pour contourner certaines limites de l'ADNe concernant les problèmes d'identifications taxinomiques en raison de bases de référence incomplètes ou erronées, les **approches sans taxinomie**, c'est-à-dire en utilisant les MOTUs (ou les ASV) et sans nommer les taxons, se développent et sont considérées comme une option pour la biosurveillance (Carvalho & Leal, 2023). Mächler *et al.* (2021) proposent des bonnes pratiques pour le metabarcoding ADNe sans taxinomie notamment concernant les analyses bioinformatiques et leur conséquence sur les résultats. Une approche pourrait aussi être de s'inspirer de ce qui a été fait en biosurveillance pour les macro-invertébrés, notamment des résultats du groupe DNAQUAnet⁶⁹. Grâce à une comparaison des résultats obtenus par méthodes traditionnelles et ADNe, les chercheurs ont proposé une calibration des indices biotiques en s'affranchissant de l'unité « espèces » pour l'évaluation de l'état écologique (Cordier *et al.*, 2021, 2017). Dans le cas de bioindication comme pour la surveillance de la biodiversité, il demeure néanmoins toujours la question des bases de référence et de la standardisation.

4.2 Etude des aspects fonctionnels

En étudiant la diversité biologique dans les milieux marins et d'eau douce, une méta-analyse a montré que le metabarcoding de l'ADNe fournit des estimations de richesse globalement cohérentes avec celles obtenues à l'aide de méthodes traditionnelles, à la fois à l'échelle locale et régionale et a même conclu que l'ADNe semble à ce jour suffisamment avancé pour étudier la composition des communautés de poissons et remplacer les méthodes traditionnelles plus invasives mais a relevé des différences pour les communauté de plancton, de microphytobentos et de macroinvertébrés (Keck *et al.*, 2022).

Coutant *et al.* (2022) ont étudié grâce à l'ADNe la **diversité taxinomique et fonctionnelle** au niveau de trois bassins versants en Guyane française et l'**influence de différents facteurs** (géographiques, environnementaux et anthropiques) sur l'assemblage des communautés de poissons.

L'ADNe présente donc un grand intérêt dans le cadre de la recherche sur le **fonctionnement des écosystèmes**, les

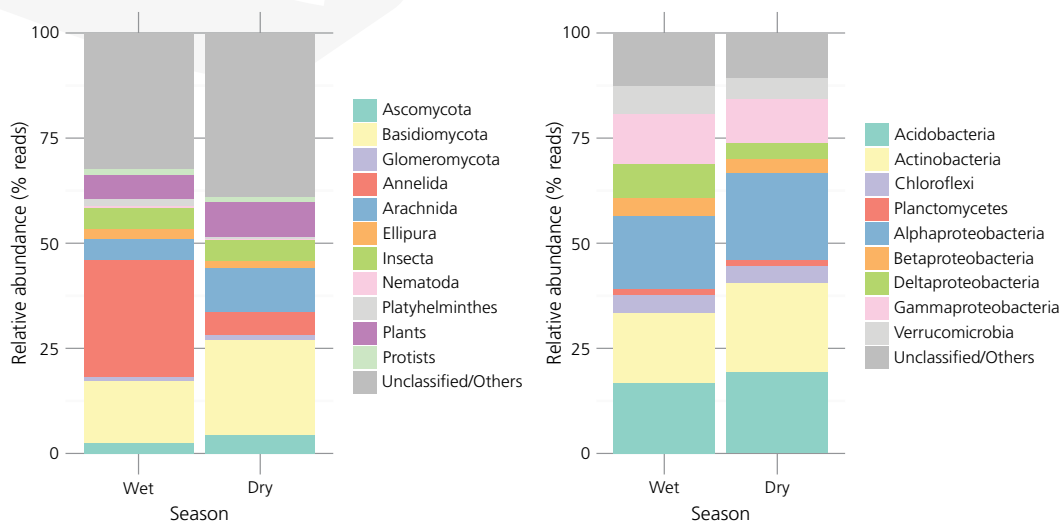
interactions biotiques et le **mutualisme plante-animal** comme par exemple l'interaction oiseaux et plantes (Jønsson *et al.*, 2023). La **variabilité temporelle et spatiale** de la **codistribution d'espèces écologiquement connectées** - comme par exemple des moules d'eau douce et leurs espèces hôtes (ici des poissons) - peut être étudiée en utilisant l'ADNe (Dokai *et al.*, 2023), ce qui peut faciliter les efforts de conservation de certains taxons en danger. En combinant les informations taxinomiques issues de l'ADNe avec des traits fonctionnels et des positions phylogénétiques, il est possible de développer des indices écologiques décrivant le fonctionnement de l'écosystème (Polanco *et al.*, 2022). Une équipe de recherche propose comme indicateur de la pression de pêche : le Demerso-pelagic to Benthic fish eDNA Ratio (DeBRa), c'est-à-dire le rapport entre quantité totale d'ADNe des poissons demerso-pélagiques *versus* benthiques qui peut être calculé quel que soit l'habitat (Sanchez *et al.*, 2022).

Dans les sols, l'ADNe permet de distinguer des **changements de communautés** comme le montre

69 - <https://dnaqua.net/>

la Figure 15. Des chercheurs dont certains membres du Laboratoire d'Écologie Alpine (LECA) et de l'INRAE développent des approches fonctionnelles sur les communautés des sols et les réseaux trophiques (Calderón-Sanou *et al.*, 2023 ; Giachello *et al.*, 2023 ; Guillaume *et al.*, 2021). Les bases de référence étant incomplètes pour beaucoup d'organismes de la faune

des sols, les chercheurs utilisent les MOTU pour étudier les communautés (Guerrieri *et al.*, 2021). L'étude des **réseaux multitrophiques des sols** dans différents habitats forestiers et prairiaux dans les Alpes françaises permet de mieux comprendre le **fonctionnement des écosystèmes** (Calderón-Sanou *et al.*, 2023).



↑ Figure 15: Changements dans les communautés du sol d'Eucaryotes (à gauche) et de bactéries (à droite) dans une parcelle d'un ha dans une forêt tropicale (réserve de Nouragues, Guyane française). La couche arable (0 à 10 cm) a été échantillonnée à l'aide de points d'échantillonnage régulièrement espacés (maillage de 10 m) en avril (saison humide) et en novembre (saison sèche) 2012 (Taberlet *et al.*, 2018)

4.3 Approche quantitative

Pour une espèce de poisson ou d'amphibien donnée, il a été vérifié expérimentalement par des mesures en PCR quantitatives que la concentration d'ADNe libérée dans l'eau est corrélée à la biomasse de l'espèce étudiée dans les aquariums ou les étangs expérimentaux (Evans *et al.*, 2016). Cette corrélation a été montrée dans les lacs (Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016) et dans les fleuves (Pont *et al.*, 2023b). S'il semble que les estimations soient plus complexes lorsque plusieurs espèces sont étudiées par ADNe, plusieurs études montrent que l'ADNe peut fournir des données semi-quantitatives (ex. Taberlet *et al.*, 2018) tandis que d'autres soulignent que l'approche ne fonctionne pas encore bien pour tous les taxons (ex. écrevisses (Johnsen *et al.*, 2020)).

Si pour l'instant l'étude de l'ADNe ne permet ni de caractériser **l'état des populations** ni d'apporter des informations comme le sex-ratio et les traits morphologiques des individus (Deiner *et al.*, 2017 ; Goldberg *et al.*, 2016), cette approche peut en revanche être utilisée pour estimer une **abondance relative**, bien que la variation inhérente aux échantillons environnementaux la rende difficile à quantifier (Hering *et al.* 2018 ; Bohmann *et al.*, 2014). Thomsen *et al.* (2012) ont les premiers à démontrer que l'abondance de l'ADNe via qPCR est corrélée positivement avec l'abondance de la population estimée avec des méthodes traditionnelles.

L'utilisation de la ddPCR (voir 2.3.3.) semble également prometteuse. En effet une étude sur la carpe (*Cyprinus carpio*) en mésocosme a montré que la **ddPCR semble fournir des résultats plus précis sur l'abondance et la biomasse des espèces cibles que la qPCR** et que la relation entre **l'abondance de la carpe et la concentration d'ADNe était plus forte** que celle entre la

biomasse et l'ADNe en utilisant à la fois la ddPCR et la qPCR (Doi *et al.*, 2015).

De nombreuses études soulignent l'importance de développer ces méthodes quantitatives pour le metabarcoding (Shelton *et al.*, 2023) et certaines s'en approchent déjà comme le montre une revue de 63 publications entre 2012 et 2020 qui identifie 90 % de **relations positives entre les concentrations d'ADNe et l'abondance et/ou la biomasse des poissons** en mer, lac, rivière et estuaire (Rourke *et al.*, 2022). Une étude sur le suivi quantitatif de communautés de poissons propose de combiner ADNe et qPCR, pour la biosurveillance ou la bio-évaluation, lorsqu'une estimation approximative de l'abondance absolue des espèces suffit .

Une autre étude montre des corrélations positives entre le nombre total de copies d'ADNe et la **biomasse totale** capturée de trois espèces de poissons tout en soulignant l'importance de poursuivre les études sur l'influence de la qualité de l'eau et les mécanismes de libération et de dégradation de l'ADN en milieu naturel (Hervé *et al.*, 2023 ; Souma *et al.*, 2023) (voir aussi 1.2.).

Une étude récente sur l'anguille d'Europe (*Anguilla anguilla*) vient de montrer qu'il est possible d'aller à **l'échelle individuelle** et d'avoir une quantification du nombre d'haplotypes dans un environnement donné (Halvorsen *et al.*, 2023). Les dernières publications, au regard de leur nombre et l'accélération des connaissances, laissent imaginer que dans le futur, l'ADNe permettra d'obtenir un nombre d'individus et pourquoi pas, à une échelle individuelle, distinguer les juvéniles des adultes et leur sexe et ainsi d'étudier **l'écologie des populations** par ADNe.

4.4 Exploration de nouveaux milieux

Des chercheurs ont étudié l'ADNe dans l'air dans des zoos (Clare *et al.*, 2022 ; Lynggaard *et al.*, 2022) et d'autres chercheurs l'ont fait à partir de poussières en suspension collectées passivement dans une prairie au cours d'une année. Ils sont parvenus à détecter des plantes, une espèce d'amphibien, plusieurs espèces d'oiseaux et des petits et grands mammifères (Johnson *et al.*, 2023b). L'utilisation de l'ADNe pourrait davantage se développer pour l'étude des **communautés végétales avec l'analyse d'échantillons de pollen et de spores en suspension dans l'air**, collectés en routine. L'étude de l'ADNe semble un outil prometteur pour étudier la **complexité de l'aérobiome**. En effet, une étude a montré que sept fois plus de familles de plantes ont été détectées par ADNe que par microscopie optique et le metabarcoding de l'ADNe a facilité l'identification du pollen de 216 genres (Campbell *et al.*, 2023). Si cela ouvre des perspectives de recherche, il reste encore plusieurs points à explorer, notamment sur l'origine, le transport et le devenir de l'ADN dans l'air, avant de pouvoir interpréter les résultats obtenus voire en faire un véritable outil d'inventaire de la biodiversité

L'ADNe peut aussi être collecté dans l'air de façon active, par exemple en utilisant une pompe filtrante. Les protocoles ne sont actuellement pas encore bien établis mais les recherches dans les milieux difficiles d'accès et relativement peu connus, comme les **grottes**, restent à développer par exemple pour étudier les pathogènes des chiroptères ou comparer de l'ADN récent et ancien dans un même lieu.

De nombreux groupes des **milieux souterrains** restent mal connus. L'ADNe peut être un outil puissant d'étude des environnements souterrains (Saccò *et al.*, 2022). Les bases de référence sont de fait incomplètes ou erronées et les marqueurs manquent, ce qui peut limiter leur découverte et accentuer leur mauvaise caractérisation (Malard *et al.*, 2022). Les profondeurs des océans, encore mal connues également, commencent à être explorées grâce à des filtres embarqués sur des robots autonomes sous-marins (en anglais *autonomous underwater vehicle* ou AUV). Pour envisager de la surveillance par la suite dans ces milieux, alors que la biodiversité y est mal connue, il est donc important de **développer des états de référence taxinomique et fonctionnelle**.

