



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY 4.0). La citation comme l'utilisation de tout ou partie du contenu de cet article doit obligatoirement mentionner les auteurs, l'année de publication, le titre, le nom de la revue, le volume, le numéro de l'article et le DOI.

L'ADN environnemental, un outil pour la biosurveillance des lacs : applications pour les populations piscicoles

Isabelle DOMAIZON^{1,4}, Marine VAUTIER^{1,4}, Maxime LOGEZ^{2,4}, Jonas BYLEMANS^{1,4}, Cécile CHARDON^{1,4}, Alix HERVE^{1,4}, Cyrielle GALLIEGUE^{1,4}, Laury BOUVET^{1,4}, Jean-Marc BAUDOIN^{3,4,5}

¹ Université Savoie Mont Blanc, INRAE, CARRTEL, 75 bis avenue de Corzent, 74203 Thonon-les-Bains, France.

² INRAE, RIVERLY, 5 rue de la Doua, 69625 Villeurbanne Cedex, France.

³ OFB, DRAS, Service EcoAqua, Aix-en-Provence, France.

⁴ Pôle R&D ECLA, France.

⁵ Aix Marseille Univ., INRAE, RECOVER, 13182 Aix-en-Provence, France.

Correspondance : Isabelle DOMAIZON, isabelle.domaizon@inrae.fr

Après avoir posé les enjeux et limites des approches basées sur l'ADN environnemental (ADNe) pour la surveillance de la biodiversité aquatique, cet article présente des développements récents et leurs applications. Il s'agit notamment du suivi des dynamiques de reproduction des poissons grâce à une méthode quantitative ciblée (la PCR digitale) et de la réalisation d'inventaires du peuplement piscicole, par métabarcoding. Ces résultats illustrent le bon niveau d'opérationnalité de l'ADNe pour renforcer les outils de biosurveillance en lacs.

L'essor de l'ADN environnemental dans le biomonitoring : contexte et enjeu

Alors qu'elles abritent près de 30 % des espèces de vertébrés (WWF, 2020), les eaux douces subissent une perte de biodiversité deux à trois fois supérieure à celle des habitats terrestres et marins (Albert *et al.*, 2021), avec environ un quart des espèces (connues) d'eau douce aujourd'hui menacées d'extinction (Sayer *et al.*, 2025). Les pressions subies par ces écosystèmes sont multifformes, cumulatives et spatialement hétérogènes (Dudgeon, 2019), ce qui représente un défi majeur pour les méthodes de biosurveillance traditionnelles. Ces méthodes impliquent souvent un échantillonnage invasif (induisant la mortalité des organismes échantillonnés dans certains cas), elles sont chronophages et présentent donc des limites pour les études à grande échelle. Aussi, dans ce contexte, les besoins d'évolution des surveillances écologiques sont forts. Il s'agit notamment d'intégrer des approches à haut débit et non invasives telles que les méthodes basées sur l'analyse de l'ADN environnemental (ADNe). Même si des challenges existent encore (i.e., standardisation des méthodes, normes de

qualité communes, enrichissement des bases de référence...) pour aboutir à une intégration de ces méthodes dans les cadres réglementaires de surveillance (Altermatt *et al.*, 2025), l'utilisation de l'ADNe révolutionne déjà nos capacités de caractérisation et de surveillance de la biodiversité aquatique.

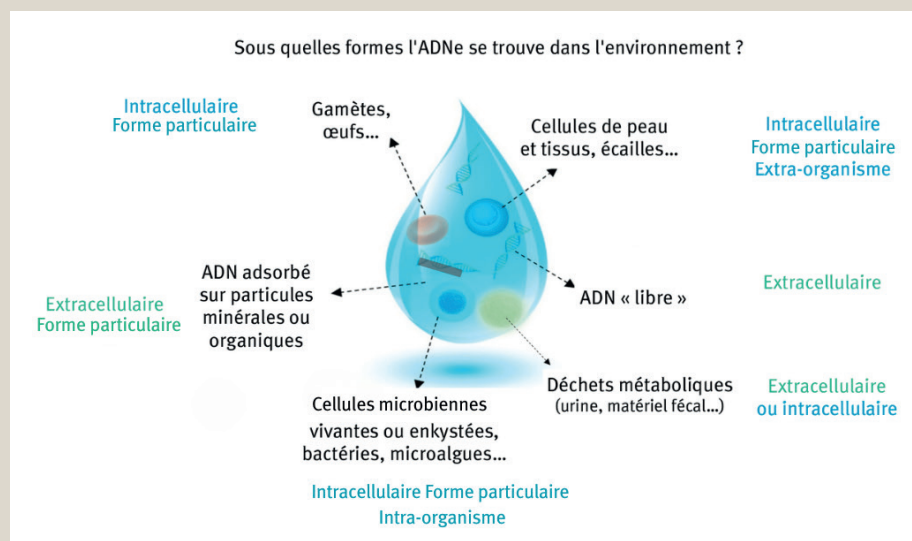
Depuis les premières applications pour la détection d'amphibiens (Ficetola *et al.*, 2008), l'utilisation de l'ADNe a été exponentielle, et le groupe des poissons est celui qui a le plus fréquemment été étudié dans le cadre de ces développements (~ 50 % des études), surtout en milieu d'eau douce (Takahashi *et al.*, 2023).

Une part significative de l'effort global de recherche sur l'ADNe a donc été appliquée aux problématiques piscicoles en lacs, avec des travaux posant les bases des comparaisons entre relevés traditionnels et ADNe à l'échelle des communautés piscicoles (e.g. Hänfling *et al.*, 2016b). Par ailleurs, différentes matrices environnementales ont été explorées, comme les sédiments pour reconstituer la dynamique long-terme des poissons *via* les archives sédimentaires lacustres (Lopez *et al.*, 2024), mais aussi les biofilms retrouvés en zone littorale des lacs (Gauvin

Encadré 1 – L'ADNe, quelle définition ?

L'ADNe est défini comme l'ADN extrait à partir d'un échantillon environnemental sans isoler au préalable aucun organisme cible (Taberlet *et al.*, 2012). L'échantillon peut être de l'eau, du sol, des sédiments, de l'air, des fèces ou contenus intestinaux ou même des sources anciennes comme des carottes de glace, sédiments ou pergélisol (Thomsen et Willerslev, 2015). En ce qui concerne les macroorganismes, cet ADN retrouvé provient de la libération de matériel génétique dans l'environnement, par exemple par la desquamation des cellules de la peau ou d'écailles, l'excrétion de fluides corporels, la défécation ou encore la libération de gamètes (Pawlowski *et al.*, 2020); alors que pour les microorganismes, la cellule elle-même (donc l'organisme cible) et l'ensemble de son génome est prélevé. L'ADNe désigne donc l'ensemble de l'ADN isolé à partir d'échantillons environnementaux incluant l'ADN extra-organismes et l'ADN intra-organismes pour les microbes (Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2021) (figure 1).

Figure 1 – Illustration des différentes formes d'ADN environnemental retrouvées dans l'eau.
Illustration de Closek *et al.* (2019) modifiée et complétée.



et al., 2025) permettant de détecter des signaux ADN des macro-organismes aquatiques. Néanmoins, l'eau est la matrice pour laquelle les études sont le plus étayées à ce jour en ce qui concerne la production d'inventaire piscicole (e.g. Rourke *et al.*, 2022).

Le fort accroissement des applications ADNe sur la matrice « eau » s'accompagne aujourd'hui d'une diversification considérable des protocoles utilisés, ceci alors même que les méthodologies standardisées constituent un pré-requis pour le transfert opérationnel et la mise en oeuvre effective par les futurs opérateurs de terrain et les décideurs.

Outre les besoins d'homogénéiser et standardiser les différentes étapes des procédures ADNe, des optimisations et démonstrations sont encore attendues sur le volet quantitatif des détectations et inventaires produits. En effet, à ce jour, l'ADNe est encore souvent considéré comme ne pouvant pas remplacer totalement les méthodes traditionnelles lorsqu'il s'agit d'estimer les abondances des espèces, ceci en raison notamment des facteurs impliqués dans le devenir de l'ADNe relargué dans l'eau qui complexifient l'interprétation quantitative.

La dynamique de la production, distribution spatio-temporelle, persistance et dégradation de l'ADNe dans le milieu est un sujet sur lequel les recherches se sont concentrées ces dernières années (e.g. Harrison *et al.*, 2019; Jo *et al.*, 2020). Divers facteurs environnementaux, tels que la température, le pH, le rayonnement ultraviolet ou l'oxygénation de l'eau peuvent affecter l'état de l'ADNe relargué dans l'environnement, avec

Encadré 2 – Avantages et limites des approches ADNe.

Les principaux avantages des méthodes basées sur l'ADNe pour le biomonitoring sont (i) leur caractère non intrusif, qui n'entraîne que peu ou pas de perturbations pour les espèces et les systèmes et notamment si l'on cible les macroorganismes, (ii) l'efficacité en termes de temps et de coûts, qui permet de surveiller la biodiversité sur des échelles spatiales et avec des résolutions temporelles accrues, (iii) la grande sensibilité de détection, qui permet de détecter de manière généralement fiable les espèces (dès lors que les marqueurs génétiques utilisés sont choisis de manière appropriée), y compris la détection des espèces rares ou furtives, dont les espèces invasives et (iv) l'universalité de l'échantillonnage, qui permet d'évaluer la biodiversité d'une large gamme taxonomique à l'aide du même échantillon d'ADNe (e.g. Pawlowski *et al.*, 2018). À cela s'ajoute généralement, une facilité de mise en oeuvre sur le terrain et une réduction du personnel mobilisé (par ex. pour les campagnes de suivi ichthyologique) ainsi qu'une possibilité de gain de temps lors des échantillonnages.

Les principales limites des méthodes ADNe sont elles liées (i) aux risques de faux-positifs et de faux-négatifs (réduits dans des conditions de réalisations soignées), (ii) aux problématiques de représentativité et de valeur quantitative du signal ADNe dont le devenir dans l'environnement est soumis à divers facteurs biotiques et abiotiques, (iii) à la difficulté d'identifier des espèces hybrides ou des introgressions génétiques, (iv) à l'incomplétude des bases de références génétiques qui limitent nos capacités à définir des barcodes et à assigner taxonomiquement certaines séquences environnementales par métabarcoding (v), à la production de déchets (utilisation de matériel à usage unique, et réactifs de biologie moléculaire).

des risques de dégradation en quelques jours rendant le signal indétectable (Barnes *et al.*, 2014; Seymour *et al.*, 2018) ou au contraire la capacité de persister jusqu'à des centaines voire des milliers d'années dans un état analysable dans les sédiments lacustres (Domaizon *et al.*, 2017).

