



INTERET DE L'INTEGRATION DES OUTILS D'ANALYSES DE TYPE ADN ENVIRONNEMENTAL AU PROTOCOLE EN PLACE POUR COMPLETER LE SUIVI DES COMMUNAUTES ZOOPLANCTONIQUES

RAPPORT FINAL

PROJET 04852247

DOCUMENT

Zone	Domaine	Nature document
FR	EMR	Rapport final

REVISIONS

Version	Date	Auteurs / Vérificateur	Description
0.1	18/09/2023	Simon Fournier & Yann Patry	Version initiale
0.2	10/11/2023	Simon Fournier, Lise Bacouillard, Yann Patry	Développement de quelques points en discussion à la demande du Conseil Scientifique

COORDONNEES

Adresse de l'établissement	Directeur
Setec energie environnement	Philippe Bornens
Immeuble Central Seine	Directeur
42 - 52 quai de la Rapée - CS 71230	ZA la Grande Halte
75 583 Paris cedex 12	29 940 La Forêt-Fouesnant
FRANCE	France
Tél +33 1 82 51 55 55	Tél +33 2 98 51 41 75
Fax +33 1 82 51 55 56	Philippe.bornens@invivo.setec.fr

Table des matières

1. CONTEXTE	4
2. INTRODUCTION	5
3. MATERIEL ET METHODES.....	8
3.1 Stratégie d'échantillonnage	8
3.2 Traitement des échantillons et analyses moléculaires	10
3.2.1 Extraction d'ADN	11
3.2.2 Amplification, purification et séquençage.....	11
3.2.3 Contrôles qualité	12
3.2.4 Analyses bioinformatiques.....	12
3.3 Analyse des données	13
4. RESULTATS.....	14
4.1 Synthèse du jeu de données ADNe.....	14
4.2 Règne Animalia.....	15
4.2.1 Diversité taxonomique	16
4.3 Intérêt de l'ADNe pour la détection d'espèces invasives	23
5. DISCUSSION	25

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Diagrammes conceptuels illustrant la diversité spécifique visible, cachée, étendue ou « noire » dans le contexte de liste d'espèces présentes sur zones (adapté de Juhel et al., 2022)	5
Figure 2 : Représentation du site d'étude et localisation des stations de suivi « Plancton ».....	8
Figure 3 : illustration du système de filtration portatif employé (source : Argaly).....	9
Figure 4 : Schéma des différentes étapes d'analyse d'ADN environnemental par metabarcoding (schéma : Thierry Comtet, Station Biologique de Roscoff).....	10
Figure 5 : Diversité des MOTUs par niveau taxonomique, en fonction de la méthode de collecte et du marqueur génétique.....	16
Figure 6 : Diagramme de Venn des embranchements animaux détectés en fonction de la méthode et du marqueur génétique.....	16
Figure 7 : Diversité taxonomique (nb de Genres par Classe) détectée selon le type d'analyse produite (Identification morphologique, marqueur moléculaire 18S ou COI)	17
Figure 8 : Diversité taxonomique (nb de Genres par Classe) détectée selon le type d'échantillon analysé (Identification morphologique, bulk ou filtrat)	18
Figure 9 : Illustration de la complémentarité offerte entre des techniques d'identification morphologique (données quantitatives mais peu précise) et d'identification moléculaires (données qualitatives permettant d'atteindre une précision à l'espèce).	19
Figure 10 : Méduse rayonnée ou méduse compas (Chysaora hysoscella ; source : www.inaturalist.org).....	20
Figure 11 : Composition de l'Holoplankton observée en termes de fréquence d'abondance par Classe suivant la méthode d'investigation employée (identification morphologique ou moléculaires). Le calcul des fréquences est basé sur le dénombrement des individus dans le cas de l'identification morphologique et sur le nombre de reads obtenus dans le cas du moléculaire.....	20