4.5 Utilisation de l'ARN environnemental (ARNe)

L'ADNe et l'ARNe sont collectivement appelés acides nucléiques environnementaux ou « ANe ». Dans une **revue systématique de 300 études eNA** portant sur divers systèmes aquatiques, il ressort que **291 examinent l'ADNe, quatre examinent l'ARNe et cinq considèrent à la fois l'ADNe et l'ARNe**. Le fait qu'il y ait pour l'instant assez peu d'études sur l'ARNe montre que le sujet en est à ses débuts (Bunholi *et al.*, 2023). L'ARN se dégrade plus rapidement dans le milieu que l'ADN. Dans les sols, l'ADN peut rester plus longtemps alors que l'ARN reflète davantage une **vision instantanée**, ce qui peut être intéressant pour l'étude des bactéries et des pathogènes dans les sols et en écotoxicologie en milieu aquatique (Miyata *et al.*, 2022) afin d'être **plus réactif** dans les réponses à apporter en termes de gestion par exemple.

Si les travaux sur l'ARNe en sont à leur début, ils semblent déjà prometteurs concernant la distinction des stades de vie (larve/adulte) chez les amphibiens (Parsley & Goldberg, 2024) et d'autres taxons (Stevens & Parsley, 2023).

L'ARN demande d'autres méthodes et processus pour être étudié. Les systèmes de conservation et méthodes d'extraction ne sont pas tout à fait les mêmes (ex. se fait sur bloc de glace, le transport nécessite un respect de la chaîne du froid).

L'ARNe d'un pathogène peut fournir des informations supplémentaires sur la viabilité et l'activité de l'agent pathogène, et peut être utilisé alternativement ou en plus de l'ADNe. Des approches combinant l'utilisation de l'ADNe et ARNe peuvent être développées pour la **modélisation spatio-temporelle prédictive** de la distribution des espèces (Bass *et al.*, 2023).

4.6 ADNe en complément et/ou associés à d'autres technologies

L'utilisation de l'ADNe dans certains milieux terrestres peut parfois constituer un défi en raison de leur accessibilité limitée. Des chercheurs ont mis au point une technique utilisant un **robot aérien pour étudier les espèces des cimes des arbres**, ici des arthropodes et des vertébrés en utilisant des amorces universelles pour les mézozoaies (Aucone *et al.*, 2023). La collecte de l'ADNe s'est faite à l'aide d'une surface adhésive intégrée dans la cage du drone, capable d'être maintenue en contact avec la surface supérieure des branches externes. La combinaison de la robotique avec l'ADNe peut ainsi offrir un **panel de solutions pour la surveillance** de la biodiversité lorsque les **conditions d'accès sont impossibles ou dangereuses pour les humains** (Aucone *et al.*, 2023).

En milieu marin, (et c'est aussi le cas en eaux douces), le couplage de l'utilisation d'un échosondeur et d'une **approche quantitative par ADNe** (grâce à une dPCR ou qPCR puis un séquençage) a montré des corrélations positives entre la concentration d'ADN de poissons et l'intensité de l'écho, ce qui indique un signal hautement localisé d'ADNe à chaque station d'échantillonnage (Sato *et al.*, 2021). Ces résultats semblent prometteurs pour **compléter les méthodes traditionnelles** de surveillance des distributions de plusieurs espèces de poissons (Sato *et al.*, 2021). Si l'ADNe est capable de révéler plus d'espèces de poissons pélagiques, associées aux récifs et crypto-benthiques que les relevés visuels, l'assignation incomplète d'un certains nombres de séquences invite à utiliser les technologies

de manière complémentaire pour obtenir une **image plus complète des communautés** (Rey *et al.*, 2023 ; Mathon *et al.*, 2022).

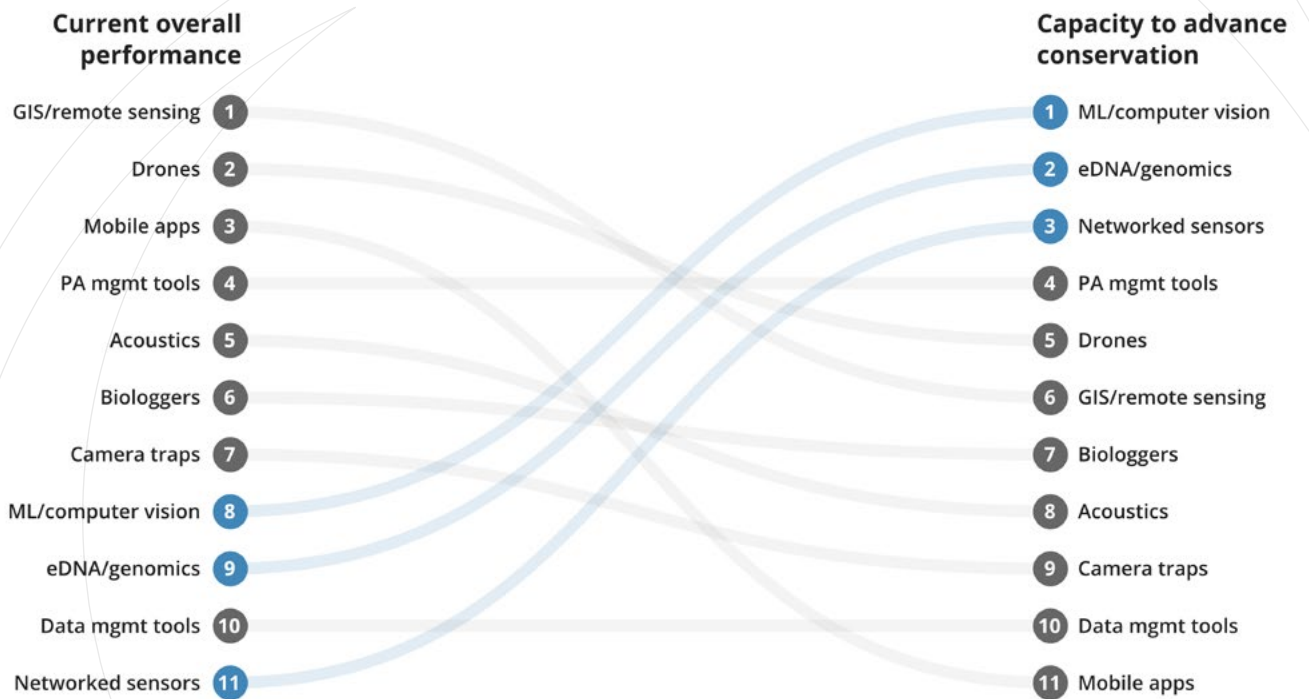
Coupler les **approches non invasives pour la surveillance des milieux aquatiques** (Greenhalgh, 2023) mais aussi marins et terrestres peut s'avérer intéressant. Un projet combinant l'ADNe marin et l'**hydroacoustique** a été développé au cours d'une thèse pour améliorer la précision des relevés de surveillance des poissons pélagiques (Brodie, 2023).

Le développement des innovations récentes dans les dispositifs de **biocapteurs basés sur l'ADNe**, y compris des **systèmes portables, distants et autonomes**, faciliteront la collecte de données en temps réel. En effet, de récents développements comme les échantillonneurs imprimés en 3D (Verdier *et al.*, 2022) (voir 4.7) et l'échantillonnage autonome (Truelove *et al.*, 2022) ouvrent de vastes perspectives de recherche. Une piste à explorer serait par exemple son utilisation dans le cas d'espèces rares comme le Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) par exemple.

Une étude a montré que l'ADNe peut dans certains cas se révéler préférable à la surveillance acoustique pour étudier la date de début des chants des mâles d'amphibiens signalant la période de reproduction.

Bien qu'en **retard de quelques jours** par rapport à l'enregistrement acoustique, les signaux ddPCR d'ADNe offrent un outil de surveillance efficace et non invasif particulièrement pour les amphibiens qui ne chantent pas et peut fournir un **complément utile à l'enregistrement acoustique automatisé** (Chen *et al.*, 2023).

Enfin, si on compare entre elles les technologies pour la connaissance appliquée à la conservation de la biodiversité en termes de performances actuelles et de capacité potentielle à faire progresser la conservation, la technologie « ADNe/génomique » est considérée comme faisant partie de celles ayant le **potentiel le plus inexploité actuellement** alors qu'elles font partie de celles ayant la plus grande capacité potentielle de faire progresser la conservation (Speaker *et al.*, 2022). Pour comprendre comment les outils actuels sont perçus, une enquête a en effet été menée par WILDLABS⁷⁰. Les répondants ont classé comme les plus performantes actuellement les SIG/télétection, les drones et les applications mobiles et les trois technologies évaluées comme ayant la plus grande capacité à faire progresser la conservation sont : l'apprentissage automatique/la vision par ordinateur, l'ADNe/la génomique et les capteurs en réseau (Figure 16).



↑ Figure 16 : Classements des technologies utilisées pour la connaissance appliquée à la conservation, de la performance globale actuelle (à gauche) à la capacité potentielle de faire progresser la conservation (à droite) (en bleu celles perçues comme ayant le potentiel inexploité le plus élevé) © WILDLABS

70 - plateforme anglaise qui porte sur ces technologies et rassemble aujourd'hui plus de 5 500 défenseurs de l'environnement, chercheurs, biologistes de terrain, ingénieurs, développeurs et experts en technologies du monde entier <https://wildlabs.github.io/state-of-conservation-tech-report/>

4.7 Réduction de la consommation des ressources

En plus du stockage des données sur des serveurs et l'analyse bioinformatique consommatrice d'énergie électrique, la partie 2.3.1. sur les procédures de laboratoire souligne l'importance des conditions d'hygiène et de l'utilisation de matériel à usage unique pour ne pas contaminer les échantillons, ce qui implique d'importantes quantités de déchets. Ces procédures sont particulièrement nécessaires lorsque de l'ADN rare est recherché. Le contexte actuel et l'augmentation de l'utilisation des approches sur l'ADNe poussent à développer une réflexion à la fois sur la mise en

place de **filières de recyclage** et sur la réduction de la consommation d'énergie.

Des capteurs passifs à ADNe en hydroxyapatite, produits par imprimante 3D, ont été développés en s'appuyant sur les propriétés d'adsorption de l'ADN par l'Université Claude Bernard de Lyon 1 (Verdier, 2022). Ces recherches ont été menées avec un objectif de bioindication. Des développements sont encore nécessaires pour stabiliser les capteurs notamment pour qu'il soit possible de totalement les stériliser pour pouvoir les réutiliser.

4.8 Approche par les sciences participatives et éducatives

L'ADNe peut aussi être un formidable outil pour les sciences participatives notamment avec les scolaires pour aborder la génétique de façon ludique avec des relevés sur le terrain et avec les gestionnaires pour apporter un nouvel outil complémentaire et déployer des réseaux de surveillance avec une méthode standardisée.

En Californie, une équipe de chercheurs a mis au point CALeDNA⁷¹, un programme de sciences participatives fondé sur l'ADNe pour des scientifiques bénévoles. Des échantillons de sol, de sédiments et d'eau ont déjà été récoltés sur plus de 4 800 sites.

Au Royaume-Uni, SPYGEN a participé à la mise en place d'un **programme national de surveillance** du Triton crêté (*Triturus cristatus*) par ADNe a été mis en place via les **sciences participatives** (Biggs *et al.*, 2015) ; c'est depuis la méthode nationale officielle utilisée pour la surveillance de cette espèce (voir partie 7).

Plusieurs projets de sciences participatives se mettent en place en partenariat avec SPYGEN qui a développé un **kit sciences participatives** pour les prélèvements, par exemple le projet Europe à la rame⁷² qui a étudié les bivalves et les poissons et le projet QUAMPO (QUALité des Milieux marins dans les zones PORTuaires en Méditerranée)⁷³ au cours duquel l'Université de La Rochelle a étudié les milieux côtiers portuaires en

Haute-Corse avec des scolaires.