De même, des questions de représentativité spatiale du signal ADNe peuvent se poser, plus particulièrement dans les systèmes lotiques où l'ADNe peut être transporté en aval jusqu'à des dizaines de kilomètres (Deiner et Altermatt, 2014). En lac, le signal est en général moins soumis à cette problématique même si elle est aussi prise en considération (Harper *et al.*, 2019).

Des facteurs biotiques sont également en jeu pour expliquer notamment le taux d'émission de l'ADNe dans l'environnement; l'émission peut par exemple être influencée par l'âge et les stades de vie des organismes chez les poissons (Takeuchi *et al.*, 2019), ou leur activité et métabolisme (Stewart, 2019). La phénologie, les déplacements pour l'utilisation des habitats varient au cours de l'année (zone refuge pour les juvéniles de poissons, lieux de nutrition...) et ainsi induisent une répartition spatiale variable de l'ADNe dans le milieu d'étude (Ghosal *et al.*, 2018). Les périodes de reproduction en particulier sont *a priori* des périodes de fort relargage d'ADNe (Di Muri *et al.*, 2023).

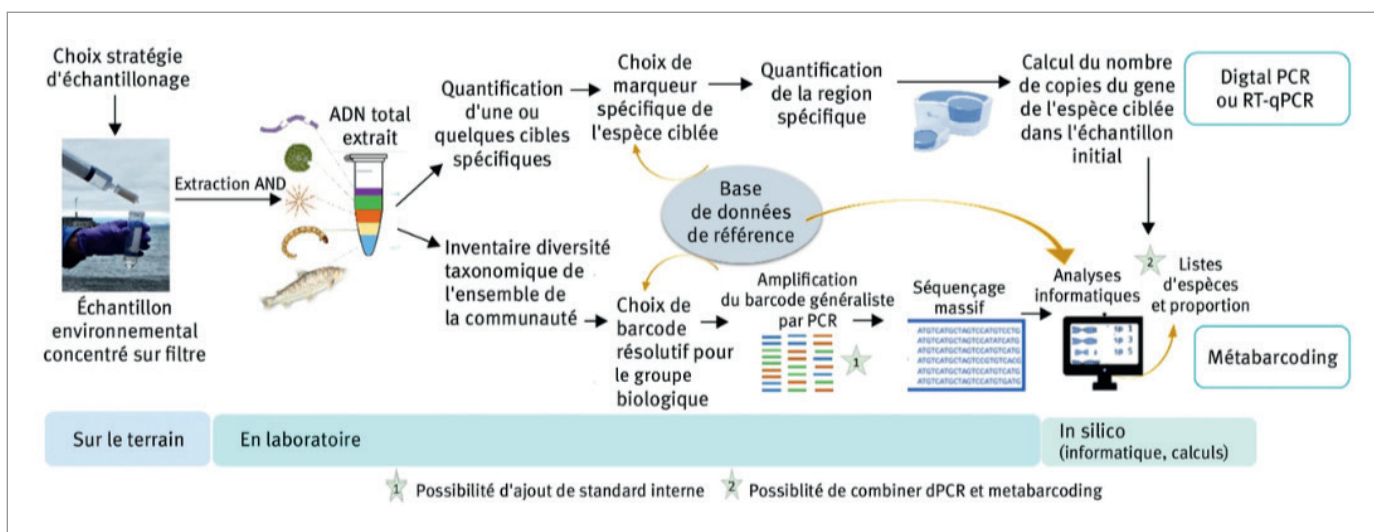
Diverses études ont posé des bases pour aller vers des données plus quantitatives reflétant les abondances et biomasses des espèces présentes au sein d'assemblages biologiques naturels. À ce jour, il est largement admis que la quantification de l'ADNe dans une masse d'eau peut fournir des indications sur l'abondance des espèces (Rourke *et al.*, 2022) et même sur leur phénologie (Bylemans *et al.*, 2018).

Les corrélations entre concentration en ADNe et abondancebiomasse des espèces sont en effet avérées, au moins sur des échelles spatio-temporelles définies, comme le rapporte la synthèse de Rourke *et al.* (2022) basée sur soixante-trois études publiées. Si le nombre de copies d'ADN (par litre d'eau) pour une espèce est un

indice suffisamment pertinent pour refléter l'abondance et/ou biomasse de cette espèce, les outils de quantification n'étaient jusqu'à récemment pas toujours suffisamment sensibles (ex. : PCR quantitative). La possibilité aujourd'hui de mobiliser des outils tels que la PCR digitale qui permet des quantifications absolues, très sensibles et robustes pour des estimations quantitatives consolide les possibilités d'applications (Capo *et al.*, 2021). Toutefois ces méthodes ciblées se limitent encore à la quantification au mieux de quelques espèces simultanément (par multiplexage). En parallèle, des tentatives ont été faites pour obtenir des données à valeurs quantitatives pour des communautés piscicoles entières (Pont *et al.*, 2023; Ushio *et al.*, 2018); ces approches permettent de transformer les nombres de « reads » ADN (issus du métabarcoding) en nombre de copies ADN de chaque espèce inventoriée (avec une meilleure approximation de l'abondance-biomasse de l'espèce dans l'échantillon initial) (figure 2). Toutefois des comparaisons et validations formelles de ces approches font encore défaut, et en l'absence de relation universelle entre concentration d'ADNe et biomasse/densité de l'espèce, la consolidation de la valeur quantitative des données ADNe doit être poursuivie.

Les pistes pour améliorer la quantification s'appuient sur des méthodes telles que la dPCR (PCR digitale), qui peuvent être utilisées seules ou combinées avec le métabarcoding, mais aussi sur l'utilisation de standards internes et contrôles quantitatifs qui peuvent être ajoutés à différentes étapes du processus de métabarcoding, ainsi que la combinaison de méthodes de suivi (ex. : ADNe et méthodes d'observation par ROV (véhicule sub-aquatique téléopéré, en anglais : *remotely operated underwater vehicle*), caméras et autres méthodes acoustiques). Les travaux présentés ici s'inscrivent dans ce contexte et visent non seulement à standardiser et démontrer l'opérationnalité des protocoles pour les inventaires de communautés piscicoles ou la détection d'espèces ciblées, mais aussi à optimiser les informations quantitatives pour ces méthodes ADNe.

Figure 2 – Illustration des deux principales méthodes d'ADN environnemental utilisées notamment pour la détection des poissons. L'approche ciblée quantitative par Digital PCR ou PCR Quantitative permettant de quantifier une ou quelques espèces simultanément, et le métabarcoding permettant l'obtention d'une liste faunistique pour le groupe biologique ciblé.



Des approches ciblées et quantitatives pour l'étude de la phénologie de reproduction des poissons

Comprendre les variations phénologiques des processus démographiques est essentiel à la gestion des populations de poissons. Il s'agit notamment de connaître l'utilisation saisonnière de l'habitat, la localisation des frayères et la période précise de la reproduction afin d'adapter la gestion et la préservation des habitats indispensables au maintien de la dynamique des populations piscicoles.

Pour suivre l'activité de frai des poissons, les méthodes sont généralement invasives (ex. : pêche au filet maillant, collecte d'œufs fécondés) ou traumatisantes (ex. : pêche électrique ou télémétrie acoustique), et les méthodes non invasives telles que les inventaires visuels ou acoustiques sont souvent sensibles aux biais des observateurs ou erreurs d'identification taxonomique. Des applications récentes ont démontré le potentiel de l'ADNe pour suivre les périodes de frai des poissons (Bylemans *et al.*, 2017), offrant ainsi une approche alternative si les protocoles appliqués fournissent une information quantitative suffisamment robuste pour détecter les début, fin et pics d'activité de reproduction. Une corrélation entre la concentration d'ADNe de poisson dans l'eau et son activité de frai a été démontrée dans les rivières pour les espèces de poissons diadromes et potamodromes¹ (e.g. Bracken *et al.*, 2019 ; Thalinger *et al.*, 2021). Pour les espèces de poissons non migrateurs, des approches basées sur l'ADNe ont été initialement utilisées dans les rivières, par exemple pour l'étude de l'activité de frai de la perche australienne Macquarie (*Macquaria australasica*) (Bylemans *et al.*, 2017). Bien que certaines corrélations aient été établies entre le signal de l'ADNe dans l'eau et l'abondance des poissons dans les lacs (e.g. Nevers *et al.*, 2018), une seule approche de « metabarcoding » de l'ADNe a été réalisée pour surveiller les périodes de frai de l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus* L.) dans les lacs (Di Muri *et al.*, 2023). À ce stade, les mises en application des méthodes ADNe pour la surveillance des phénologies sont encore très rares et des démonstrations sont encore nécessaires. Dans le cadre du projet Quanti-Fish, des protocoles ont été consolidés et des déploiements *in situ* ont été réalisés sur le Léman (lac franco-suisse).

Démonstration de l'opérationnalité de nouveaux protocoles quantitatifs (dPCR) ciblés pour quelques espèces clés

En s'appuyant sur les résultats d'études démontrant une augmentation des concentrations d'ADN pendant la saison du frai (Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016), nous avons, à l'aide d'une méthode ADNe quantitative (utilisant la digital PCR), et en proposant de nouvelles amorces moléculaires quand nécessaire, testé la robustesse de ces méthodes non invasives pour suivre le déroulement des périodes de reproduction de plusieurs espèces de poissons en lacs. Les espèces illustrées ici sont la perche, le corégone et le brochet. Ces trois espèces ont toutes un intérêt économique et écologique, mais elles possèdent également des caractéristiques de reproduction différentes (ex. : période de reproduction hivernale ou printanière, migration ou pas des adultes dans le lac au

cours de l'activité de frai). Les données obtenues par l'ADNe ont été confrontées à celles issues de méthodes traditionnelles (pêche au filet, collecte d'œufs fécondés ou comptages visuels).