Figure 12 : Diagramme de Venn pour les genres de copépodes détectés suivant la méthode d'échantillonnage employée d'une part (à gauche) et d'identification d'autre part (à droite).	22
Figure 13 : Abondance relative des genres de copépodes suivant la méthode d'identification considérée. Les fréquences concernant les données moléculaires sont obtenues en exploitant le nombre de reads.	23
Figure 14 : Résultats d'alignement de la séquence SSU_F04_SSU_R22mod_00014 sur BLASTn	24

Tableaux

Tableau 1 : Informations relatives aux marqueurs utilisés pour l'amplification ADN des échantillons.....	11
Tableau 2 : Informations relatives aux conditions d'amplification pour chaque marqueur	12
Tableau 3 : Caractéristiques générales (nombre de reads et nombre de MOTUs) des jeux de données obtenus par méthode d'échantillonnage (bulk ou filtrat), marqueur (18S ou COI) et campagne(printemps ou automne). .	14
Tableau 4 : Liste des phylums détectés à l'aide des marqueurs 18S et COI en comparaison de ceux identifiés sur la base de reconnaissance de critères morphologiques (toutes saisons confondues).	15
Tableau 5 : Liste des genres et espèces de copépodes détectés par l'identification morphologique et moléculaire.	21

Suivi des communautés zooplanctoniques :

Interêt de l'Intégration des outils d'analyses de type ADN environnemental

Rapport final

1. Contexte

La société Eoliennes en mer Dieppe – Le Tréport (EMDT) a en charge l'installation du parc éolien offshore au large de Dieppe et du Tréport. Dans le cadre de ce projet, réglementairement, un état de référence de l'environnement et des écosystèmes doit être réalisé avant le début de la phase de construction, pour être en mesure d'évaluer ensuite les incidences des phases de travaux et de fonctionnement du parc sur le milieu naturel.

Dans ce sens, des protocoles de suivi sont élaborés pour chaque compartiment écologique considéré. Ces protocoles sont construits à partir d'éléments réglementaires, des connaissances acquises dans le cadre d'études antérieures et de l'état de l'art de la discipline concernée. Ils font l'objet de plusieurs évaluations au travers notamment de l'expertise menée par le Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) Eolien en Mer.

Parmi les protocoles élaborés et qui avait été soumis à l'expertise du GIS, celui portant sur le suivi des communautés zooplanctoniques avait fait l'objet d'une remarque en particulier. Cette remarque indiquait que le protocole actuel pouvait être avantageusement complété par une démarche R&D en intégrant des techniques nouvelles reposant sur une approche moléculaire de type ADN environnemental (ADNe). La société Setec Energie Environnement réalisant le suivi des communautés phyto et zooplanctoniques dans le cadre des suivis environnementaux réglementaires du parc éolien, a alors été chargée par le GIS d'effectuer ces essais en associant la Station Biologique de Roscoff à ce programme.

Un protocole a alors été réfléchi, discuté et adapté pour répondre aux objectifs suivants : i) comparer les méthodes d'identification taxonomiques traditionnelles (critères morphologiques) aux outils moléculaires (*metabarcoding*) et ii) mesurer l'apport de ces techniques suivant que les échantillons analysés soient des échantillons de plancton (*bulk*) ou des échantillons d'eau de mer (filtrat). Deux campagnes d'échantillonnage au printemps et en fin d'été/début d'automne 2022 sont programmées dans ce cadre, toutes les deux concomitantes avec les campagnes réglementaires menées parallèlement.

Ce rapport vise à présenter a) un état des connaissances actuelles sur les outils moléculaires utilisés pour la description des communautés zooplanctoniques, b) le protocole appliqué dans cette étude ainsi que les deux campagnes réalisées et c) l'analyse des données acquises grâce aux différentes approches.