Une aire éducative est un petit territoire naturel géré de manière participative par les élèves d'une école ou d'un collège. Encadrés par leurs enseignants et une structure de l'éducation à l'environnement, les élèves se réunissent sous la forme d'un « conseil des enfants » et prennent toutes les décisions concernant leur aire éducative. Concept né en 2012 en Polynésie Française, les **Aires Marines Éducatives (AME)** et les **Aires Terrestres Éducatives (ATE)**⁷⁴ sont soutenues par l'OFB⁷⁵. Aujourd'hui plus de 1000 écoles et établissements scolaires sont déjà engagés dans la mise en place d'une aire éducative en métropole et dans les Outre-mer. Ce cadre se prête bien à utiliser l'ADNe, notamment dans les Outre-mer afin de déployer de vastes inventaires et sensibiliser les élèves aux enjeux de biodiversité de leur territoire.

Le programme de sciences participatives **Vigie Nature** pourrait proposer l'ADNe pour certains de ces observatoires, notamment dans le cadre du programme **Vigie Nature Ecole**, spécialement conçu pour sensibiliser les scolaires à la démarche d'observation scientifique. Une étude est lancée pour définir l'intérêt d'utiliser l'ADNe pour l'étude des Odonates dans le cadre du **STELI**⁷⁶.

4.9 Approche par les sciences humaines et sociales

Une approche guidée par la psychologie de l'environnement, voire la philosophie, pourrait nous amener à nous questionner sur les **relations humains-nature lors de la mise en œuvre de relevés d'ADNe**. Ces relations sont-elles différentes lors de la mise en œuvre de relevés d'ADNe par rapport aux méthodes traditionnelles ? Est-ce que le matériel utilisé sur le

terrain, les technologies et les méthodes de laboratoire créent une distance ou au contraire favorisent un plus grand respect en étant moins impactant sur le milieu et les espèces étudiées ? Ces questions méritent d'être soulevées et étudiées dans un contexte où l'utilisation de l'ADNe augmente.

71 - <https://ucedna.com/>

72 - <https://europealarame.com/sciences-et-pedagogie/adn-environnemental/>

73 - <https://quampo.recherche.univ-lr.fr/>

74 - <https://ame.ofb.fr/doku.php>

75 - <https://www.ofb.gouv.fr/aires-educatives>

76 - <https://steli.mnhn.fr/>

5. BIBLIOGRAPHIE

- Agostinetto, G., Brusati, A., Sandionigi, A., Chahed, A., Parladori, E., Balech, B., Bruno, A., Pescini, D. & Casiraghi, M. 2022. eTaxsl: an exploration tool of biodiversity molecular data. *GigaScience*, 11, giab092. <http://doi.org/10.1093/gigascience/giab092>
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M. T. P. & Bohmann, K. 2018. Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(1), 134-147. <http://doi.org/10.1111/2041-210X.12849>
- Alfonsi, E., Méheust, E., Fuchs, S., Carpentier, F.-G., Quillivic, Y., Viricel, A., Hassani, S. & Jung, J.-L. 2013. The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. *ZooKeys*, 365, 5-24. <http://doi.org/10.3897/zookeys.365.5873>
- Arjona, Y., Arribas, P., Salces-Castellano, A., López, H., Emerson, B. C. & Andújar, C. 2022. Metabarcoding for biodiversity inventory blind spots: A test case using the beetle fauna of an insular cloud forest. *Molecular Ecology*, mec.16716. <http://doi.org/10.1111/mec.16716>
- Aucune, E., Kirchgeorg, S., Valentini, A., Pellissier, L., Deiner, K. & Mintchev, S. 2023. Drone-assisted collection of environmental DNA from tree branches for biodiversity monitoring. *Science Robotics*, 8(74), eadd5762. <http://doi.org/10.1126/scirobotics.add5762>
- Aylagas, E., Borja, Á., Irigoien, X. & Rodríguez-Ezpeleta, N. 2016. Benchmarking DNA Metabarcoding for Biodiversity-Based Monitoring and Assessment. *Frontiers in Marine Science*, 3. <http://doi.org/10.3389/fmars.2016.00096>
- Aylagas, E., Borja, Á. & Rodríguez-Ezpeleta, N. 2014. Environmental Status Assessment Using DNA Metabarcoding: Towards a Genetics Based Marine Biotic Index (gAMBI). *PLoS ONE*, 9(3), e90529. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0090529>
- Bakker, J., Wangenstein, O. S., Chapman, D. D., Boussarie, G., Buddo, D., Guttridge, T. L., Hertler, H., Mouillot, D., Vigliola, L. & Mariani, S. 2017. Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact. *Scientific Reports*, 7(1), 16886. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-17150-2>
- Ball, S. L., Hebert, P. D. N., Burian, S. K. & Webb, J. M. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(3), 508-524. <http://doi.org/10.1899/04-142.1>
- Barnes, M. A. & Turner, C. R. 2016a. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1-17. <http://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Barnes, M. A. & Turner, C. R. 2016b. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1-17. <http://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Bass, D., Christison, K. W., Stentiford, G. D., Cook, L. S. J. & Hartikainen, H. 2023. Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ecology. *Trends in Parasitology*. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2022.12.010>
- Baudry, T., Laffitte, M., Noizat, C., Delaunay, C., Ricou, G., Vasselon, V. & Grandjean, F. 2023. Influence of distance from source population and seasonality in eDNA detection of white-clawed crayfish, through qPCR and ddPCR assays. *Environmental DNA*, 5(4), 733-749. <http://doi.org/10.1002/edn3.435>
- Baudry, T., Mauvisseau, Q., Arqué, A., Goût, J.-P., Delaunay, C., de Boer, H. J. & Grandjean, F. 2023. Environmental DNA survey to detect an endemic cryptic fish, *Anablepsoides cryptocallus*, in tropical freshwater streams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, n/a(n/a). <http://doi.org/10.1002/aqc.3916>
- Baudry, T., Mauvisseau, Q., Goût, J.-P., Arqué, A., Delaunay, C., Smith-Ravin, J., Sweet, M. & Grandjean, F. 2021. Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot, an eDNA-based success story. *Ecological Indicators*, 126, 107637. <http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107637>
- Belle, C. C., Stoeckle, B. C. & Geist, J. 2019. Taxonomic and geographical representation of freshwater environmental DNA research in aquatic conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(11), 1996-2009. <http://doi.org/10.1002/aqc.3208>
- 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. <http://doi.org/10.1007/s10531-020-01980-0>
- Berry, O., Jarman, S., Bissett, A., Hope, M., Paepers, C., Bessey, C., Schwartz, M. K., Hale, J. & Bunce, M. 2021. Making environmental DNA (eDNA) biodiversity records globally accessible. *Environmental DNA*, 3(4), 699-705. <http://doi.org/10.1002/edn3.173>
- 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), 1-12. <http://doi.org/10.1038/s42003-021-01760-8>
- Bienert, F., De Danieli, S., Miquel, C., Coissac, E., Poillot, C., Brun, J.-J. & Taberlet, P. 2012. Tracking earthworm communities from soil DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 2017-2030. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05407.x>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029>
- Bik, H. M., Halanich, K. M., Sharma, J. & Thomas, W. K. 2012. Dramatic Shifts in Benthic Microbial Eukaryote Communities following the Deepwater Horizon Oil Spill. *PLoS ONE*, 7(6), e38550. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0038550>
- Binladen, J., Gilbert, M. T. P., Bollback, J. P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R. & Willerslev, E. 2007. The Use of Coded PCR Primers Enables High-Throughput Sequencing of Multiple Homolog Amplification Products by 454 Parallel Sequencing. *PLoS ONE*, 2(2), e197. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000197>
- Blackman, R. C., Brantschen, J., Walser, J.-C., Wüthrich, R. & Altermatt, F. 2022. Monitoring invasive alien macroinvertebrate species with environmental DNA. *River Research and Applications*, 38(8), 1400-1412. <http://doi.org/10.1002/rra.3947>
- Blake, M., McKeown, N. J., Bushell, M. L., & Shaw, P. W. 2016. DNA extraction from spider webs. *Conservation Genetics Resources* 8, 219-221. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0537-8>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>
- Bortolus, A. 2008. Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *Ambio*, 37(2), 114-118. [http://doi.org/10.1579/0044-7447\(2008\)37\[114:ecitbs\]2.0.co;2](http://doi.org/10.1579/0044-7447(2008)37[114:ecitbs]2.0.co;2)
- Bottero, M. T. & Dalmasso, A. 2011. Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 190(1), 34-38. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.024>
- Boulanger, E., Loiseau, N., Valentini, A., Arnal, V., Boissery, P., Dejean, T., Deter, J., Guellati, N., Holon, F., Juhel, J.-B., Lenfant, P., Manel, S. & Mouillot, D. 2021. Environmental DNA metabarcoding reveals and unpacks a biodiversity conservation paradox in Mediterranean marine reserves. *Proceedings. Biological Sciences*, 288(1949), 20210112. <http://doi.org/10.1098/rspb.2021.0112>
- Bourret, A., Nozères, C., Parent, E. & Parent, G. J. 2023. Maximizing the reliability and the number of species assignments in metabarcoding studies using a curated regional library and a public repository. *Metabarcoding and Metagenomics*, 7, e98539. <http://doi.org/10.3897/mbmg.7.98539>
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P. & Coissac, E. 2016. obitoools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 176-182. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12428>
- Brodie, C. 2023, février 1. Project StockDNA; Combining marine eDNA and hydroacoustics to improve the accuracy of pelagic fish monitoring surveys. Liverpool John Moores University. Consulté à l'adresse <https://researchonline.ljmu.ac.uk/id/eprint/18789/>
- Browett, S. S., O'Meara, D. B. & McDevitt, A. D. 2020. Genetic tools in the management of invasive mammals: recent trends and future perspectives. *Mammal Review*, 50(2), 200-210. <http://doi.org/10.1111/mam.12189>
- 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., ... Deiner, K. 2021. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. *Advanced Books*, 1, e68634. <http://doi.org/10.3897/ab.e68634>
- Budd, A. M., Schils, T., Cooper, M. K., Lyons, M. B., Mills, M. S., Deinhart, M. E., Le Port, A., Huerlimann, R. & Strugnell, J. M. 2023. Monitoring threatened species with environmental DNA and open ecological data: Local distribution and habitat preferences of scalloped

- hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*). *Biological Conservation*, 278, 109881. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2022.109881>
- Bunholi, I. V., Foster, N. R. & Casey, J. M. 2023. Environmental DNA and RNA in aquatic community ecology: Toward methodological standardization. *Environmental DNA*, 5(6), 1133-1147. <http://doi.org/10.1002/edn3.476>
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., Zakaria, N. B. & Griffiths, R. A. 2017. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific Reports*, 7(1), 46294. <http://doi.org/10.1038/srep46294>
- Bylemans, J., Furlan, E. M., Gleeson, D. M., Hardy, C. M. & Duncan, R. P. 2018. Does Size Matter? An Experimental Evaluation of the Relative Abundance and Decay Rates of Aquatic Environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6408-6416. <http://doi.org/10.1021/acs.est.8b01071>
- Calderón-Sanou, I., Ohlmann, M., Munkemüller, T., Zinger, L., Hedde, M., Lionnet, C., Martínez-Almoyna, C., Saillard, A., Renaud, J., Guillarme, N. L., Gielly, L. & Thuiller, W. 2023, juillet 10. Mountain soil food webs shaped by the interplay between habitat and pedoclimatic conditions. preprint, *Preprints*. <http://doi.org/10.22541/au.168900135.55709243/v1>
- Campbell, B. C., Van Haeften, S., Massel, K., Milic, A., Al Kouba, J., Addison-Smith, B., Gilding, E. K., Beggs, P. J. & Davies, J. M. 2023. Metabarcoding airborne pollen from subtropical and temperate eastern Australia over multiple years reveals pollen aerobiome diversity and complexity. *Science of The Total Environment*, 862, 160585. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160585>
- Canale-Tabet, K., Labarthe, E., Ollivier, M., Vignal, A. & Pichon, M. 2021. Détection des abeilles sauvages et domestiques par ADN environnemental. Présenté à 3eme Réunion Annuelle du GDR Pollinéco. Consulté à l'adresse <https://hal.inrae.fr/hal-03483381>
- Cantera, I., Cilleros, K., Valentini, A., Cerdan, A., Dejean, T., Iribar, A., Taberlet, P., Vigouroux, R. & Brosse, S. 2019. Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers. *Scientific Reports*, 9(1), 3085. <http://doi.org/10.1038/s41598-019-39399-5>
- Cantera, I., Coutant, O., Jézéquel, C., Decotte, J.-B., Dejean, T., Iribar, A., Vigouroux, R., Valentini, A., Murienne, J. & Brosse, S. 2022. Low level of anthropization linked to harsh vertebrate biodiversity declines in Amazonia. *Nature Communications*, 13(1), 3290. <http://doi.org/10.1038/s41467-022-30842-2>
- Cantera, I., Decotte, J.-B., Dejean, T., Murienne, J., Vigouroux, R., Valentini, A. & Brosse, S. 2021. Characterizing the spatial signal of environmental DNA in river systems using a community ecology approach. *Molecular Ecology Resources*, 22(4), 1274-1283. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.13544>
- Cartier, S., Rey, A., Delesalle, M. & Thiriet, P. 2021. Webinaire ADNe - 25 novembre 2021 - Synthèse de la journée de réflexion sur le potentiel des méthodes basées sur l'ADN environnemental pour la surveillance et l'évaluation de la biodiversité marine dans le cadre des politiques publiques. *PatriNat*, 18 pages et annexes.
- Carvalho, D. C. & Leal, C. G. 2023. Steps forward in biomonitoring 2.0: eDNA Metabarcoding and community-level modelling allow the assessment of complex drivers of Neotropical fish diversity. *Global Change Biology*, n/a(n/a). <http://doi.org/10.1111/gcb.16596>
- Celio, G. J., Padamsee, M., Dentinger, B. T. M., Bauer, R. & McLaughlin, D. J. 2006. Assembling the Fungal Tree of Life: constructing the structural and biochemical database. *Mycologia*, 98(6), 850-859. <http://doi.org/10.3852/mycologia.98.6.850>
- Champlot, S., Berthelot, C., Pruvost, M., Bennett, E. A., Grange, T. & Geigl, E.-M. 2010. An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. *PLOS ONE*, 5(9), e13042. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013042>
- Chen, Y., Tournayre, O., Tian, H. & Loughheed, S. C. 2023. Assessing the breeding phenology of a threatened frog species using eDNA and automatic acoustic monitoring. *PeerJ*, 11, e14679. <http://doi.org/10.7717/peerj.14679>
- Chin, S. C., 2023. American Eel (*Anguilla rostrata*) and Other Fishes as Surveyed by Environmental DNA in the Bronx River and Hudson River Watershed, Doctoral dissertation, City University of New York, 119 pp.
- Christmas, N., Allen, R., Allen, M. J., Bird, K. & Cunliffe, M. 2023. A 17-year time-series of fungal environmental DNA from a coastal marine ecosystem reveals long-term seasonal-scale and inter-annual diversity patterns - PubMed. <http://doi.org/10.1098/rspb.2022.2129>
- Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y.-W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 10), 2259-2261. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.64915-0>
- Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J.-C., Bonin, A., Taberlet, P. & Pont, D. 2016. Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. *PLOS ONE*, 11(6), e0157366. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0157366>
- Clare, E. L., Economou, C. K., Bennett, F. J., Dyer, C. E., Adams, K., McRobie, B., Drinkwater, R. & Littlefair, J. E. 2022. Measuring biodiversity from DNA in the air. *Current Biology*, 32(3), 693-700.e5. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2021.11.064>
- Coissac, E., Riaz, T. & Puillandre, N. 2012. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology*, 21(8), 1834-1847. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05550.x>
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R. & Tiedje, J. M. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D633-642. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- Collins, R. A., Armstrong, K. F., Meier, R., Yi, Y., Brown, S. D. J., Cruickshank, R. H., Keeling, S. & Johnston, C. 2012. Barcoding and Border Biosecurity: Identifying Cyprinid Fishes in the Aquarium Trade. *PLOS ONE*, 7(1), e28381. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028381>
- Cooper, A. & Poinar, H. N. 2000. Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, 289(5482), 1139-1139. <http://doi.org/10.1126/science.289.5482.1139b>
- Cordier, T., Alonso-Sáez, L., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Aylagas, E., Bohan, D. A., Bouchez, A., Chariton, A., Creer, S., Frühe, L., Keck, F., Keeley, N., Laroche, O., Leese, F., Pochon, X., Stoeck, T., Pawlowski, J. & Lanzén, A. 2021. Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: A review of current strategies with an implementation roadmap. *Molecular Ecology*, 30(13), 2937-2958. <http://doi.org/10.1111/mec.15472>
- Cordier, T., Esling, P., Lejzerowicz, F., Visco, J., Ouadahi, A., Martins, C., Cedhagen, T. & Pawlowski, J. 2017. Predicting the Ecological Quality Status of Marine Environments from eDNA Metabarcoding Data Using Supervised Machine Learning. *Environmental Science & Technology*, 51(16), 9118-9126. <http://doi.org/10.1021/acs.est.7b01518>
- Coutant, O., Jézéquel, C., Mokany, K., Cantera, I., Covain, R., Valentini, A., Dejean, T., Brosse, S. & Murienne, J. 2022. Environmental DNA reveals a mismatch between diversity facets of Amazonian fishes in response to contrasting geographical, environmental and anthropogenic effects. *Global Change Biology*, n/a(n/a). <http://doi.org/10.1111/gcb.16533>
- Coutant, O., Richard-Hansen, C., de Thoisy, B., Decotte, J.-B., Valentini, A., Dejean, T., Vigouroux, R., Murienne, J. & Brosse, S. 2021. Amazonian mammal monitoring using aquatic environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 21(6), 1875-1888. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.13393>
- Couton, M., Comtet, T., Le Cam, S., Corre, E. & Viard, F. 2019. Metabarcoding on planktonic larval stages: an efficient approach for detecting and investigating life cycle dynamics of benthic aliens. *Management of Biological Invasions*, 10(4), 657-689. <http://doi.org/10.3391/mbi.2019.10.4.06>
- Couton, M., Lévêque, L., Daguin-Thiébaud, C., Comtet, T. & Viard, F. 2022. Water eDNA metabarcoding is effective in detecting non-native species in marinas, but detection errors still hinder its use for passive monitoring. *Biofouling*, 38(4), 367-383. <http://doi.org/10.1080/08927014.2022.2075739>
- Couton, M., Viard, F. & Altermatt, F. 2023. Opportunities and inherent limits of using environmental DNA for population genetics. *Environmental DNA*, 5(5), 1048-1064. <http://doi.org/10.1002/edn3.448>
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W. K., Potter, C. & Bik, H. M. 2016. The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(9), 1008-1018. <http://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>
- 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(10), 566-571. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>
- Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S. & Bottero, M. T. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 18(2), 81-87. <http://doi.org/10.1016/j.mcp.2003.09.006>
- Dalongeville, A., Boulanger, E., Marques, V., Charbonnel, E., Hartmann, V., Santoni, M. C., Deter, J., Valentini, A., Lenfant, P., Boisery, P., Dejean, T., Velez, L., Pichot, F., Sanchez, L., Arnal, V., Bocquel, T., Delaruelle, G., ... Mouillot, D. 2022. Benchmarking eleven

- biodiversity indicators based on environmental DNA surveys: More diverse functional traits and evolutionary lineages inside marine reserves. *Journal of Applied Ecology*, 59(11), 2803-2813. <http://doi.org/10.1111/1365-2664.14276>
- Decelle, J., Romac, S., Stern, R. F., Bendif, E. M., Zingone, A., Audic, S., Guiry, M. D., Guillou, L., Tessier, D., Le Gall, F., Gourvil, P., Dos Santos, A. L., Probert, I., Vulot, D., de Vargas, C. & Christen, R. 2015. PhytoREF: a reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1435-1445. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12401>
- Deiner, K. & Altermatt, F. 2014. Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE*, 9(2), e88786. <http://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., de 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. <http://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P. & Miaud, C. 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE*, 6(8), e23398. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398>
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49(4), 953-959. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x>
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. & Andersen, G. L. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069-5072. <http://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsuhashi, 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. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122763>
- Dokai, W. K., Barry, P. D., Zanatta, D. T., Gruenthal, K. M., McPhee, M. V., McIntyre, P. B. & Larson, W. A. 2023. Two for the price of one: eDNA metabarcoding reveals temporal and spatial variability of mussel and fish co-distributions in Michigan riverine systems. *Environmental DNA*, n/a(n/a). <http://doi.org/10.1002/edn3.390>
- Dougherty, M. M., Larson, E. R., Renshaw, M. A., Gantz, C. A., Egan, S. P., Erickson, D. M. & Lodge, D. M. 2016. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *Journal of Applied Ecology*, 53(3), 722-732. <http://doi.org/10.1111/1365-2664.12621>
- 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(2), 163-182. <http://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Dufresne, Y., Lejzerowicz, F., Perret-Gentil, L. A., Pawlowski, J. & Cordier, T. 2019. SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 88. <http://doi.org/10.1186/s12859-019-2663-2>
- Dufresnes, C., Golay, J., Schuerch, J., Dejean, T. & Dubey, S. 2020. Monitoring of the last stronghold of native pool frogs (*Pelophylax lessonae*) in Western Europe, with implications for their conservation. *European Journal of Wildlife Research*, 66(3), 45. <http://doi.org/10.1007/s10344-020-01380-3>
- Duhamet, A., Albouy, C., Marques, V., Manel, S. & Mouillot, D. 2023. The global depth range of marine fishes and their genetic coverage for environmental DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution*, 13(1). <http://doi.org/10.1002/ece3.9672>
- Duval, E. 2022. Detection, distribution, and impacts of the emerging parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* on wild populations of the brown trout *Salmo trutta*. Thèse de doctorat. Université Toulouse 3 Paul Sabatier
- Engel, M. S., Ceriaco, L. M. P., Daniel, G. M., Dellapé, P. M., Löbl, I., Marinov, M., Reis, R. E., Young, M. T., Dubois, A., Agarwal, I., Lehmann, P. A., Alvarado, M., Alvarez, N., Andreone, F., Araujo-Vieira, K., Ascher, J. S., Baêta, D., ... Zacharie, C. K. 2021. The taxonomic impediment: A shortage of taxonomists, not the lack of technical approaches. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 193(2), 381-387. <http://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlab072>
- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., Mahon, A. R., Pfrender, M. E., Lamberti, G. A. & Lodge, D. M. 2016. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 29-41. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12433>
- Falentin, H., Auer, L., Mariadassou, M., Pascal, G., Rué, O., Dugat-Bony, E., Delbes, C., Nicolas, A., Rifa, E., Mondy, S., Le Boulch, M., Cauquil, L., Hernandez Raquet, G., Terrat, S. & Abraham, A.-L. 2019. Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s'initier aux analyses metabarcoding. *Cahiers des Techniques de l'INRA*, 2019(97), 1-23.
- Faunce, C. H. 2011. A comparison between industry and observer catch compositions within the Gulf of Alaska rockfish fishery. *ICES Journal of Marine Science*, 68(8), 1769-1777. <http://doi.org/10.1093/icesjms/fsr093>
- Faunce, C. H., Cahalan, J., Bonney, J. & Swanson, R. 2015. Can observer sampling validate industry catch reports from trawl fisheries? *Fisheries Research*, 172, 34-43. <http://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.06.007>
- Faure, N., Manel, S., Macé, B., Arnal, V., Guellati, N., Holon, F., Barroil, A., Pichot, F., Riutort, J.-J., Insacco, G., Zava, B., Mouillot, D. & Deter, J. 2023. An environmental DNA assay for the detection of Critically Endangered angel sharks (*Squatina* spp.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 33(10), 1088-1097. <http://doi.org/10.1002/aqc.3954>
- 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. <http://doi.org/10.1002/ece3.7382>
- Fellgren, A. K. 2022. Utilizing environmental DNA metabarcoding to inventory cetaceans in the gulf of Mexico (p. 42). *University of West Florida*. Consulté à l'adresse https://ircommons.uwf.edu/esploro/outputs/graduate/UTILIZING-ENVIRONMENTAL-DNA-METABARCODING-TO-INVENTORY/99380151596206600?skipUsageReporting=true&recordUsage=false&institution=01FALSC_UWF
- Fernandez Nuñez, N., Maggia, L., Stenger, P.-L., Lelievre, M., Letellier, K., Gigante, S., Manez, A., Mournet, P., Ripoll, J. & Carri-conde, F. 2021. Potential of high-throughput eDNA sequencing of soil fungi and bacteria for monitoring ecological restoration in ultramafic substrates: The case study of the New Caledonian biodiversity hotspot. *Ecological Engineering*, 173, 106416. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2021.106416>
- Fernandez, S., Ardura, A., Georges, O., Martinez, J. L., Suarez-Mendez, M., Planes, S. & Garcia-Vazquez, E. 2022. Non-native species in the north Gulf of Aqaba (Red Sea) revealed from environmental DNA. *Frontiers in Marine Science*, 9. <http://doi.org/10.3389/fmars.2022.940889>
- Ficetola, G. F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguet-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. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12338>
- 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>
- Ficetola, G. F., Taberlet, P. & Coissac, E. 2016. How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Molecular Ecology Resources*, 16(3), 604-607. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12508>
- Fonseca, V. G., Davison, P. I., Creach, V., Stone, D., Bass, D. & Tidbury, H. J. 2023. The Application of eDNA for Monitoring Aquatic Non-Indigenous Species: Practical and Policy Considerations. *Diversity*, 15(5), 631. <http://doi.org/10.3390/d15050631>
- Fuchs, J., Rauber-Lüthy, C., Kupferschmidt, H., Kupper, J., Kulak-Ublick, G.-A. & Ceschi, A. 2011. Acute plant poisoning: analysis of clinical features and circumstances of exposure. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 49(7), 671-680. <http://doi.org/10.3109/15563650.2011.597034>
- Furlan, E. M., Gleeson, D., Hardy, C. M. & Duncan, R. P. 2016. A framework for estimating the sensitivity of eDNA surveys. *Molecular Ecology Resources*, 16(3), 641-654. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12483>
- Giachello, S., Cantera, I., Carteron, A., Marta, S., Cipriano, C., Guerrieri, A., Bonin, A., Thuiller, W. & Ficetola, G. F. 2023. Toward a Common Set of Functional Traits for Soil Protist. <http://doi.org/10.22541/au.168872056.64589857/v1>
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L. & Field, K. G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345(6270), 60-63. <http://doi.org/10.1038/345060a0>
- Giulia, M., Lorenzo, T., Chris, B., Paolo, C., Alice, S., Peter, S., Stefano, M. &