Les protocoles détaillés utilisés pour ces démonstrations sont publiés (Vautier *et al.*, 2023, Vautier *et al.*, 2026), seuls les résultats principaux sont présentés ici.

D'une part, les travaux ont permis la validation des protocoles ADNe, incluant tests de spécificité, et tests de sensibilité pour les nouveaux marqueurs proposés.

Pour s'assurer que les fluctuations du signal ADNe observées lors des suivis de la phénologie de la reproduction ne sont pas le reflet de changements affectant l'ensemble du signal ADNe poisson (par exemple, effet de phénomènes hydrodynamiques induisant le déplacement de tous les signaux ADNe) mais sont bien spécifiques à la reproduction, nous avons choisis, et recommandons, de quantifier simultanément (dans le même extrait d'ADNe) le signal ADNe d'une espèce en cours de reproduction et celui d'une espèce qui ne se reproduit pas à la même période (appelée ci-après « espèce contrôle »). Pour les suivis réalisés sur les trois espèces, on observe que le signal ADNe de l'espèce contrôle reste systématiquement à un niveau faible, basal, avec peu ou pas de fluctuations dans le temps, tandis que pour les espèces se reproduisant une dynamique marquée, avec un pic unique s'étalant sur les semaines de reproduction, est bien visible (figure 3).

Par ailleurs, ces travaux ont permis de réaliser une mise en application *in situ* pour le suivi des espèces sélectionnées afin de démontrer l'applicabilité et la robustesse des protocoles.

Application pour une espèce à reproduction hivernale : le Corégone

Le corégone, poisson emblématique du Léman, se reproduit en hiver en zone littorale. Sa reproduction a été suivie entre 2018 et 2021 à la fois par utilisation de filets maillants, de comptages visuels et par l'analyse de l'ADNe (échantillonnage fait en amont de la pêche). Pour les trois hivers étudiés, l'ADNe du corégone a été détecté à chaque date d'échantillonnage. Les deux méthodes ont permis d'identifier une période de reproduction débutant début décembre et se terminant mi/fin janvier (durée six à huit semaines), avec un pic majeur unique situé entre mi-décembre et début janvier selon les années. Une bonne concordance est observée entre l'ADNe et les méthodes traditionnelles avec des pics concomitants (figure 3 illustration pour les hivers 2020 et 2021 ; Vautier *et al.*, 2023). Cette méthode ADNe est aujourd'hui intégrée dans la surveillance de routine de la phénologie de la reproduction du corégone sur le Léman (rapport de suivi CIPEL²).

Application pour deux espèces à reproduction printanière : Perche et Brochet

L'ADNe permet de détecter la perche à toutes les dates d'échantillonnage, sur les deux années de suivi (2019 et 2021). La dynamique temporelle du signal ADNe est similaire à celle obtenue par la collecte de rubans d'œufs (méthode traditionnellement utilisée pour suivre la phénologie, en utilisant des frayères artificielles). Les deux méthodes indiquent une période de frai d'environ huit

1. Les espèces diadromes sont des poissons qui effectuent des migrations entre les milieux marin et d'eau douce au cours de leur cycle de vie. Les espèces potamodromes sont des poissons qui effectuent des migrations exclusivement en eau douce, sans jamais quitter ce milieu.

2. Commission internationale pour la protection des eaux du Léman.

semaines, avec un pic entre début et mi-mai, montrant que l'ADNe reflète bien l'activité de reproduction et pas seulement la présence des individus.

De même pour le brochet, les suivis ADNe et les comptages visuels montrent des dynamiques concordantes sur les deux années étudiées (2021-2022). Le signal augmente dès fin mars, atteint un pic mi-fin avril, puis décroît début mai. Les résultats ont confirmé que l'ADNe est pertinent pour estimer les dates clés de reproduction du brochet.

Réinterroger le choix des gènes marqueurs pour optimiser la détection des signaux de reproduction

Le génome mitochondrial (sous unité ribosomique 12 s) est généralement ciblé lors des études ADNe concernant les poissons (Miya *et al.*, 2015; Valentini *et al.*, 2016),

car il y a de nombreux génomes mitochondriaux par cellule, et par conséquent potentiellement un signal plus important dans l'environnement. Cibler le génome mitochondrial a cependant un inconvénient majeur lors des suivis de la reproduction puisqu'il est quasiment absent des spermatozoïdes. En effet, les spermatozoïdes sont très différents des cellules somatiques car ils contiennent un ADN nucléaire (ADNnu) hautement condensé et protégé, alors que le nombre de génomes mitochondriaux est relativement faible. Il a été montré que pendant la période de reproduction, le signal provenant de l'ADNnu augmentait de façon plus importante que celui ciblant l'ADN mitochondrial en rivières (Bylemans *et al.*, 2017) tandis qu'en dehors de la période de reproduction les signaux sont similaires.

Les spermatozoïdes (mobiles, abondants) étant une source majeure d'ADNe pendant le frai, nous avons donc ici comparé les signaux ADNe mitochondriaux

Figure 3 – Comparaison entre méthodes traditionnelles et ADNe (ADN environnemental) pour le suivi de la phénologie de la reproduction du corégone, de la perche et du brochet dans le Léman : suivi hebdomadaire effectué par ADNe sur l'espèce en cours de reproduction et sur une espèce contrôle, en parallèle d'une méthode traditionnelle (pêche au filet ou observations visuelles pour le corégone, collecte des rubans d'œufs sur supports artificiels pour la perche, et observations visuelles pour le brochet). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes mobiles sur trois dates consécutives.

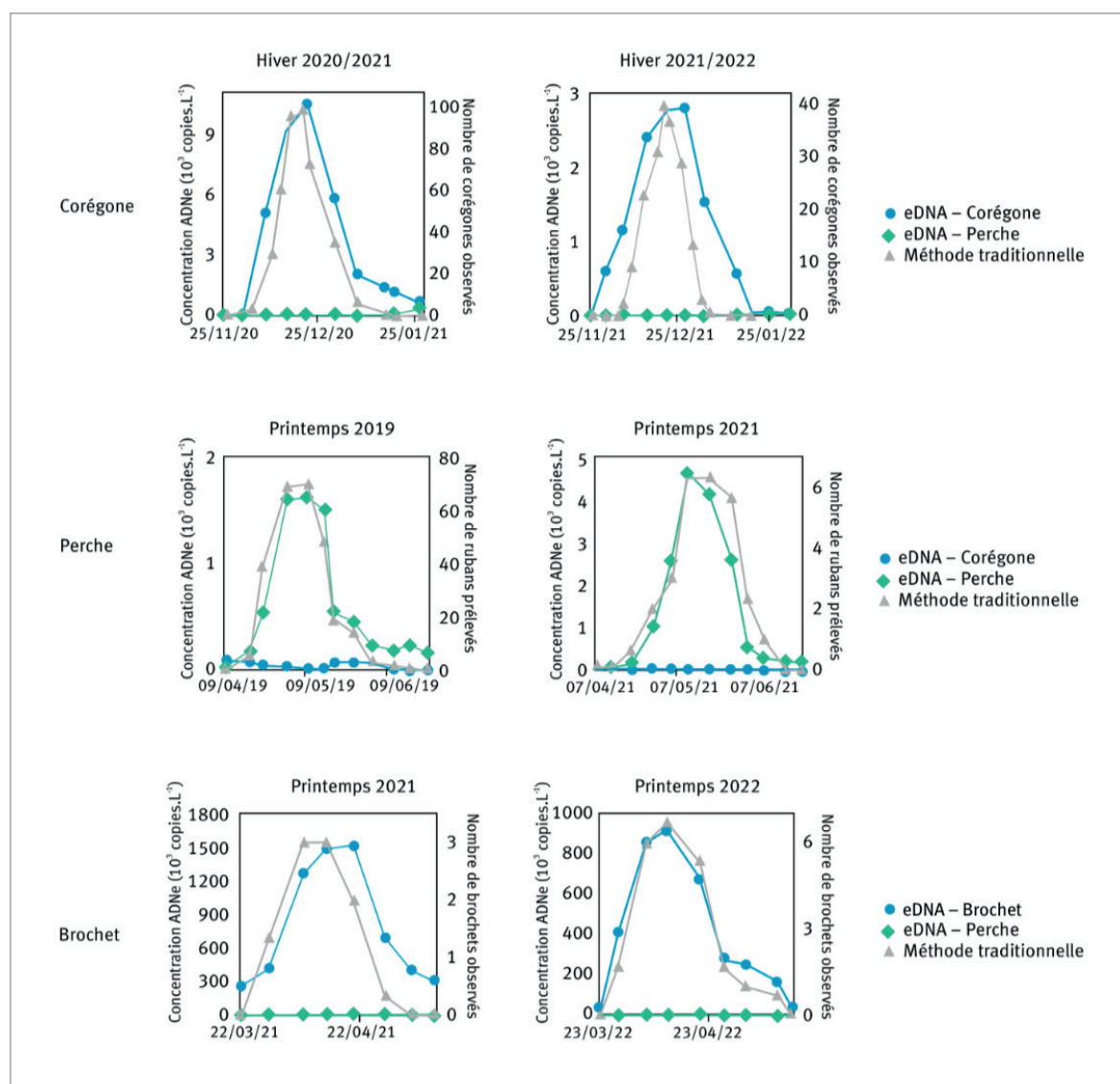
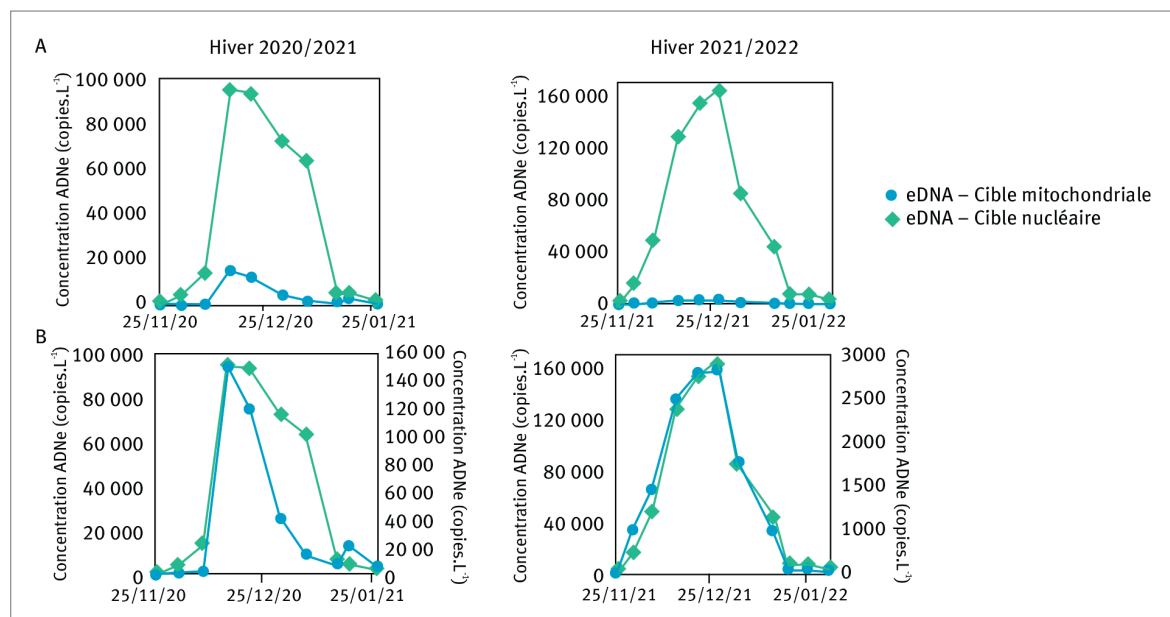