2. Introduction

En complément des méthodes classiques d'inventaire qui peuvent être sélectives et conduire à des estimations biaisées de la biodiversité (Costello et al., 2017¹), les approches de génétique environnementale reposant sur des études de l'ADN environnemental (ADNe, ADN contenu dans un échantillon environnemental, d'eau de mer, d'air ou de sol par exemple) ont, quant à elles, montré leur capacité à détecter avec précision la présence d'un large éventail d'espèces dans l'environnement marin (Boussarie et al., 2018² ; Jung et al., 2022³), complétant voire surpassant de nombreuses techniques classiques d'inventaire. Par exemple, les petites espèces, les espèces cryptobenthiques, les espèces rares ou les espèces profondes sont le plus souvent manquées car elles ne peuvent pas être correctement échantillonnées alors qu'elles restent bien identifiées via les outils moléculaires (Fediajevaite et al., 2021⁴ ; Polanco Fernandez et al., 2021⁵, Muff et al., 2023⁶), ce qui permet de révéler des espèces connues mais non observables par des méthodes traditionnelles, voire de révéler des espèces inconnues sur les zones d'échantillonnage (Juhel et al., 2022⁷).

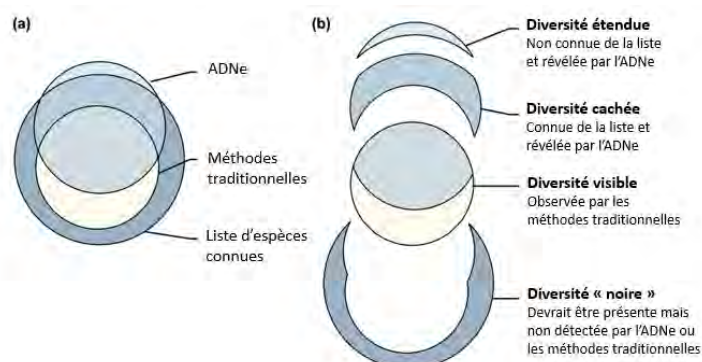


Figure 1 : Diagrammes conceptuels illustrant la diversité spécifique visible, cachée, étendue ou « noire » dans le contexte de liste d'espèces présentes sur zones (adapté de Juhel et al., 2022)

Cependant, le caractère révolutionnaire et les développements rapides de cette nouvelle technologie restreignent sa mise en œuvre parce qu'il n'existe encore aucun standard ou protocole référence,

- ¹ Costello, M. J., Basher, Z., McLeod, L., Asaad, I., Claus, S., Vandepitte, L., Yasuhara, M., Gislason, H., Edwards, M., Appeltans, Enevoldsen, H., Edgar, G. J., Miloslavich, P., De Monte, S., Sousa Pinto, I., Obura, D., Bates, A. E. (2017). Methods for the study of Marine Biodiversity. In: *The GEO Handbook on Biodiversity Observation Networks*.
- ² Boussarie, G., Bakker, J., Wangensteen, O.S., Mariani, S., Bonnin, L., Juhel, J.-B., Kiszka, J.J., Kulbicki, M., Manel, S., Robbins, W.D., Vigliola, L., Mouillot, D. (2018). Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks. *Sci. Adv.* 4, eaap9661.
- ³ Jung J.-L. et al. (2022) Rapport au Parc Naturel Marin de Martinique et au Sanctuaire AGOA Office Français de la Biodiversité - Expédition scientifique dans la Zone Économique Exclusive de la Martinique organisée par le Parc Naturel Marin de Martinique et le Sanctuaire Agoa. Volet : Détection de mammifères marins, de poissons osseux et d'élasmobranches par analyse d'ADN environnemental (ADNe) dans des prélèvements d'eau de mer. Version du 27 janvier 2022
- ⁴ Fediajevaite, J., Priestley, V., Arnold, R., Savolainen, V., (2021). Meta-analysis shows that environmental DNA outperforms traditional surveys, but warrants better reporting standards. *Ecol. Evol.* 11, 4803–4815
- ⁵ Polanco Fernandez, A., Marques, V., Fopp, F., Juhel, J., Borrero-Pérez, G.H., Cheutin, M., Dejean, T., González Corredor, J.D., Acosta-Chaparro, A., Hocdé, R., Eme, D., Maire, E., Spescha, M., Valentini, A., Manel, S., Mouillot, D., Albouy, C., Pellissier, L., (2021). Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes. *Environ. DNA* 3, 142–156
- ⁶ Muff, M., Jaquier, M., Marques, V., Ballesta, L., Deter, J., Bockel, T., Hocdé, R., Juhel, J.-B., Boulanger, E., Guellati, N., Fernández, A. P., Valentini, A., Dejean, T., Manel, S., Albouy, C., Durville, P., Mouillot, D., Holon, F., & Pellissier, L. (2023). Environmental DNA highlights fish biodiversity in mesophotic ecosystems. *Environmental DNA*, 5, 56– 72.
- ⁷ Juhel, J.-B., Marques, V., Utama, R.S., Vimono, I.B., Sugheha, H.Y., Kadarusman, K., Cochet, C., Dejean, T., Hoey, A., Mouillot, D., Hocdé, R. and Pouyaud, L. (2022). Estimating the extended and hidden species diversity from environmental DNA in hyper-diverse regions. *Ecography*, 2022: e06299.