- Tommaso, R. 2023. Net gain: Low-cost, trawl-associated eDNA samplers upscale ecological assessment of marine demersal communities. *Environmental DNA*, 00(1-13). <http://doi.org/10.1002/edn3.389>
- Giusti, A., Ricci, E., Gasperetti, L., Galgani, M., Polidori, L., Verdigi, F., Narducci, R. & Armani, A. 2021. Building of an Internal Transcribed Spacer (ITS) Gene Dataset to Support the Italian Health Service in Mushroom Identification. *Foods*, 10(6), 1193. <http://doi.org/10.3390/foods10061193>
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., Spear, S. F., McKee, A., Oylar-McCance, S. J., Cornman, R. S., Laramie, M. B., Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., ... Taberlet, P. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299-1307. <http://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>
- Greenhalgh, J. A. 2023. Developing Two Non-invasive Survey Methods for Freshwater Ecosystems: Environmental DNA and Ecoacoustics. School of Biological Sciences, Bristol Doctoral College.
- Guenat, J. M., Gander, A., Fumagalli, L. & Lavanchy, G. 2023, février 28. Investigating fine-scale breeding habitat use by amphibians in a continuous wetland using environmental DNA. preprint, *Ecology*. <http://doi.org/10.1101/2023.02.27.530201>
- Guerrieri, A., Bonin, A., Münkemüller, T., Gielly, L., Thuiller, W. & Francesco Ficetola, G. 2021. Effects of soil preservation for biodiversity monitoring using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 30(13), 3313-3325. <http://doi.org/10.1111/mec.15674>
- Guillarme, N. L., Hedde, M. & Thuiller, W. 2021. Building a Trophic Knowledge Graph to Support Soil Food Web Reconstruction.
- Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boutte, C., Burgaud, G., de Vargas, C., Decelle, J., del Campo, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Holzmann, M., Kooistra, W. H. C. F., Lara, E., ... Christen, R. 2013. The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D597-D604. <http://doi.org/10.1093/nar/gks1160>
- Gupta, N., Augustine, S., Narayan, T., O'Riordan, A., Das, A., Kumar, D., Luong, J. H. T. & Malhotra, B. D. 2021. Point-of-Care PCR Assays for COVID-19 Detection. *Biosensors*, 11(5), 141. <http://doi.org/10.3390/bios11050141>
- Haderlé, R., Valentini, A., Ung, V. & Jung, J.-L. 2023. Improving Marine Megafauna Knowledge with eDNA: A French, e111435. <http://doi.org/10.3897/biss.7.111435>
- Hakimzadeh, A., Asbun, A. A., Albanese, D., Bernard, M., Buchner, D., Calhahan, B., Caporaso, G., Curd, E., DJEMIEL, C., Durling, M. B., Elbrecht, V., Gold, Z., Gweon, H., Hajjibabaei, M., Hildebrand, F., Mikryukov, V., Normandeau, E., ... Anslan, S. 2023. A pile of pipelines: an overview of the bioinformatics software for metabarcoding data analyse. <http://doi.org/10.22541/au.167610608.87815963/v1>
- Halvorsen, S., Korslund, L., Mattingsdal, M. & Slettan, A. 2023. Estimating number of European eel (*Anguilla anguilla*) individuals using environmental DNA and haplotype count in small rivers. *Ecology and Evolution*, 13(2), e9785. <http://doi.org/10.1002/ece3.9785>
- Hansen, H., Amundsen, M. M., Mohammad, S. N. & Allan, D. 2022. A surveillance programme to document absence of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and *G. salaris* in the River Drammenselva upstream of Hellefossen. (p. 11).
- Hassan, S., Sabreena, Poczai, P., Ganai, B. A., Almalki, W. H., Gafur, A. & Sayyed, R. Z. 2022. Environmental DNA Metabarcoding: A Novel Contrivance for Documenting Terrestrial Biodiversity. *Biology*, 11(9), 1297. <http://doi.org/10.3390/biology11091297>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings. Biological Sciences*, 270 Suppl 1(Suppl 1), S96-99. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hering, D., Borja, A., Jones, J. I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., Bruce, K., Drakare, S., Hänfling, B., Kahlert, M., Leese, F., Meissner, K., Mergen, P., Reyjol, Y., Segurado, P., Vogler, A. & Kelly, M. 2018. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, 138, 192-205. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.003>
- Hervé, A. 2023, mai 23. Standardisation d'une méthode de suivi de la faune piscicole en écosystèmes lenticques par l'ADN environnemental. Université Savoie Mont Blanc. Consulté à l'adresse <http://www.theses.fr/s223436>
- Hervé, A., Domaizon, I., Baudoin, J.-M., Dejean, T., Gibert, P., Valentini, A. & Logez, M. 2023. Do temperature and population size structure influence the quantity of fish eDNA in water? *Frontiers in Environmental Science*, 11. <http://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1193393>
- Heuertz, M., Carvalho, S. B., Galindo, J., Rinkevich, B., Robakowski, P., Aavik, T., Altinok, I., Barth, J. M. I., Cotrim, H., Goessen, R., González-Martínez, S. C., Grebenc, T., Hoban, J. S., Kopatz, A., McMahon, B. J., Porth, I., Raeymaekers, J. A. M., ... Garnier-Géré, P. 2023. The application gap: Genomics for biodiversity and ecosystem service management. *Biological Conservation*, 278, 109883. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2022.109883>
- Holman, L. E., de Bruyn, M., Creer, S., Carvalho, G., Robidart, J. & Rius, M. 2019. Detection of introduced and resident marine species using environmental DNA metabarcoding of sediment and water. *Scientific Reports*, 9(1), 11559. <http://doi.org/10.1038/s41598-019-47899-7>
- Hongsanan, S., Jeewon, R., Purahong, W., Xie, N., Liu, J.-K., Jayawardena, R. S., Ekanayaka, A. H., Dissanayake, A., Raspé, O., Hyde, K. D., Stadler, M. & Peršoh, D. 2018. Can we use environmental DNA as holotypes? *Fungal Diversity*, 92(1), 1-30. <http://doi.org/10.1007/s13225-018-0404-x>
- Hunter, M., Meigs-Friend, G., Ferrante, J., Takoukam Kamla, A., Dorazio, R., Keith-Diagne, L., Luna, F., Lanyon, J. & Reid, J. 2018. Surveys of environmental DNA (eDNA): a new approach to estimate occurrence in Vulnerable manatee populations. *Endangered Species Research*, 35, 101-111. <http://doi.org/10.3354/esr00880>
- Jean, P., Poulet, N., Valentini, A., Baudoin, J.-M., Roset, N., Prié, V. & Dejean, T. 2018. Bases de références génétiques et études pilotes pour l'inventaire des Téléostéens, Batraciens, Odonates, Écrevisses et Bivalves par l'ADN environnemental. *Spygen; AFB - Agence française pour la biodiversité*. Consulté à l'adresse <https://hal.inrae.fr/hal-04360046>
- Jenrette, J., Jenrette, J., Truelove, K., Moro, S., Dunn, N., Chapple, T., Gallagher, A., Gambardella, C., Schallert, R., Shea, B., Curnick, D., Block, B. & Ferretti, F. 2023. Detecting Mediterranean White Sharks with Environmental DNA. *Oceanography*. <http://doi.org/10.5670/oceanog.2023.s1.28>
- 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. <http://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x>
- Johnsen, S. I., Strand, D. A., Rusch, J. C. & Vrålstad, T. 2020. Environmental DNA (eDNA) Monitoring of Noble Crayfish *Astacus astacus* in Lentic Environments Offers Reliable Presence-Absence Surveillance – But Fails to Predict Population Density. *Frontiers in Environmental Science*, 8. <http://doi.org/10.3389/fenvs.2020.612253>
- Johnson, M. D., Freeland, J. R., Parducci, L., Evans, D. M., Meyer, R. S., Molano-Flores, B. & Davis, M. A. 2023 a. Environmental DNA as an emerging tool in botanical research. *American Journal of Botany*. <http://doi.org/10.1002/ajb2.16120>
- Johnson, M. D., Barnes, M. A., Garrett, N. R. & Clare, E. L. 2023 b. Answers blowing in the wind: Detection of birds, mammals, and amphibians with airborne environmental DNA in a natural environment over a yearlong survey. *Environmental DNA*. <http://doi.org/10.1002/edn3.388>
- Jones, L., Brennan, G. L., Lowe, A., Creer, S., Ford, C. R. & de Vere, N. 2021. Shifts in honeybee foraging reveal historical changes in floral resources. *Communications Biology*, 4(1), 1-10. <http://doi.org/10.1038/s42003-020-01562-4>
- Jønsson, K. A., Thomassen, E. E., Iova, B., Sam, K. & Thomsen, P. F. 2023. Using environmental DNA to investigate avian interactions with flowering plants. *Environmental DNA*, n/a(n/a). <http://doi.org/10.1002/edn3.393>
- Karimi, B., Chemidlin Prévost-Bouré, N., Dequiedt, S., Terrat, S. & Ranjard, L. 2018. Atlas français des bactéries du sol. *Publications scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris; Biotope, Mèze*. Consulté à l'adresse <https://sciencepress.mnhn.fr/fr/collections/hors-collection/atlas-francais-des-bacteries-du-sol>
- Keck, F. & Altermatt, F. 2023. Management of DNA reference libraries for barcoding and metabarcoding studies with the R package redb. *Molecular Ecology Resources*, 23(2), 511-518. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.13723>
- 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. <http://doi.org/10.1111/mec.16364>
- Kelly, R. P., Shelton, A. O. & Gallego, R. 2019. Understanding PCR Processes to Draw Meaningful Conclusions from Environmental DNA Studies. *Scientific Reports*, 9(1), 12133. <http://doi.org/10.1038/s41598-019-48546-x>
- Kirtane, A., Wiecek, D., Noji, T., Baskin, L., Ober, C., Plosica, R., Chenoweth, A., Lynch, K. & Sassoubre, L. 2021. Quantification of Envi-

- ronmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three commercially harvested fish species and comparison between eDNA detection and trawl catches. *Environmental DNA*, 3(6), 1142-1155. <http://doi.org/10.1002/edn3.236>
- Kjær, K. H., Winther Pedersen, M., De Sanctis, B., De Cahsan, B., Korneliusen, T. S., Michelsen, C. S., Sand, K. K., Jelavić, S., Ruter, A. H., Schmidt, A. M. A., Kjeldsen, K. K., Tesakov, A. S., Snowball, I., Gosse, J. C., Alsos, I. G., Wang, Y., Dockter, C., ... Willerslev, E. 2022. A 2-million-year-old ecosystem in Greenland uncovered by environmental DNA. *Nature*, 612(7939), 283-291. <http://doi.org/10.1038/s41586-022-05453-y>
- Köljal, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T. M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., ... Larsson, K.-H. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22(21), 5271-5277. <http://doi.org/10.1111/mec.12481>
- Krehenwinkel, H., Pomerantz, A., Henderson, J. B., Kennedy, S. R., Lim, J. Y., Swamy, V., Shoobridge, J. D., Graham, N., Patel, N. H., Gillespie, R. G. & Prost, S. 2019. Nanopore sequencing of long ribosomal DNA amplicons enables portable and simple biodiversity assessments with high phylogenetic resolution across broad taxonomic scale. *GigaScience*, 8(5), giz006. <http://doi.org/10.1093/gigascience/giz006>
- Lacoeuilhe, A., Denys, G., Dupont, P., Archambeau, A.-S., Bed'Hom, B., Bouix, T., Brisset, J., Cammas, M., Dettai, A., Dusoulier, F., Gachon, C., Gargominy, O., Gaudeul, M., Haÿ, V., Herard, K., Le Bras, Y., Le Gall, L., ... Touroult, J. in prep. Référentiel technique des séquences génétiques pour l'identification des espèces de France : Note analytique pour sa constitution (p. 40).
- 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. <http://doi.org/10.1111/1365-2664.12598>
- Lanzén, A., Dahlgren, T. G., Bagi, A. & Hestetun, J. T. 2021. Benthic eDNA metabarcoding provides accurate assessments of impact from oil extraction, and ecological insights. *Ecological Indicators*, 130, 108064. <http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108064>
- 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. <http://doi.org/10.1002/edn3.88>
- Lejzerowicz, F., Esling, P., Pillet, L., Wilding, T. A., Black, K. D. & Pawlowski, J. 2015. High-throughput sequencing and morphology perform equally well for benthic monitoring of marine ecosystems. *Scientific Reports*, 5(1), 13932. <http://doi.org/10.1038/srep13932>
- Lentendu, G., Bruni, E. P., Ah-Peng, C., Fujinuma, J., Kubota, Y., Lorite, J., Peñas, J., Huang, S., Strasberg, D., Vittoz, P. & Mitchell, E. A. D. 2023. Soil filtration-sedimentation improves shelled protist recovery in eukaryotic eDNA surveys. *Molecular Ecology Resources*, n/a(n/a). <http://doi.org/10.1111/1755-0998.13808>
- Leray, M., Knowlton, N. & Machida, R. J. 2022. MIDORI2: A collection of quality controlled, preformatted, and regularly updated reference databases for taxonomic assignment of eukaryotic mitochondrial sequences. *Environmental DNA*, 4(4), 894-907. <http://doi.org/10.1002/edn3.303>
- 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. <http://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. <http://doi.org/10.1002/edn3.24>
- Lilja, M. A., Buivydytė, Ž., Zervas, A., Krogh, P. H., Hansen, B. W., Winding, A. & Sapkota, R. 2023. Comparing earthworm biodiversity estimated by DNA metabarcoding and morphology-based approaches. *Applied Soil Ecology*, 185, 104798. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104798>
- Lodge, D. M. 2022. Policy action needed to unlock eDNA potential. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 20(8), 448-449. <http://doi.org/10.1002/fee.2563>
- 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. *Molecular Ecology*, 21(11), 2555-2558. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05600.x>
- Lyet, A., Pellissier, L., Valentini, A., Dejean, T., Hehmeyer, A. & Naidoo, R. 2021. eDNA sampled from stream networks correlates with camera trap detection rates of terrestrial mammals. *Scientific Reports*, 11(1), 11362. <http://doi.org/10.1038/s41598-021-90598-5>
- Lynggaard, C., Bertelsen, M. F., Jensen, C. V., Johnson, M. S., Frøslev, T. G., Olsen, M. T. & Bohmann, K. 2022. Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Current Biology*, 32(3), 701-707.e5. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.014>
- Macher, T.-H., Schütz, R., Arle, J., Beermann, A. J., Koschorreck, J. & Leese, F. 2021. Beyond fish eDNA metabarcoding: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species. *Metabarcoding and Metagenomics*, 5, e66557. <http://doi.org/10.3897/mbmg.5.66557>
- Mächler, E., Walsler, J.-C. & Altermatt, F. 2021. Decision-making and best practices for taxonomy-free environmental DNA metabarcoding in biomonitoring using Hill numbers. *Molecular Ecology*, 30(13), 3326-3339. <http://doi.org/10.1111/mec.15725>
- Makiola, A., Compson, Z. G., Baird, D. J., Barnes, M. A., Boerlijst, S. P., Bouchez, A., Brennan, G., Bush, A., Canard, E., Cordier, T., Creer, S., Curry, R. A., David, P., Dumbrell, A. J., Gravel, D., Hajibabaei, M., Hayden, B., ... Bohan, D. A. 2020. Key Questions for Next-Generation Biomonitoring. *Frontiers in Environmental Science*, 7. <http://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00197>
- Malard, F., Verdier, H., Konecny-Dupré, L., Eme, D., Douady, C. J. & Lefébure, T. 2022. Subterranean species inventory in the molecular era.
- Manel, S., Mathon, L., Mouillot, D., Bruno, M., Valentini, A., Lecaillon, G., Gudefin, A., Deter, J., Boissery, P., & Dalongeville, A. 2024. Benchmarking fish biodiversity of seaports with eDNA and nearby marine reserves. *Conservation Letters*, 17, e13001. <https://doi-org.mnhn.idm.oclc.org/10.1111/conl.13001>
- Mariani, S., Fernandez, C., Baillie, C., Magalon, H. & Jaquemet, S. 2021. Shark and ray diversity, abundance and temporal variation around an Indian Ocean Island, inferred by eDNA metabarcoding. *Conservation Science and Practice*, 3(6), e407. <http://doi.org/10.1111/csp2.407>
- Marques, V., Guérin, P.-É., Rocle, M., Valentini, A., Manel, S., Mouillot, D. and Dejean, T. 2020. Blind assessment of vertebrate taxonomic diversity across spatial scales by clustering environmental DNA metabarcoding sequences. *Ecography*, 43: 1779-1790. <https://doi.org/10.1111/ecog.05049>
- Marques, V., Milhau, T., Albouy, C., Dejean, T., Manel, S., Mouillot, D., & Juhel, J. B. 2021. GAPeDNA: Assessing and mapping global species gaps in genetic databases for eDNA metabarcoding. *Diversity and Distributions*, 27(10): 1880-1892. <https://doi-org.mnhn.idm.oclc.org/10.1111/ddi.13142>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.012>
- Mathon, L., Marques, V., Manel, S., Albouy, C., Andrello, M., Boulanger, E., ... & Mouillot, D. 2023. The distribution of coastal fish eDNA sequences in the Anthropocene. *Global Ecology and Biogeography*, 32(8), 1336-1352.
- Mathon, L., Marques, V., Mouillot, D., Albouy, C., Andrello, M., Baletaud, F., Borrero-Pérez, G. H., Dejean, T., Edgar, G. J., Grondin, J., Guerin, P.-E., Hocdé, R., Juhel, J.-B., Kadarusman, null, Maire, E., Mariani, G., McLean, M., ... Manel, S. 2022. Cross-ocean patterns and processes in fish biodiversity on coral reefs through the lens of eDNA metabarcoding. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289(1973), 20220162. <http://doi.org/10.1098/rspb.2022.0162>
- Mathon, L., Valentini, A., Guérin, P.-E., Normandeau, E., Noel, C., Lionnet, C., Boulanger, E., Thuiller, W., Bernatchez, L., Mouillot, D., Dejean, T., & Manel, S. 2021. Benchmarking bioinformatic tools for fast and accurate eDNA metabarcoding species identification. *Mol Ecol Resour*. 21: 2565-2579. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13430>
- McClenaghan, B., Fahner, N., Cote, D., Chawarski, J., McCarthy, A., Rajabi, H., Singer, G. & Hajibabaei, M. 2020. Harnessing the power of eDNA metabarcoding for the detection of deep-sea fishes. *PLOS ONE*, 15(11), e0236540. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0236540>
- Mena, J. L., Yagui, H., Tejada, V., Bonifaz, E., Bellemain, E., Valentini, A., Tobler, M. W., Sánchez-Vendizú, P. & Lyet, A. 2021. Environmental DNA metabarcoding as a useful tool for evaluating terrestrial mammal diversity in tropical forests. *Ecological Applications*, 31(5), e02335. <http://doi.org/10.1002/eap.2335>
- Meng, H., Lin, Y., Zhong, W., Zhao, Z., Shen, L., Ling, Z., Zhao, K. & Xu, S. 2023. Fish Biomonitoring and Ecological Assessment in the Dianchi Lake Basin Based on Environmental DNA. *Water*, 15(3), 399. <http://doi.org/10.3390/w15030399>