Figure 4 – Comparaison d'une cible nucléaire et mitochondriale pour le suivi ADNe (ADN environnemental) de la phénologie de la reproduction du corégone dans le Léman. A : résultats exprimés sur la même échelle de concentration. B : résultats exprimés sur deux échelles de concentration différentes. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes mobiles sur trois dates consécutives.



et nucléaires lors de la reproduction de différentes espèces afin de déterminer laquelle des deux cibles – nucléaire ou mitochondriale – était la plus efficace dans ce contexte lacustre.

Les résultats illustrés ici pour le corégone (suivi de reproduction hiver 2021-2022 ; figure 4) sont sans équivoque et démontrent que l'ADN nucléaire permet de capter un signal très largement supérieur quantitativement tout en retraçant les mêmes dynamiques (moment de début, de pic, et de fin de reproduction). L'ADNnu permet donc de travailler plus confortablement avec des concentrations d'ADN moins sujettes aux problèmes de seuils de quantification des signaux rares.

Quelle plus-value de l'ARN environnemental pour le suivi de phénologie de reproduction des poissons ?

L'analyse de l'ADNe dans les écosystèmes aquatiques s'est généralisée, mais l'étude de l'ARN environnemental (ARNe) n'en est qu'à ses débuts (Cristescu, 2019). L'ARN, une molécule moins stable que l'ADN, est donc considéré *a priori* moins adaptée pour la surveillance environnementale. Cependant, des expériences de laboratoire récentes ont démontré que l'ARNe peut être facilement extrait et détecté dans des échantillons d'eau jusqu'à 13-72 heures après sa libération (Zou *et al.*, 2025), les concentrations d'ARNe pouvant même être plus élevées que les marqueurs correspondants de l'ADNe (Marshall *et al.*, 2021) en particulier lors d'échantillonnages faits à proximité des organismes étudiés (Von Ammon *et al.*, 2019). L'ARNe a donc récemment suscité un regain d'intérêt dans la surveillance des macro-organismes : alors que les organismes morts libèrent souvent de grandes quantités d'ADN, l'ARN est produit principalement par des organismes physiologiquement actifs et donc refléteraient les assemblages d'organismes métaboliquement

actifs (Cristescu 2019 ; Miyata *et al.*, 2021) en diminuant ainsi les taux de faux positifs qui peuvent survenir avec les méthodes ADNe.

Toutefois, pour se projeter dans des applications futures basées sur l'analyse de l'ARNe (qui par ailleurs pose des contraintes méthodologiques plus fortes que l'ADNe), des études doivent encore être menées pour démontrer la plus-value pour les questions écologiques visées.

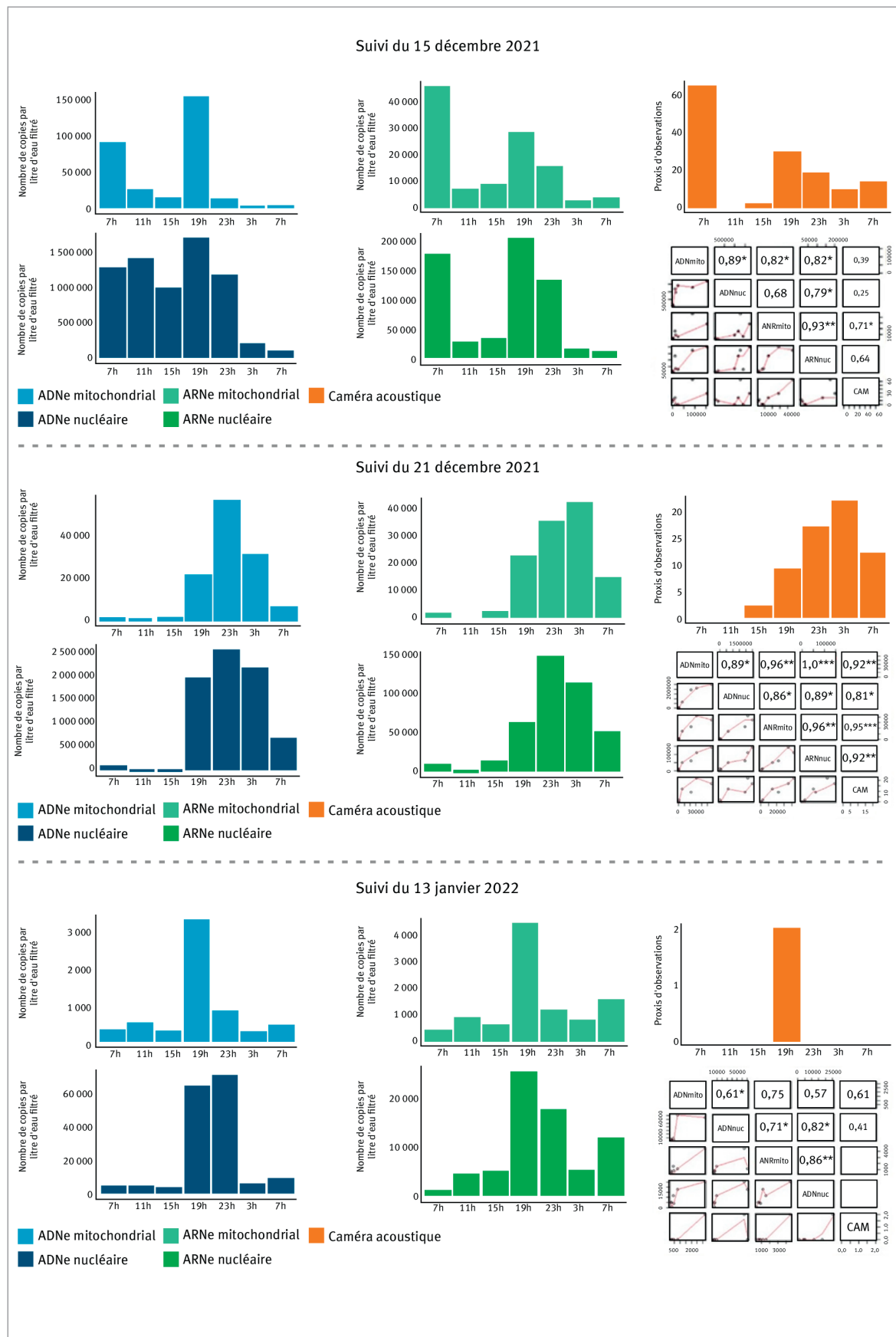
Dans le cadre du projet Quanti-Fish, nous avons exploré l'hypothèse que l'ARNe présentant *a priori* une meilleure corrélation avec l'abondance des poissons (Miyata *et al.*, 2021), pourrait permettre une meilleure estimation du nombre de poissons qui fraient, et donc représenter plus fidèlement l'activité de reproduction que l'ADNe. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé un suivi ADNe et ARNe à partir d'eau prélevée directement dans le cône de détection d'une caméra acoustique installée pour suivre la reproduction du corégone dans le Léman. Les suivis ADNe et ARNe ont été réalisés toutes les quatre heures sur des périodes de vingt-quatre heures afin d'étudier la dynamique de ces deux signaux lorsque les individus sont sur site (la nuit), et lorsqu'ils n'y sont plus (le jour). À la fois les marqueurs nucléaires et mitochondriaux ont été quantifiés par dPCR.

Trois cycles nyctéméraux de vingt-quatre heures ont été réalisés, un au début de la période de reproduction (15 et 21 décembre 2021), un pendant le pic d'activité de la période de reproduction (21 décembre 2021), et un après la période de reproduction (13 janvier 2022).

Les résultats obtenus pour cette comparaison ADNe et ARNe montrent :

(i) **des intensités de signaux ADNe et ARNe contrastés en faveur de l'ADNe.** Le signal ARNe nucléaire est bien plus faible que le signal ADNe nucléaire, (facteur de 14 pour le marqueur nucléaire, facteur de 2 pour le marqueur mitochondrial) (figure 5).

Figure 6 – Dynamiques temporelles des signaux ADNe et ARNe (ADN et ARN environnemental) et des observations à la caméra acoustique mesurées lors des suivis réalisés les 15 décembre, 21 décembre et 13 janvier, soit respectivement au début, milieu et fin de la période de reproduction du corégone dans le Léman. Les concentrations sont exprimées en nombre de copies de gène par litre d'eau filtré. Les taux de corrélations de Spearman entre les différentes approches sont également indiqués.



L'hypothèse selon laquelle le signal ARNe libéré par les organismes dans l'eau est plus intense que le signal ADNe quand on se situe proche du moment de la libération du signal ne semble donc pas se vérifier lors de ce suivi, pour les deux gènes ciblés dans cette étude ;

(ii) une persistance du signal ADNe et ARNe différente mais toutes les deux cohérentes avec les observations en caméra acoustique. Les résultats montrent que contrairement à l'ADNe qui peut persister plusieurs heures après le départ des poissons, l'ARNe détecte plutôt leur présence immédiate, évitant ainsi les « faux positifs » liés à des individus déjà partis. Par ailleurs pour chacune des trois campagnes, l'ARNe reflète plus fidèlement le nombre réel d'individus (estimé par caméra acoustique) que l'ADNe. Les corrélations avec la caméra sont fortes pour l'ARNe (0,61 à 0,95) et bien que significatives sont plus faibles pour l'ADNe (de 0,25 à 0,39).