parce que la recherche académique continue de s'adapter à cet outil et à ses capacités et parce que sa répliquabilité demeure limitée.

Analysé à l'aide d'une approche de type *metabarcoding*, l'ADNe apparaît comme prometteur et puissant pour étudier la diversité spécifique voire infra-spécifique d'un écosystème, détecter la présence d'espèces rares, ou encore identifier des espèces cryptiques difficiles à déceler sur la seule base de critères morphologiques. Le *metabarcoding* fait référence à l'identification automatisée de plusieurs espèces provenant d'un même échantillon (Taberlet et al., 2012⁸). Une fois extrait, l'ADN de l'échantillon est amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) puis chacune des copies est ensuite séquencée afin d'obtenir l'ensemble de la diversité des séquences de l'échantillon. Les séquences présentant un degré de similarité suffisant sont regroupées et l'assignation permet enfin de faire correspondre une espèce à chaque unité détectées (Villar et al., 2015⁹). Un « barre-code » intéressant pour une étude de *metabarcoding* moléculaire doit (i) correspondre à une portion de gènes quasi identiques au sein des individus de la même espèce, mais différer entre espèces (ii) être utilisable pour toutes les espèces considérées dans l'étude ; (iii) permettre l'assignation taxonomique et ce, à différents niveaux taxonomiques (Dardel & Képès, 2002¹⁰).

Ses atouts positionnent aujourd'hui l'ADNe couplé au *metabarcoding* comme un outil complémentaire dans les stratégies d'observation et de suivi des écosystèmes. Les approches moléculaires sont aujourd'hui en plein essor, et parallèlement à l'intérêt croissant de la communauté scientifique, elles commencent à être intégrées dans de nombreuses stratégies d'observation et de suivi (e.g. Cordier et al. 2021¹¹ ; Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2021¹²). Il est attendu un développement important et une montée en puissance de ces outils innovants, qui ouvrent de nouvelles voies pour le suivi de la biodiversité (e.g. Mächler et al., 2021¹³). Outre sa sensibilité aux biais d'échantillonnage (e.g. contamination) ou à la spécificité de l'amorce sélectionnée (e.g. faux positifs), ses limites actuelles reposent principalement sur la couverture taxonomique que proposent les bases de référence de séquences génétiques, sur lesquelles l'étape d'assignation repose nécessairement (McElroy et al. 2020¹⁴). Dans le cas d'une sous-représentation du groupe taxonomique étudié ou suivant la singularité du marqueur génétique employé, cela peut exclure toute ambition d'analyse exhaustive de la diversité par assignation aux espèces à court et moyen terme. La réelle diversité récupérée sur les filtres ADNe n'étant alors dans ce cas que partiellement révélée en raison des bases de références encore lacunaires. A l'inverse, son avantage réside dans le fait qu'il reste malgré tout possible de construire un pipeline bio-informatique pour générer une estimation de la diversité au travers le regroupement d'unités taxonomiques moléculaires (MOTUs, pour *molecular operational taxonomic units*). Et ainsi,

⁸ Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C & Willerslev E. (2012). Towards next generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding, *Molecular Ecology*, 21, 2045–2050.