- Mezzasalma, V., Ganopoulos, I., Galimberti, A., Cornara, L., Ferri, E. & Labra, M. 2017. Poisonous or non-poisonous plants? DNA-based tools and applications for accurate identification. *International Journal of Legal Medicine*, 131(1), 1-19. <http://doi.org/10.1007/s00414-016-1460-y>
- Miaud, C., Taberlet, P., Dejean, T., Coissac, E., Miquel, C., Pompanon, F. & Valentini, A. 2012. ADN environnemental : un saut méthodologique pour les inventaires de la biodiversité. *Sciences Eaux & Territoires*, (6), 92-95. <http://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2012.6.16>
- Miaud, Claude, Arnal, V., Poulain, M., Valentini, A. & Dejean, T. 2019. eDNA Increases the Detectability of Ranavirus Infection in an Alpine Amphibian Population. *Viruses*, 11(6), 526. <http://doi.org/10.3390/v11060526>
- Mikaeilyan, A., Köhler, T., Lampert, N., Rohland, J., Boga, H., Meuser, K. & Brune, A. 2015. Classifying the bacterial gut microbiota of termites and cockroaches: A curated phylogenetic reference database (DictDb). *Systematic and Applied Microbiology*, 38(7), 472-482. <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.07.004>
- Miller, K. B., Alarie, Y., Wolfe, G. W. & Whiting, M. F. 2005. Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodrytes umbrius* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae). *Systematic Entomology*, 30(4), 499-509. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.00320.x>
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. & Iwasaki, W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088. <http://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- Miyata, K., Inoue, Y., Amano, Y., Nishioka, T., Nagaike, T., Kawaguchi, T., Morita, O., Yamane, M. & Honda, H. 2022. Comparative environmental RNA and DNA metabarcoding analysis of river algae and arthropods for ecological surveys and water quality assessment. *Scientific Reports*, 12(1), 19828. <http://doi.org/10.1038/s41598-022-23888-1>
- Newton, J. P., Nevill, P., Bateman, P. W., Campbell, M. A., & Allentoft, M. E. 2024. Spider webs capture environmental DNA from terrestrial vertebrates. *iScience*, 27(2). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108904>
- Nithaniyal, S., Majumder, S., Umapathy, S. & Parani, M. 2021. Forensic application of DNA barcoding in the identification of commonly occurring poisonous plants. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 78, 102126. <http://doi.org/10.1016/j.jflm.2021.102126>
- 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. [http://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](http://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X)
- Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J. M., Reier, Ü. & Zobel, M. 2010. The online database MaarJAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 188(1), 223-241. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x>
- Parsley, M. B., & Goldberg, C. S. 2024. Environmental RNA can distinguish life stages in amphibian populations. *Molecular Ecology Resources*, 00, 1-9. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13857>
- Osman, O. A., Andersson, J., Martin-Sanchez, P. M. & Eiler, A. 2022. National eDNA-based monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian species in Norway. *Metabarcoding and Metagenomics*, 6, e85199. <http://doi.org/10.3897/mbmg.6.85199>
- Pathiraja, D., Cho, J., Kim, J. & Choi, I.-G. 2023. Metabarcoding of eDNA for tracking the floral and geographical origins of bee honey. *Food Research International*, 164, 112413. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112413>
- Patin, N. V. & Goodwin, K. D. 2023. Capturing marine microbiomes and environmental DNA: A field sampling guide. *Frontiers in Microbiology*, 13. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1026596>
- 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. <http://doi.org/10.1111/mec.15643>
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Mächler, E. & Altermatt, F. 2020. Utilisations de l'ADN environnemental pour la surveillance et l'évaluation biologiques des écosystèmes aquatiques (Office fédéral de l'environnement (OFEV)). Consulté à l'adresse <https://doi.org/10.5167/uzh-187800>
- Pentinsaari, M., Ratnasingham, S., Miller, S. E. & Hebert, P. D. N. 2020. BOLD and GenBank revisited – Do identification errors arise in the lab or in the sequence libraries? *PLOS ONE*, 15(4), e0231814. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0231814>
- Perrin, W. F., Rosel, P. E. & Cipriano, F. 2013. How to contend with paraphyly in the taxonomy of the delphinine cetaceans? *Marine Mammal Science*, 29(4), 567-588. <http://doi.org/10.1111/mms.12051>
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S. & Waits, L. P. 2013. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(8), 1123-1130. <http://doi.org/10.1139/cjfas-2013-0047>
- Polanco F., A., Richards, E., Flück, B., Valentini, A., Altermatt, F., Brosse, S., Walsler, J.-C., Eme, D., Marques, V., Manel, S., Albouy, C., Dejean, T. & Pellissier, L. 2021. Comparing the performance of 12S mitochondrial primers for fish environmental DNA across ecosystems. *Environmental DNA*, 3(6), 1113-1127. <http://doi.org/10.1002/edn3.232>
- Polanco F., A., Waldock, C., Keggin, T., Marques, V., Rozanski, R., Valentini, A., Dejean, T., Manel, S., Vermeij, M., Albouy, C. & Pellissier, L. 2022. Ecological indices from environmental DNA to contrast coastal reefs under different anthropogenic pressures. *Ecology and Evolution*, 12(8), e9212. <http://doi.org/10.1002/ece3.9212>
- Pont, D., Meulenbroek, P., Bammer, V., Dejean, T., Erős, T., Jean, P., Lenhardt, M., Nagel, C., Pekarik, L., Schabuss, M., Stoeckle, B. C., Stolica, E., Zornig, H., Weigand, A. & Valentini, A. 2023a. Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, 23(2), 396-409. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.13715>
- Pont, D., Meulenbroek, P., Bammer, V., Dejean, T., Erős, T., Jean, P., Lenhardt, M., Nagel, C., Pekarik, L., Schabuss, M., Stoeckle, B. C., Stolica, E., Zornig, H., Weigand, A. & Valentini, A. 2023b. Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, 23(2), 396-409. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.13715>
- Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civate, 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. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>
- Poulet, N. & Basílico, L. 2019. L'ADN environnemental pour l'étude de la biodiversité. État de l'art et perspectives pour la gestion | Le portail technique de l'OFB (p. 72). *Agence française pour la biodiversité - AFB*. Consulté à l'adresse <https://professionnels.ofb.fr/fr/doc-rencontres-synthese/ladn-environnemental-letude-biodiversite-etat-lart-perspectives-gestion>
- Prié, V., C. Alonso, C. Bou, D.M.P. Galassi, P. Marmonier & M.-J. Dole-Olivier 2024. The Cent Fonts Aquifer: An Overlooked Subterranean Biodiversity Hotspot in a Stygobiont-Rich Region. *Diversity* 16, 50. DOI: 10.3390/d16010050
- Prié, V., A. Danet, A. Valentini, M. Lopes-Lima, P. Taberlet, A. Besnard, N. Roset, O. Gargominy & T. Dejean. 2023. Conservation assessment based on large-scale monitoring of eDNA: application to freshwater mussels. *Biological Conservation* 283, 110089. DOI: 10.1016/j.biocon.2023.110089
- Prié, V., Valentini, A., Jean, P., Dejean, T., Breugnot, É., Brejoux, E., Couprie, S., Irz, P., Jardin, G., Nowak, C., Roset, N., Thierry, E., Vigneron, T. & Poulet, N. 2021a. Etude exploratoire pour définir une stratégie d'échantillonnage d'ADN environnemental optimisée pour les milieux aquatiques complexes - Application aux poissons et aux bivalves (p. 55). *OFB - SPYGEN*. Consulté à l'adresse https://oai-gem.ofb.fr/exp-php/document-affiche/ofb_recherche_oai/OUVRE_DOC/60982?fic=doc00084410.pdf
- Prié, V., Valentini, A., Lopes-Lima, M., Froufe, E., Rocle, M., Poulet, N., Taberlet, P. & Dejean, T. 2021b. Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalve biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia*, 848(12-13), 2931-2950. <http://doi.org/10.1007/s10750-020-04260-8>
- Prié, V., Valentini, A., Jean, P., Decotte, J.-B., Breugnot, É., Couprie, S., Jardin, G., Lamand, F., Roset, N., Vigneron, T., Rocle, M., Cucherat, X., Dejean, T. & Taberlet, P. 2021c. Cinq ans d'inventaires des Bivalves de France par analyse de l'ADN environnemental : quelles conclusions, quelles perspectives ? *Naturae*, (8). <http://doi.org/10.5852/naturae2021a8>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F. O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D590-596. <http://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quebedeaux, K. B., Taylor, C. A., Curtis, A. N. & Larson, E. R. 2023. A multi-method approach for assessing the distribution of a rare, burrowing North American crayfish species. *PeerJ*, 11, e14748. <http://doi.org/10.7717/peerj.14748>
- Ramírez-Amaro, S., Bassitta, M., Picornell, A., Ramon, C. & Terrasa, B. 2022. Environmental DNA: State-of-the-art of its application for fisheries assessment in marine environments. *Frontiers in Marine Science*, 9. <http://doi.org/10.3389/fmars.2022.1004674>

- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. 2007. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Rey, A., Viard, F., Corre, E., Lize, A., Leveque, L., Joncour, L., Delesalle, M., Robert, A., Su, C., Su, C. & de Dinard, M.-S. M. 2021. La surveillance de la biodiversité ichtyologique côtière par l'ADN environnemental. Evaluation de l'outil et de sa complémentarité aux comptages visuels en plongée. *UMS PatriNat*, 96p. <https://hal-lara.archives-ouvertes.fr/mnhn-04168495/>
- Rey, A., Viard, F., Lizé, A., Corre, E., Valentini, A. & Thiriet, P. 2023. Coastal rocky reef fish monitoring in the context of the Marine Strategy Framework Directive: Environmental DNA metabarcoding complements underwater visual census. *Ocean & Coastal Management*, 241, 106625. <http://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2023.106625>
- Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P. & Coissac, E. 2011. EcoPrimers: Inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 39(21), undefined-undefined. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr732>
- Rourke, M. 2018. Access and benefit-sharing in practice: non-commercial research scientists face legal obstacles to accessing genetic resources. *Journal of Science Policy and Governance*, 13(1), 1-20.
- Rourke, M. L., Broadhurst, M. K., Fowler, A. M., Wilkes Walburn, J., Hughes, J. M., Fielder, D. S., DiBattista, J. D. & Furlan, E. M. 2023. Investigating the Potential Utility of Environmental DNA to Provide a Relative Abundance Index for the Depleted Teleost, Mulloway, *Argyrosomus japonicus*. *Diversity*, 15(3), 322. <http://doi.org/10.3390/d15030322>
- 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. <http://doi.org/10.1002/edn3.185>
- Ruppert, K. M., Kline, R. J. & Rahman, M. S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547. <http://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Rusch, J. C., Mojžišová, M., Strand, D. A., Svobodová, J., Vrålstad, T. & Petrušek, A. 2020. Simultaneous detection of native and invasive crayfish and Aphanomyces astaci from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota*, 58, 1-32. <http://doi.org/10.3897/neobiota.58.49358>
- Saccò, M., Guzik, M. T., van der Heyde, M., Nevill, P., Cooper, S. J. B., Austin, A. D., Coates, P. J., Allentoft, M. E. & White, N. E. 2022. eDNA in subterranean ecosystems: Applications, technical aspects, and future prospects. *Science of The Total Environment*, 820, 153223. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153223>
- Sahu, A., Kumar, N., Pal Singh, C. & Singh, M. 2023. Environmental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. *Journal for Nature Conservation*, 71, 126325. <http://doi.org/10.1016/j.jnc.2022.126325>
- Sakata, M. K., Takeshita, D., Nishizawa, R., Sato, T. & Minamoto, T. 2023. An efficient environmental DNA detection method for rare species: a case study of a small salamander (*Hynobius boulengeri*). *Analytical Sciences*. <http://doi.org/10.1007/s44211-023-00289-6>
- Salcedo, C. & David, O. 2022. Community changes in vertebrate composition in the Gulf of Tribugá, Colombia, based on eDNA analysis. Consulté à l'adresse <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/63644>
- Sanchez, L., Boulanger, E., Arnal, V., Boissery, P., Dalongeville, A., Dejean, T., Deter, J., Guellati, N., Holon, F., Juhel, J.-B., Lenfant, P., Leprieur, F., Valentini, A., Manel, S. & Mouillot, D. 2022. Ecological indicators based on quantitative eDNA metabarcoding: the case of marine reserves. *Ecological Indicators*, 140, 108966. <http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108966>
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467. <http://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sanz, N., Franch, N., Araguas, R.-M., Viñas, J. & Vidal, O. 2023. Environmental DNA Assay for the Detection of the American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in the Early Stages of the Invasion in the Ebre Delta. *Animals*, 13(4), 683. <http://doi.org/10.3390/ani13040683>
- Sato, M., Inoue, N., Nambu, R., Furuichi, N., Imaizumi, T. & Ushio, M. 2021. Quantitative assessment of multiple fish species around artificial reefs combining environmental DNA metabarcoding and acoustic survey. *Scientific Reports*, 11(1), 19477. <http://doi.org/10.1038/s41598-021-98926-5>
- Satterthwaite, E., Allen, A., Lampe, R., Gold, Z., Thompson, A., Bowlin, N., Swalethorp, R., Goodwin, K., Hazen, E., Bograd, S., Matthews, S. & Semmens, B. 2023. Toward identifying the critical ecological habitat of larval fishes: An environmental DNA window into fisheries management. *Oceanography*. <http://doi.org/10.5670/oceanog.2023.s1.29>
- Schiøtt, S., Jensen, M., Sigsgaard, E., Møller, P., Avila, M., Thomsen, P. & Rysgaard, S. 2023. Environmental DNA metabarcoding reveals seasonal and spatial variation in the vertebrate fauna of Ilulissat Icefjord, Greenland. *Marine Ecology Progress Series*, 706, 91-108. <http://doi.org/10.3354/meps14250>
- Schmelzle, M. C. & Kinziger, A. P. 2016. Using occupancy modeling to compare environmental DNA to traditional field methods for regional-scale monitoring of an endangered aquatic species. *Molecular Ecology Resources*, 16(4), 895-908. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12501>
- Sepulveda, A. J., Nelson, N. M., Jerde, C. L. & Luikart, G. 2020. Are Environmental DNA Methods Ready for Aquatic Invasive Species Management? *Trends in Ecology & Evolution*, 35(8), 668-678. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2020.03.011>
- Shelton, A. O., Gold, Z. J., Jensen, A. J., D'Agness, E., Andruszkiewicz Allan, E., Van Cise, A., Gallego, R., Ramón-Laca, A., Garber-Yonts, M., Parsons, K. & Kelly, R. P. 2023. Toward quantitative metabarcoding. *Ecology*, 104(2), e3906. <http://doi.org/10.1002/ecy.3906>
- 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), 257. <http://doi.org/10.3390/fishes7050257>
- Souma, R., Katano, I., Doi, H., Takahara, T. & Minamoto, T. 2023. Comparing environmental DNA with whole pond survey to estimate the total biomass of fish species in ponds. *Freshwater Biology*, 68(5), 727-736. <http://doi.org/10.1111/fwb.14059>
- Speaker, T., O'Donnell, S., Wittermyer, G., Bruyere, B., Loucks, C., Dancer, A., Carter, M., Fegraus, E., Palmer, J., Warren, E. & Solomon, J. 2022. A global community-sourced assessment of the state of conservation technology. *Conservation Biology*, 36(3), e13871. <http://doi.org/10.1111/cobi.13871>
- Stauffer, S., Jucker, M., Keggins, T., Marques, V., Andreello, M., Bessudo, S., Cheutin, M., Borrero-Pérez, G. H., Richards, E., Dejean, T., Hocdé, R., Juhel, J., Ladino, F., Letessier, T. B., Loiseau, N., Maire, E., Mouillot, D., ... Waldock, C. 2021. How many replicates to accurately estimate fish biodiversity using environmental DNA on coral reefs? *Ecology and Evolution*, 11(21), 14630-14643. <http://doi.org/10.1002/ece3.8150>
- Stevens, J. D., & Parsley, M. B. 2023. Environmental RNA applications and their associated gene targets for management and conservation. *Environmental DNA*, 5(2), 227-239. <https://doi.org/10.1002/edn3.386>
- 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. <http://doi.org/10.1007/s10531-019-01709-8>
- Strickler, K. M., Fremier, A. K. & Goldberg, C. S. 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85-92. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>
- Stroud, S., Fennell, M., Mitchell, J., Lydon, S., Peacock, J. & Bacon, K. L. 2022. The botanical education extinction and the fall of plant awareness. *Ecology and Evolution*, 12(7), e9019. <http://doi.org/10.1002/ece3.9019>
- Suarez-Bregua, P., Álvarez-González, M., Parsons, K. M., Rotllant, J., Pierce, G. J. & Saavedra, C. 2022. Environmental DNA (eDNA) for monitoring marine mammals: Challenges and opportunities. *Frontiers in Marine Science*, 9. Consulté à l'adresse <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2022.987774>
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L. & Coissac, É. 2018. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring* (Oxford University Press). <http://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001>
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L. H. 2012 a. Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789-1793. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C. & Willerslev, E. 2012 b. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045-2050. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Taberlet, P., Prud'homme, S. M., Campione, E., Roy, J., Miquel, C., Shehzad, W., Gielly, L., Rioux, D., Choler, P., Clément, J.-C., Melodelima, C., Pompanon, F. & Coissac, E. 2012 c. Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, 21(8), 1816-1820. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05317.x>