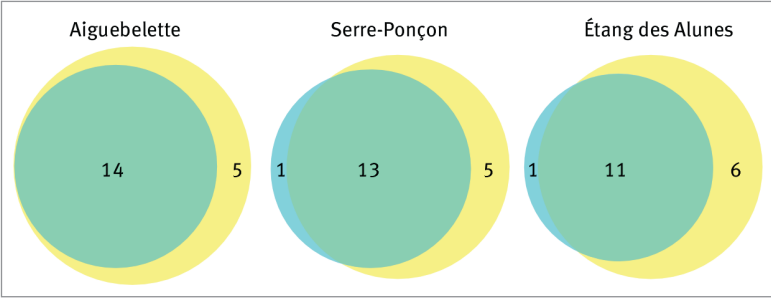
Ces corrélations varient selon les périodes : lors du pic de reproduction (21 décembre), toutes les méthodes sont parfaitement concordantes, illustrant une activité faible en journée et une augmentation du signal à partir de 19 h (figure 5). Lors des périodes à plus faible activité de reproduction (15 décembre, 13 janvier), en présence de quantité d'ARNe et ADNe plus faibles, les corrélations sont moins solides ; on note toutefois que les passages nocturnes détectés à la caméra sont reflétés dans les quantités d'ARNe et ADNe même pour des passages ponctuels d'un faible nombre d'individus (ex. : deux passages le 13 janvier) montrant la fiabilité de ces détections quantitatives.

Si l'on considère les corrélations pour toutes les données collectées (trois suivis), on constate que les approches ADNe et ARNe, ciblant le génome mitochondrial ou nucléaire, sont toutes efficaces pour décrire la présence d'individus sur un site donné et à des pas de temps de quatre heures, avec des atouts différents (tableau 1).

Tableau 1 – Récapitulatif des caractéristiques d'intensité du signal et de corrélation aux observations à la caméra acoustique associées aux suivis ADN environnemental et ARN environnemental (nucléaire ou mitochondrial).

Base nucléotidique	Génome	Intensité du signal	Corrélation avec les observations (caméra)
ADNe	nucléaire	++++	+
ADNe	mitochondrial	++	++
ARNe	nucléaire	+++	+++
ARNe	mitochondrial	+	++++

Figure 6 – Diagramme de Venn représentant les espèces détectées par ADN environnemental (en jaune) et capturées par les filets maillants (en bleu) sur trois plans d'eau (A) Aiguebelette, (B) Serre-Ponçon, (C) Étang des Aulnes.



Même si l'ARNe est plus performant pour refléter le nombre d'individus sur site, l'ADNe présente l'avantage de pouvoir être échantillonné de manière légèrement décalée (en journée) par rapport à la présence nocturne des poissons. Les résultats acquis ont également mis en évidence la nécessité de prélever à heures fixes lors de ces suivis, en cohérence avec des conclusions également obtenues en zone côtière d'un milieu marin par Jensen *et al.* (2022).

L'ADNe nucléaire permet de mesurer un signal très fort par rapport aux autres méthodes, mais ce signal peut parfois perdurer dans le temps et donc refléter moins fidèlement la présence immédiate des individus sur site. Il serait donc à privilégier pour cibler des espèces peu abondantes, et/ou lorsque les sites de reproduction sont incertains.

L'ARNe nucléaire bien corrélé à la présence des individus sur site, est un bon compromis entre intensité du signal et précision spatio-temporelle, et pourrait donc être utilisé pour suivre la dynamique de reproduction à des pas de temps courts y compris pour des espèces peu abondantes. Toutefois, les approches ARNe impliquent des contraintes notamment au niveau de la préservation des échantillons (filtration immédiate après prélèvement des échantillons, et préservation des filtres dans de l'azote liquide, à - 80 °C ou à l'aide de tampon commerciaux onéreux). Au regard des résultats obtenus, la plus-value apportée par les approches ARNe semble limitée dans le cadre d'un simple suivi de la reproduction, mais de nombreuses autres perspectives d'applications sont envisageables pour étudier des phénomènes comme l'éclosion, la maturation des gamètes ou encore le stress (e.g. Tsuru *et al.*, 2021).

L'approche d'inventaire par métabarcoding des communautés piscicoles

Un projet dédié aux questions d'échantillonnage de terrain : où, quand, comment échantillonner ?

Si l'optimisation des procédures de laboratoire (i.e., extraction d'ADNe, choix des barcodes, protocoles d'amplification et méthodes de séquençage) est essentielle pour garantir une efficacité maximale du métabarcoding (Takahashi *et al.*, 2023), le protocole d'échantillonnage sur le terrain est un aspect fondamental des approches ADNe comme il l'est pour toute étude écologique (Hänfling *et al.*, 2016a ; Sellers *et al.*, 2024). Concernant le métabarcoding appliqué aux communautés piscicoles, différentes stratégies d'échantillonnages ont été mises en place selon les études recensées dans la littérature, avec des différences sur la localisation du prélèvement d'eau (en berge, en zone profonde) (Hänfling *et al.*, 2016b ; Lawson Handley *et al.*, 2019), la profondeur du prélèvement (en surface, dans la colonne d'eau) (Littlefair *et al.*, 2021), le type de prélèvement (ponctuel/discret ou intégré) (Civade *et al.*, 2016 ; Rund *et al.*, 2025 ; Vautier *et al.* 2026), la gestion des échantillons (isolés ou regroupés) (Sato *et al.*, 2017), la quantité d'eau prélevée (de quelques mL à des dizaines de litres) et la temporalité de l'échantillonnage (saison) (Lawson Handley *et al.*, 2019). Bien qu'aucune méthode ne fasse définitivement consensus, il a été établi que l'échantillonnage de la zone littorale (berges) doit être privilégié

pour détecter un maximum d'espèces à partir d'un prélèvement de surface (Zhang *et al.*, 2020), tout comme l'utilisation de cartouche de filtration fermée pour limiter les contaminations. L'échantillonnage discret, par point, est largement répandu, sans que le type d'échantillonnage (systématique, stratifié, aléatoire), la quantité d'eau prélevée ou le nombre de points ne soient standardisés. Cette technique a pour avantages de renvoyer une information localisée de la détection des espèces et sa facilité de déploiement sur le terrain. De par la distribution en patch de l'ADNe dans l'environnement lentique (Takahara *et al.*, 2012 ; Eichmiller *et al.*, 2014 ; Ghosal *et al.*, 2018 ; Pukk *et al.*, 2021), elle nécessite toutefois un nombre de points d'échantillonnage adapté, potentiellement élevé pour les grands lacs, ceci notamment pour la détection des espèces rares (Sellers *et al.*, 2024).

Dans le cadre du projet readFish illustré ici, c'est une méthode dite « intégratrice » qui a été retenue. Elle consiste à collecter un grand volume d'eau en surface et en continu le long d'un linéaire littoral (Civade *et al.*, 2016 ; Hervé *et al.*, 2022). L'objectif est que l'échantillon obtenu soit représentatif de l'ensemble des habitats rencontrés et que la détection des espèces soit moins impactée par la distribution non homogène de l'ADN dans le milieu. Comme pour toute méthode d'échantillonnage il a été nécessaire de s'intéresser à la dimension spatiale (où échantillonner) et temporelle (quand échantillonner) (Hervé *et al.*, 2022) de l'échantillonnage ainsi qu'à l'effort (le nombre de linéaires) nécessaire pour détecter un maximum d'espèces (Hervé 2023).

Les résultats du projet readFish illustrent les atouts du metabarcoding pour le suivi des communautés piscicoles lacustres. Globalement plus d'espèces sont détectées avec l'ADNe qu'avec la méthode traditionnelle utilisée pour la surveillance (filets benthiques et pélagiques), sans que ces détections ne soient de faux positifs pour

autant (figure 6). Les espèces détectées seulement par l'ADNe peuvent être soit des espèces présentes en faible nombre dans les lacs, soit des espèces avec des tailles ou des écologies particulières (ex. : espèces benthiques comme la blennie, *Salaria fluviatilis*, ou de grande taille comme le silure, *Silurus glanis*). Ces dernières sont peu ou pas capturées par les filets maillants. Il arrive aussi que de rares espèces capturées par la méthode traditionnelle ne soit pas détectées par ADNe, comme la brème bordelière (*Blicca bjoerkna*). Il peut s'agir d'une difficulté d'assignation taxonomique avec le barcode utilisé ici (barcode « teleo ») qui peut regrouper les deux brèmes (avec la brème commune, *Abramis brama*) au sein d'un même « complexe » sans toujours pouvoir les différencier (Pont *et al.*, 2018).

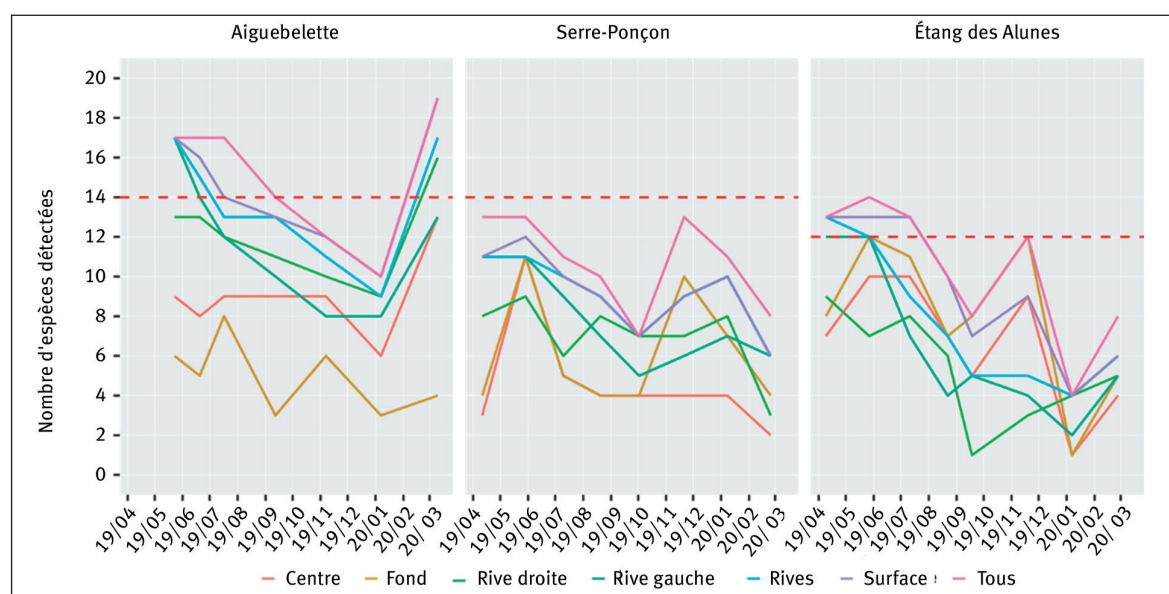
Conformément à ce qui a pu être observé dans d'autres études, c'est en berge que l'on détecte le plus grand nombre d'espèces (figure 7). Les linéaires réalisés au centre des plans d'eau permettent généralement de détecter un nombre restreint d'espèces, aussi détectables en rive. Les prélèvements d'eau en zone profonde (zone centrale du lac, eau prélevée à « fond - 2 m » environ) ont pu donner un signal complémentaire de celui obtenu pour les rives, notamment pour des espèces pélagiques peu fréquentes dans la colonne d'eau (ex. : le corégone, *Coregonus lavaretus*, à Serre-Ponçon). Néanmoins, dès que ces mêmes espèces sont abondantes au sein des plans d'eau, elles sont aussi détectées en rive.

Les résultats du metabarcoding (notamment les proportions relatives des espèces inventoriées) varient au cours de l'année en fonction de l'activité des espèces. Les périodes hivernales généralement associées avec une baisse de l'activité des ectothermes³ ne sont clairement pas les plus favorables pour détecter un maximum d'espèces lacustres. Seules des espèces psychrophiles⁴ et pélagiques peuvent être plus détectées l'hiver,

3. Un organisme ectotherme est un animal dont la température corporelle dépend principalement de la température de son environnement, car son métabolisme ne lui permet pas de réguler sa température interne lui-même.

4. Les organismes psychrophiles sont des êtres vivants adaptés aux milieux froids.

Figure 7 – Nombre d'espèces détectées sur les lacs avec les différents prélèvements ADNe indépendamment et cumulés : (A) Aiguebelette, (B) Serre-Ponçon, et (C) Étang des Aulnes, au cours de l'année et en différents endroits des lacs (l'ensemble des prélèvements, le fond, la rive droite, la rive gauche, les deux rives, les rives et le centre, tous les prélèvements confondus). Pour comparaison, le nombre d'espèces capturées par les filets maillants lors des deux dernières campagnes de pêches figure en pointillés rouges.



notamment quand elles se rapprochent des berges. Pour la majorité des autres espèces, les pics de détection se situent au printemps au moment de la reproduction (notamment en lien avec l'augmentation des quantités d'ADN dans l'eau via les gamètes) et au début d'automne.

Concernant l'effort d'échantillonnage, deux stratégies ont été proposées au cours du projet readFish, pour tenir compte de la taille des plans d'eau et du temps de mise en œuvre sur le terrain (Hervé, 2023). Les objectifs étaient de disposer d'un échantillonnage des habitats littoraux le plus exhaustif possible, tout en limitant le temps et donc les coûts inhérents au travail de terrain. Pour les plans d'eau de moins de 1 000 ha, le périmètre a été divisé en linéaires de tailles égales, l'effort variant de un à quatre linéaires pour lesquels un échantillon intégré (30 L) a été réalisé (figure 8). Pour les plans d'eau de plus de 1 000 ha, ce dispositif n'était pas envisageable. Il n'est pas possible de trouver des combinaisons de vitesse de navigation et de vitesse de filtration qui permettent de réaliser un seul échantillon pour des périmètres aussi importants. Les grands plans d'eau ont eux été échantillonnés en constituant des linéaires d'environ 5 km le long desquels un échantillon intégré (30 L) est réalisé.

Sur les huit plans d'eau de moins de 1 000 ha intégrés au projet, deux échantillons (linéaires) est un compromis satisfaisant pour avoir une bonne estimation de la diversité piscicole. L'augmentation de l'effort n'amène pas des détections supplémentaires systématiques. Quel que soit l'effort d'échantillonnage, les espèces les plus abondantes sont toujours détectées (ex. : la perche et le gardon). Les différences de détection entre efforts d'échantillonnage (nombre de linéaires) sont dues aux espèces rares à très rares. Selon les plans d'eau, le maximum de diversité a pu être détecté avec deux ou trois linéaires.

Concernant les trois grands plans d'eau de l'étude, des disparités spatiales dans la détection des espèces ont été observées entre les linéaires. Aucun linéaire n'a permis de détecter l'ensemble des espèces présentes, même les linéaires les plus aval, proches des barrages ou de l'exutoire. Globalement il faut entre sept et huit linéaires pour détecter la plus grande majorité des espèces (soit

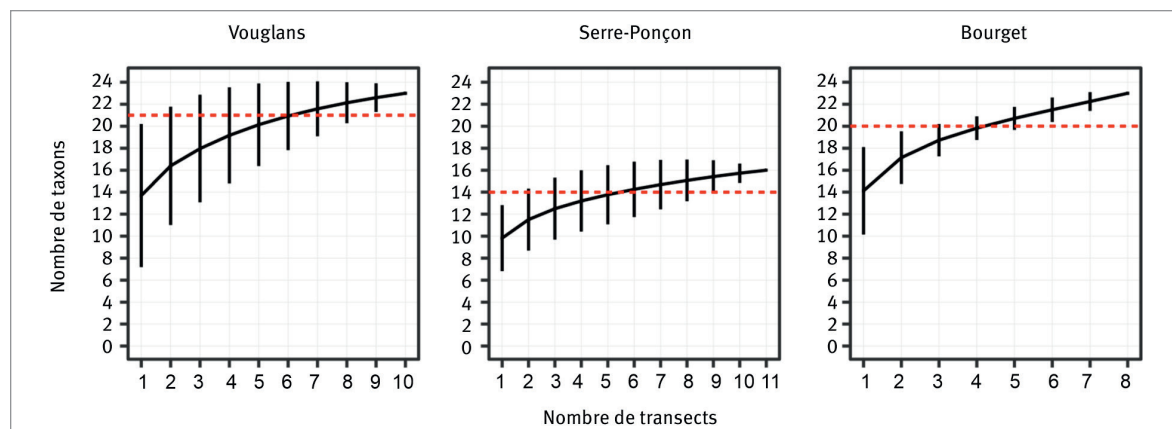
quasiment le tour complet). Dès six linéaires, le nombre moyen d'espèces détectées dépasse le nombre d'espèces capturées par les filets maillants (en cumulées sur toutes les campagnes de pêches disponibles au moment du projet; figure 8). Pour ces derniers, avec soixante filets on atteint difficilement une asymptote, relativement éloignée du nombre d'espèces détectées en ADNe. En plus de la capacité de détection des espèces, la différence de temps de travail sur le terrain entre les deux méthodes est remarquable : un échantillonnage ADNe est réalisée entre un jour et demi et 2 jours (à trois personnes) contre une semaine pour les campagnes au filet (à plus de trois personnes).

Le projet readFish a confirmé l'intérêt de la méthode intégratrice d'échantillonnage ADNe pour la surveillance des communautés piscicoles lacustres. Le nombre d'espèces détectées par rapport à l'effort d'échantillonnage est incomparable par rapport à la méthode traditionnelle actuellement utilisée. Les inconvénients de la méthode intégratrice restent l'absence de spatialisation du signal (juste une spatialisation à très gros grain) et la limite sur la quantification précise de l'abondance (effectif, biomasse) des différentes espèces (contrairement aux filets). Les problèmes de résolution taxonomique sont eux essentiellement liés au choix du barcode (ici, *teleo*).

Aller plus loin dans la valeur quantitative des données de metabarcoding

S'inscrivant en complémentarité des avancées illustrées précédemment, un projet récent (projet Quanti-Inventory) a permis d'apporter une validation méthodologique supplémentaire pour améliorer la dimension quantitative des résultats de metabarcoding. En appliquant deux stratégies d'échantillonnage (échantillonnages discrets et intégrés), il s'est agi plus spécifiquement d'évaluer deux protocoles moléculaires visant à générer des données quantitatives consolidées à partir des résultats obtenus par metabarcoding. Ces protocoles moléculaires permettant le passage d'inventaires d'espèces, semi-quantitatifs (obtenus par metabarcoding), à des données quantitatives (nombre de copies d'ADN) estimées pour chaque espèce inventoriée.

Figure 8 – Courbe d'accumulation pour les trois plans d'eau de plus de 1 000 ha du projet readFish. Les courbes d'accumulation (noires) représentent le nombre de taxons différents détectés par les méthodes ADNe (ordonnées) en fonction du nombre de linéaires (transects) présentés en abscisse. La ligne pointillée rouge représente le nombre maximal d'espèces détectées par les filets maillants lors des campagnes de suivi DCE⁵ (l'ensemble des espèces détectées au cours de toutes les campagnes de pêche disponibles).



Les deux méthodes testées pour obtenir une version « quantitative » des données de métabarcoding sont (i) inclure des standards internes (quantités connues d'ADN venant d'espèces « exotiques ») dans chaque extrait d'ADN avant le séquençage (Ex. Ushio *et al.*, 2018); (ii) combiner métabarcoding et quantification de l'ADNe de tous les poissons par dPCR (amorces généralistes ciblant les poissons, ex. Pont *et al.*, 2023) (figure 2).

Les résultats obtenus par ces deux approches ont été confrontés à des données « de références » indépendantes : d'une part des données moléculaires obtenues par dPCR utilisées pour des quantifications absolues d'ADNe des principales espèces piscicoles, et, d'autre part, des données issues de pêches scientifiques traditionnelles aux filets.