- Takahashi, M., Saccò, M., Kestel, J. H., Nester, G., Campbell, M. A., Van Der Heyde, M., Heydenrych, M. J., Juszkiewicz, D. J., Nevill, P., Dawkins, K. L., Bessey, C., Fernandes, K., Miller, H., Power, M., Mousavi-Derazmahalleh, M., Newton, J. P., White, N. E., ... Allentoft, M. E. 2023. Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Science of The Total Environment*, 873, 162322. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322>
- Tedersoo, L., Tooming-Klunderud, A. & Anslan, S. 2018. PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytologist*, 217(3), 1370-1385. <http://doi.org/10.1111/nph.14776>
- 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. <http://doi.org/10.1002/edn3.171>
- 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. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>
- 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. *Molecular Ecology*, 21(11), 2565-2573. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>
- Thomsen, P. F. & Willerslev, E. 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Tillett, B. J., Field, I. C., Bradshaw, C. J. A., Johnson, G., Buckworth, R. C., Meekan, M. G. & Ovenden, J. R. 2012. Accuracy of species identification by fisheries observers in a north Australian shark fishery. *Fisheries Research*, 127-128, 109-115. <http://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.04.007>
- Trebitz, A. S., Hoffman, J. C., Darling, J. A., Pilgrim, E. M., Kelly, J. R., Brown, E. A., Chadderton, W. L., Egan, S. P., Grey, E. K., Hashsham, S. A., Klymus, K. E., Mahon, A. R., Ram, J. L., Schultz, M. T., Stepien, C. A. & Schardt, J. C. 2017. Early detection monitoring for aquatic non-indigenous species: Optimizing surveillance, incorporating advanced technologies, and identifying research needs. *Journal of Environmental Management*, 202, 299-310. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.07.045>
- Tréguier, A., Paillisson, J., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M. A. & Roussel, J. 2014. Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology*, 51(4), 871-879. <http://doi.org/10.1111/1365-2664.12262>
- Truelove, N. K., Patin, N. V., Min, M., Pitz, K. J., Preston, C. M., Yamahara, K. M., Zhang, Y., Raanan, B. Y., Kieft, B., Hobson, B., Thompson, L. R., Goodwin, K. D. & Chavez, F. P. 2022. Expanding the temporal and spatial scales of environmental DNA research with autonomous sampling. *Environmental DNA*, 4(4), 972-984. <http://doi.org/10.1002/edn3.299>
- UNITE Community & Abarenkov, K. 2023. UNITE - Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification. *Checklist Dataset* <https://doi.org/10.15468/Mkpcy3> Accessed via GBIF.Org on 2023-01-26. <http://doi.org/10.15468/mkpcy3>
- Vacher, J.-P. 2019. Recherche et inventaire de la Grenouille des champs *Rana arvalis* (Amphibia: Ranidae) à l'aide de l'ADN environnemental en France. (BUFO) (p. 26). Consulté à l'adresse http://www.bufo-alsace.org/wp-content/uploads/2023/11/Rapport_Rana_arvalis_2019.pdf
- Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110-117. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011>
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., ... Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929-942. <http://doi.org/10.1111/mec.13428>
- Valsecchi, E., Tavecchia, G., Boldrocchi, G., Coppola, E., Ramella, D., Conte, L., Blasi, M., Bruno, A. & Galli, P. 2023. Playing "hide and seek" with the Mediterranean monk seal: a citizen science dataset reveals its distribution from molecular traces (eDNA). *Scientific Reports*, 13(1), 2610. <http://doi.org/10.1038/s41598-023-27835-6>
- van der Heyde, M., Bunce, M. & Nevill, P. 2022. Key factors to consider in the use of environmental DNA metabarcoding to monitor terrestrial ecological restoration. *Science of The Total Environment*, 848, 157617. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157617>
- Vautier, M., Chardon, C., Goulon, C., Guillard, J. & Domaizon, I. 2023. A quantitative eDNA-based approach to monitor fish spawning in lakes: Application to European perch and whitefish. *Fisheries Research*, 264, 106708. <http://doi.org/10.1016/j.fishres.2023.106708>
- Verdier, H. 2022. L'ADN environnemental pour la bioindication du futur : Aspects fondamentaux, méthodologiques et applicabilité en rivière intermittente.
- 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. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.13604>
- Vigilife. 2021. Vigilife, l'innovation au service du vivant (p. 92). Consulté à l'adresse <https://www.vigilife.org/wp-content/uploads/maquettevigilifemag-page-bd.pdf>
- Wang, S., Yan, Z., Hänfling, B., Zheng, X., Wang, P., Fan, J. & Li, J. 2021. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of The Total Environment*, 755, 142622. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142622>
- Waterhouse, R. M., Adam-Blondon, A.-F., Agosti, D., Baldrian, P., Balech, B., Corre, E., Davey, R. P., Lantz, H., Pesole, G., Quast, C., Glöckner, F. O., Raes, N., Sandionigi, A., Santamaria, M., Addink, W., Vohradsky, J., Nunes-Jorge, A., ... Lanfear, J. 2022. Recommendations for connecting molecular sequence and biodiversity research infrastructures through ELIXIR. *F1000Research*, 10, ELIXIR-1238. <http://doi.org/10.12688/f1000research.73825.2>
- Wei, N., Nakajima, F. & Tobino, T. 2018. A Microcosm Study of Surface Sediment Environmental DNA: Decay Observation, Abundance Estimation, and Fragment Length Comparison. *Environmental Science & Technology*, 52(21), 12428-12435. <http://doi.org/10.1021/acs.est.8b04956>
- Willerslev, E., Hansen, A. J., Binladen, J., Brand, T. B., Gilbert, M. T. P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D. A. & Cooper, A. 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5620), 791-795. <http://doi.org/10.1126/science.1084114>
- Xu, J. 2017. Fungal DNA barcoding. *The 6th International Barcode of Life Conference*, 01(01), 913-932. <http://doi.org/10.1139/gen-2016-0046@gen-iblf.issue01>
- Yang, J., Zhang, L., Mu, Y. & Zhang, X. 2023. Small changes make big progress: A more efficient eDNA monitoring method for freshwater fish. *Environmental DNA*, n/a(n/a). <http://doi.org/10.1002/edn3.387>
- Zhang, S., Bi, Y., Zhao, J. & Yao, M. 2023. To the north: eDNA tracing of the seasonal and spatial dynamics of fish assemblages along the world's largest water diversion project. *Journal of Environmental Management*, 331, 117217. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117217>
- Zinger, L., Taberlet, P., Schimann, H., Bonin, A., Boyer, F., De Barba, M., Gaucher, P., Gielly, L., Giguët-Covex, C., Iribar, A., Réjou-Méchain, M., Rayé, G., Rioux, D., Schilling, V., Tymen, B., Viers, J., Zouiten, C., ... Chave, J. 2019. Body size determines soil community assembly in a tropical forest. *Molecular Ecology*, 28(3), 528-543. <http://doi.org/10.1111/mec.14919>



Ce document présente une synthèse de la littérature et des échanges à la fois avec des experts de l'ADN environnemental (ADNe) et avec des experts de différents groupes taxinomiques.

Il a été réalisé dans le cadre d'une étude prospective sur les nouvelles méthodes pour l'inventaire du patrimoine naturel en France et pour la mise en place d'une surveillance de la biodiversité.

Une première partie s'attache à définir ce qu'est l'ADNe puis présente des éléments techniques depuis les prélèvements sur le terrain jusqu'à l'interprétation des résultats, en passant par les différentes étapes de laboratoire.

Une seconde partie propose une synthèse relative aux enjeux d'utiliser l'ADNe dans le cadre de l'inventaire, du suivi et de la surveillance de la biodiversité dans les milieux dulcicoles, marins et terrestres. Elle souligne les attentes des experts, les avantages et les points de vigilance de son utilisation puis identifie quelques perspectives de recherche en écologie et en sciences de la conservation.

PatriNat

**Centre d'expertise et de données
sur le patrimoine naturel**

CP41, 36, rue Geoffroy Saint-Hilaire
75005 Paris
patrinat.fr