Les analyses montrent que ces choix méthodologiques influencent la robustesse quantitative du métabarcoding. La collecte de grands volumes d'eau de manière intégrée spatialement tend généralement à sous-estimer les concentrations d'ADNe. Cependant, lorsque cette méthode d'échantillonnage est combinée avec le protocole moléculaire utilisant l'ajout de standards internes, elle fournit des estimations plus robustes de l'abondance des espèces. Ainsi, l'étude met en évidence la possibilité d'améliorer la fiabilité quantitative des données notamment en incluant ces standards internes ; sur cette base, des recommandations opérationnelles sont proposées pour le suivi des communautés piscicoles (Bylemans *et al.*, in prep.).

Vers le transfert opérationnel

En s'appuyant sur l'ensemble des développements méthodologiques mentionnés ci-avant, un déploiement des méthodes ADNe pour la surveillance des assemblages piscicoles lacustres est aujourd'hui engagé sur le territoire métropolitain, via le projet Fish-DNA-Watch. Ce projet vise à transférer les protocoles de terrain vers les opérateurs (Office français de la biodiversité - OFB - dans un 1er temps) pour en tester la mise en œuvre pratique. Ce transfert s'appuyant sur la formalisation de supports écrits et vidéo détaillant les procédures de terrain s'accompagne d'un retour d'expérience des opérateurs afin d'ajuster si nécessaire certains points du protocole

proposé. Le projet inclut par ailleurs un volet de comparaison avec les méthodes traditionnelles (pêches DCE). Cette comparaison vise non seulement à confronter les composition et structure des assemblages piscicoles mais aussi les estimations d'indices de qualité écologique (dans un premier temps de type IIR et IIL)⁵ utilisés en France dans le cadre de la directive cadre sur l'eau (DCE) afin d'évaluer les possibles écarts de diagnostic entre méthodes ADNe et traditionnelles.

Cette étape représentant une première mise à l'échelle de ces méthodes d'inventaires non invasifs sera fondatrice pour anticiper un déploiement plus complet, assurer une bonne complémentarité avec les méthodes traditionnelles établies et accompagner l'évolution des compétences inhérentes à l'utilisation de ces méthodes, notamment pour les agents de terrain. L'intégration de méthodes complémentaires, notamment des approches observationnelles traditionnelles et de nouvelle génération couplées aux techniques moléculaires ADN, sera probablement essentielle pour générer un corpus complet et fiable d'informations écologiques en vue de l'évaluation de l'état des écosystèmes. ■

5. IIR et IIL pour Indice Ichtyofaune pour les Retenues et Indice Ichtyofaune Lacustre, sont les indices multimétriques officiels, basés sur les communautés piscicoles, pour évaluer respectivement le potentiel écologique des retenues et l'état écologique des plans d'eau nationaux.

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier OLA - ANAEE-France pour l'appui en termes de prélèvements et mesures *in situ* en lac, et tout particulièrement le personnel mobilisé pour les suivis de la phénologie de reproduction des poissons sur le Léman. Le projet readFish a été mené en collaboration avec T. Dejean, P. Jean et A. Valentini (Spygen), T. Peroux (INRAE), J.-C. Raymond (OFB). Le projet Quanti-Fish a été mené en collaboration avec J. Guillard, C. Rautureau et Q. Godeaux (INRAE), et avec l'appui de J.-C. Hustache, P. Perney, P. Quetin, L. Gobillot. Le projet FishDNA-Watch a été mené en collaboration avec Julie Neury-Ormanni pour l'appui à la coordination du déploiement national et aux ingénieurs et techniciens des directions régionales de l'OFB, et grâce à l'appui technique de A. Aubin (INRAE). Nous les remercions pour leur soutien à la réalisation de ces recherches.

Encadré 3 – Glossaire

Amorces : courtes séquences ADN simple brin (une dizaine de nucléotides) servant de site de reconnaissance et d'ancrage pour l'ADN polymérase, enzyme permettant l'amplification spécifique d'un fragment ADN d'intérêt lors de la PCR. Les amorces, vont par paire, et sont des séquences complémentaires à la région ADN d'intérêt et la délimite physiquement en l'encadrant.

Amplicons/Produits de PCR : fragments d'ADN obtenus par amplification à la suite d'une PCR.

Barcode : courte séquence d'ADN présente sur un gène universel d'une communauté cible permettant l'identification d'une grande diversité d'organismes.

Métabarcoding : méthode d'analyse d'ADN par séquençage haut débit d'un court fragment de gène « barcode » permettant d'étudier la diversité d'une communauté cible dans un échantillon environnemental.

PCR : *Polymérase Chain Reaction*/Réaction de polymérase en chaîne. Technique permettant l'amplification d'un fragment de matériel génétique cible.

PCR digitale : technique qui quantifie de façon absolue l'ADN ou l'ARN en répartissant l'échantillon dans de nombreuses micro-réactions indépendantes ce qui permet une détection très sensible des événements rares.

Séquençage haut-débit : le séquençage de l'ADN permet la détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN cible. Les techniques de séquençage haut-débit permettent l'obtention rapide de séquences de millions de fragments ADN en parallèle.

RÉFÉRENCES

- Albert, J. S., Destouni, G., Duke-Sylvester, S. M., Magurran, A. E., Oberdorff, T., Reis, R. E., Winemiller, K. O., & Ripple, W. J. (2021). Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis. *Ambio*, 50, 85-94. <https://doi.org/10.1007/s13280-020-01318-8>
- Altermatt, F., Couton, M., Carraro, L., Keck, F., Lawson-Handley, L., Leese, F., Zhang, X., Zhang, Y., & Blackman, R. C. (2025). Utilizing aquatic environmental DNA to address global biodiversity targets. *Nature Reviews Biodiversity*, 1(5), 332-346. <https://doi.org/10.1038/s44358-025-00044-x>
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1819-1827. <https://doi.org/10.1021/es404734p>
- Bracken, F. S. A., Rooney, S. M., Kelly-Quinn, M., King, J. J., & Carlsson, J. (2019). Identifying Spawning Sites and Other Critical Habitat in Lotic Systems Using eDNA "Snapshots": A Case Study Using the Sea Lamprey *Petromyzon marinus* L. *Ecology and Evolution*, 9, 553-567. <https://doi.org/10.1002/ece3.4777>
- Bylemans, J., Furlan, E. M., Hardy, C. M., McGuffie, P., Lintermans, M. & Gleeson, D. M. (2017). An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods In Ecology And Evolution*, 8(5), 646-655. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12709>
- Bylemans, J., Gleeson, D. M., Hardy, C. M., & Furlan, E. (2018). Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers : A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray–Darling Basin (Australia). *Ecology And Evolution*, 8(17), 8697-8712. <https://doi.org/10.1002/ece3.4387>
- Capo, E., Spong, G., Koizumi, S., Puts, I., Olajos, F., Königsson, H., Karlsson, J., & Byström, P. (2021). Droplet digital PCR applied to environmental DNA, a promising method to estimate fish population abundance from humic-rich aquatic ecosystems. *Environmental DNA*, 3(2), 343-352. <https://doi.org/10.1002/edn3.115>
- Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J., 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. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157366>
- Closek, C., Starks, H., Andruszkiewicz, E., Boehm, A. (2019). Environmental DNA (eDNA) extraction with modified Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit. *protocols.io* <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.yrqfv5w>
- Cristescu, M. E. (2019). Can environmental RNA revolutionize biodiversity science ? *Trends In Ecology & Evolution*, 34(8), 694-697. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.05.003>
- Deiner, K., & Altermatt, F. (2014). Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE*, 9(2), e88786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>
- Di Muri, C., Lawson Handley, L., Bean, C. W., Benucci, M., Harper, L. R., James, B., Li, J., Winfield, I. J., & Hänfling, B. (2023). Spatio-temporal monitoring of lake fish spawning activity using environmental DNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 5, 849-860. <https://doi.org/10.1002/edn3.343>
- Domaizon, I., Winegardner, A., Capo, E., Gauthier, J., & Gregory-Eaves, I. (2017). DNA-based methods in paleolimnology : new opportunities for investigating long-term dynamics of lacustrine biodiversity. *Journal Of Paleolimnology*, 58(1), 1-21. <https://doi.org/10.1007/s10933-017-9958-y>
- Dudgeon, D. (2019). Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Current Biology*, 29(19), 960-967. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.002>
- Eichmiller, J. J., Bajer, P. G., & Sorensen, P. W. (2014). The Relationship between the Distribution of Common Carp and Their Environmental DNA in a Small Lake. *PLoS ONE*, 9(11), e112611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112611>
- 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>
- Gauvin, P., Domaizon, I., Bouchez, A. & Rimet, F. (2025). Environmental Matrices Need Consideration: Insights From Water and Biofilm Environmental DNA for Multi-Taxonomic Biomonitoring. *Environmental DNA*, 7, e70079. <https://doi.org/10.1002/edn3.70079>
- Ghosal, R., Eichmiller, J. J., Witthuhn, B. A., & Sorensen, P. W. (2018). Attracting Common Carp to a bait site with food reveals strong positive relationships between fish density, feeding activity, environmental DNA, and sex pheromone release that could be used in invasive fish management. *Ecology and Evolution*, 8(13), 6714-6727. <https://doi.org/10.1002/ece3.4169>
- Hänfling, B., Handley, L. L., Read, D. S., & Winfield, I. (2016a). eDNA-based metabarcoding as a monitoring tool for fish in large lakes. Report – SC140018/R, Environment Agency, Horizon House, Deanery Road, Bristol, BS1 5AH. <https://cieem.net/resource/edna-based-metabarcoding-as-a-monitoring-tool-for-fish-in-large-lakes/>
- Hänfling, B., Handley, L. L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., Oliver, A., & Winfield, I. (2016b). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 25(13), 3101-3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660>
- Harrison, J. B., Sunday, J. M., Rogers, S. M. (2019). Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings Of The Royal Society B Biological Sciences*, 286(1915), 20191409. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1409>
- Harper, L. R., Handley, L. L., Carpenter, A. I., Ghazali, M., Di Muri, C., Macgregor, C. J., Logan, T. W., Law, A., Breithaupt, T., Read, D. S., McDevitt, A. D., & Hänfling, B. (2019). Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological Conservation*, 238, 108225. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108225>
- Hervé, A. (2023). *Standardisation d'une méthode de suivi de la faune piscicole en écosystèmes lenticques par l'ADN environnemental*. Université Savoie Montblanc. https://theses.hal.science/tel-04499862/file/HERVE_2023_archivage.pdf
- Hervé, A., Domaizon, I., Baudoin, J., Dejean, T., Gibert, P., Jean, P., Peroux, T., Raymond, J., Valentini, A., Vautier, M., & Logez, M. (2022). Spatio-temporal variability of eDNA signal and its implication for fish monitoring in lakes. *PLOS ONE*, 17, e0272660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272660>

RÉFÉRENCES

- Jensen, M. R., Sigsgaard, E. E., De Paula Ávila, M., Agersnap, S., Brenner-Larsen, W., Sengupta, M. E., Xing, Y., Krag, M. A., Knudsen, S. W., Carl, H., Möller, P. R., & Thomsen, P. F. (2022). Short-term temporal variation of coastal marine eDNA. *Environmental DNA*, 4(4), 747-762. <https://doi.org/10.1002/edn3.285>
- Jo, T., Arimoto, M., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2020). Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2(2), 140-151. <https://doi.org/10.1002/edn3.51>
- Lacoursière-Roussel, A., Côté, G., Leclerc, V. & Bernatchez, L. (2016). Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal Of Applied Ecology*, 53(4), 1148-1157. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12598>
- Handley, L. L., Read, D. S., Winfield, I. J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., Hahn, C., Blackman, R., Wilcox, R., Donnelly, R., Szitenberg, A., & Hänfling, B. (2019). Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England's largest lake. *Environmental DNA*, 1(1), 26-39. <https://doi.org/10.1002/edn3.5>
- Littlefair, J. E., Hrenchuk, L. E., Blanchfield, P. J., Rennie, M. D., & Cristescu, M. E. (2021). Thermal stratification and fish thermal preference explain vertical eDNA distributions in lakes. *Molecular Ecology*, 30(13), 3083-3096. <https://doi.org/10.1111/mec.15623>
- Lopez, M. L. D., Bonderud, M., Allison, M. J., MacDermid, F., Ussery, E. J., McMaster, M. E., Dersch, A., Drevnick, P., & Helbing, C. C. (2024). Reconstructing historical fish occurrence and documenting human-mediated introductions in lakes using sedimentary DNA. *Global Ecology And Conservation*, 54, e03040. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2024.e03040>
- Marshall, N. T., Vanderploeg, H. A. & Chaganti, S. R. (2021). Environmental (e)RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific Reports*, 11(1), 2769. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82205-4>
- 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. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- Miyata, K., Inoue, Y., Amano, Y., Nishioka, T., Yamane, M., Kawaguchi, T., Morita, O., & Honda, H. (2021). Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity. *Ecological Indicators*, 128, 107796. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107796>
- Nevers, M. B., Byappanahalli, M. N., Morris, C. C., Shively, D., Przybyla-Kelly, K., Spoljaric, A. M., Dickey, J., & Roseman, E. F. (2018). Environmental DNA (eDNA) : A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). *PLoS ONE*, 13(1), e0191720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191720>
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., Borja, A., Bouchez, A., Cordier, T., Domaizon, I., Feio, M. J., Filipe, A. F., Fornaroli, R., Graf, W., Herder, J., Van Der Hoorn, B., Jones, J. I., Sagova-Mareckova, M., Moritz, C., ... Kahlert, M. (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era : Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *The Science Of The Total Environment*, 637-638, 1295-1310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.002>
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA : What's behind the term ? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 29(22), 4258-4264. <https://doi.org/10.1111/mec.15643>
- Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civade, R., Jean, P., Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H., & Dejean, T. (2018). Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports*, 8(1), 10361. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>
- Pont, D., Meulenbroek, P., Bammer, V., Dejean, T., Erős, T., Jean, P., Lenhardt, M., Nagel, C., Pekarik, L., Schabuss, M., Stoeckle, B. C., Stoica, E., Zornig, H., Weigand, A., & Valentini, A. (2023). Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, 23(2), 396-409. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13715>
- Pukk, L., Kanefsky, J., Heathman, A. L., Weise, E. M., Nathan, L. R., Herbst, S. J., Sard, N. M., Scribner, K. T., & Robinson, J. D. (2021). eDNA metabarcoding in lakes to quantify influences of landscape features and human activity on aquatic invasive species prevalence and fish community diversity. *Diversity And Distributions*, 27(10), 2016-2031. <https://doi.org/10.1111/ddi.13370>
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Zinger, L., Kinziger, A., Bik, H. M., Bonin, A., Coissac, E., Emerson, B. C., Lopes, C. M., Pelletier, T. A., Taberlet, P., & Narum, S. (2021). Biodiversity monitoring using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 21(5), 1405-1409. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13399>
- Rourke, M. L., Fowler, A. M., Hughes, J. M., Broadhurst, M. K., DiBattista, J. D., Fielder, S., Walburn, J. W., & Furlan, E. M. (2022). Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass : A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4(1), 9-33. <https://doi.org/10.1002/edn3.185>
- Rund, H., Kurmayer, R., Dobrovolsky, S., Luger, M., & Wanzenböck, J. (2025). Application of eDNA metabarcoding to assess spatial distribution and habitat use by freshwater fish in a peri-alpine lake. *Ecological Indicators*, 174, 113459. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2025.113459>
- Sato, H., Sogo, Y., Doi, H., & Yamanaka, H. (2017). Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities. *Scientific Reports*, 7(1), 14860. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14978-6>
- Sayer, C. A., Fernando, E., Jimenez, R. R., Macfarlane, N. B. W., Rapacciolo, G., Böhm, M., Brooks, T. M., Contreras-MacBeath, T., Cox, N. A., Harrison, I., Hoffmann, M., Jenkins, R., Smith, K. G., Vié, J., Abbott, J. C., Allen, D. J., Allen, G. R., Barrios, V., Boudot, J., ... Darwall, W. R. T. (2025). One-quarter of freshwater fauna threatened with extinction. *Nature*, 638(8049), 138-145. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08375-z>
- Sellers, G. S., Jerde, C. L., Harper, L. R., Benucci, M., Di Muri, C., Li, J., Peirson, G., Walsh, K., Hatton-Ellis, T., Duncan, W., Duguid, A., Ottewill, D., Willby, N., Law, A., Bean, C. W., Winfield, I. J., Read, D. S., Handley, L. L., & Hänfling, B. (2024). Optimising species detection probability and sampling effort in lake fish eDNA surveys. *Metabarcoding And Metagenomics*, 8. <https://doi.org/10.3897/mbmg.8.104655>

RÉFÉRENCES

- Seymour, M., Durance, I., Cosby, B. J., Ransom-Jones, E., Deiner, K., Ormerod, S. J., Colbourne, J. K., Wilgar, G., Carvalho, G. R., De Bruyn, M., Edwards, F., Emmett, B. A., Bik, H. M., & Creer, S. (2018). Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology*, 1(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s42003-017-0005-3>
- Stewart, K. A. (2019). Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation*, 28, 983-1001. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01709-8>
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789-1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. (2012). Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS ONE*, 7(4), e35868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035868>
- Takahashi, M., Saccò, M., Kestel, J. H., Nester, G., Campbell, M. A., Van Der Heyde, M., Heydenrych, M. J., Juszkiwicz, D. J., Nevill, P., Dawkins, K. L., Bessey, C., Fernandes, K., Miller, H., Power, M., Mousavi-Derazmahalleh, M., Newton, J. P., White, N. E., Richards, Z. T., & Allentoft, M. E. (2023). Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *The Science Of The Total Environment*, 873, 162322. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322>
- Takeuchi, A., Iijima, T., Kakuzen, W., Watanabe, S., Yamada, Y., Okamura, A., Horie, N., Mikawa, N., Miller, M. J., Kojima, T., & Tsukamoto, K. (2019). Release of eDNA by different life history stages and during spawning activities of laboratory-reared Japanese eels for interpretation of oceanic survey data. *Scientific Reports*, 9(1), 6074. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42641-9>
- Thalinger, B., Kirschner, D., Pütz, Y., Moritz, C., Schwarzenberger, R., Wanzenböck, J., & Traugott, M. (2021). Lateral and longitudinal fish environmental DNA distribution in dynamic riverine habitats. *Environmental DNA*, 3(1), 305-318. <https://doi.org/10.1002/edn3.171>
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Tsuri, K., Ikeda, S., Hirohara, T., Shimada, Y., Minamoto, T., & Yamanaka, H. (2021). Messenger RNA typing of environmental RNA (eRNA) : A case study on zebrafish tank water with perspectives for the future development of eRNA analysis on aquatic vertebrates. *Environmental DNA*, 3(1), 14-21. <https://doi.org/10.1002/edn3.169>
- Ushio, M., Murakami, H., Masuda, R., Sado, T., Miya, M., Sakurai, S., Yamanaka, H., Minamoto, T., & Kondoh, M. (2018). Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding And Metagenomics*, 2. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.23297>
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.,... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929-942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2023.106708>
- Vautier, M., Bylemans, J., Baudoin, J., Guillard, J., Goulon, C., Logez, M., & Domaizon, I. (2026). Environmental DNA (eDNA) sampling strategies influence estimates of lake fish eDNA concentrations. *Knowledge And Management Of Aquatic Ecosystems*, 427, 9. <https://doi.org/10.1051/kmae/2026004>
- Von Ammon, U., Wood, S. A., Laroche, O., Zaiko, A., Lavery, S. D., Inglis, G. J., & Pochon, X. (2019). Linking Environmental DNA and RNA for Improved Detection of the Marine Invasive Fanworm *Sabella spallanzanii*. *Frontiers In Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00621>
- WWF. (2020). Rapport planète vivante 2020. https://www.wwf.fr/sites/default/files/doc-2020-11/20200910_Rapport_Planete_Vivante_WWF.pdf
- Zhang, S., Lu, Q., Wang, Y., Wang, X., Zhao, J., & Yao, M. (2020). Assessment of fish communities using environmental DNA : Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes. *Molecular Ecology Resources*, 20(1), 242-255. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13105>
- Zou, N., Wang, S., Wang, S., Qiu, W., Kong, W., Wang, G., Wang, S., & Wang, S. (2025). Environmental RNA as a transformative tool for aquatic ecosystem health assessment : progress and challenges. *Ecological Indicators*, 180, 114328. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2025.114328>