⁹ Villar E. et al. (2015) Environmental characteristics of Agulhas rings affect interocean plankton transport. *Science* DOI:10.1126/science.1261447

¹⁰ Dardel F. & Képès F. (2002) Bioinformatique : génomique et post-génomique, Éditions de l'École Polytechnique 153-180 p.

¹¹ Cordier, T, Alonso-Sáez, L, Apothéloz-Perret-Gentil, L, et al. (2021) Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: a review of current strategies with an implementation roadmap. *Mol. Ecol.* 30:2937-2958.

¹² Apothéloz-Perret-Gentil, L, Bouchez, A, Cordier, T, et al. (2021) Monitoring the ecological status of rivers with diatom eDNA metabarcoding: a comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Mol. Ecol.* 30:2959-2968.

¹³ Mächler, E, Walser, J-C, Altermatt, F (2021) Decision-making and best practices for taxonomy-free environmental DNA metabarcoding in biomonitoring using Hill numbers. *Mol Ecol* 30:3326-3339.

¹⁴ McElroy, M. E. et al. (2020). Calibrating Environmental DNA Metabarcoding to Conventional Surveys for Measuring Fish Species Richness. - *Front. Ecol. Evol.* 8: 1–12.

même en absence d'identification spécifique, d'être en mesure de tracer et de suivre spatialement et temporellement une communauté, un peuplement, (...) et cela au travers des trois facettes de la diversité : taxonomique, fonctionnelle et phylogénétique (e.g. Marques et al., 2021¹⁵).

Tester cet outil dès le démarrage du programme de suivi offre ainsi non seulement l'amorce d'une série temporelle mais aussi la possibilité de bénéficier au cours du projet éolien des avancées scientifiques ultérieures (i.e. possibilité de revenir sur les échantillons passés d'ADN pour nouvelles analyses, compléter l'assignation des séquences, ...). Notons enfin, que malgré ses atouts, l'approche moléculaire doit également rester indissociable de l'expertise taxonomique pour aboutir *in fine* à un outil de bio-indication de qualité.

En incluant l'ADNe aux protocoles de suivi classiques, l'objectif était donc double :

1/ tester l'outil, depuis la phase terrain (i.e. faisabilité, gestion du risque de contamination), jusqu'à la phase d'analyse et de restitution des résultats (i.e. chaîne de traitements, production d'indices, etc.)

2/ offrir au programme de suivi environnemental en place une démarche exploratoire permettant non seulement de s'appuyer sur les avancées technologiques actuelles et futures mais aussi d'acquérir une information complémentaire de celle collectée parallèlement *via* les techniques d'échantillonnage traditionnelle (détermination des espèces sur la base de la reconnaissance de critères morphologiques).

¹⁵ Marques, V., Castagné, P., Polanco, A., Borrero-Pérez, G. H., Hocdé, R., Guérin, P. É., ... & Villéger, S. (2021). Use of environmental DNA in assessment of fish functional and phylogenetic diversity. *Conservation Biology*, 35(6), 1944-1956.

3. Matériel et méthodes

3.1 Stratégie d'échantillonnage

L'échantillonnage de l'ADNe a été mené de façon simultanée avec celui prévu dans le cadre de la fiche protocole E9 pour l'ichtyoplancton : deux campagnes annuelles, au printemps puis en fin d'été. L'effort de prélèvement visait les 5 mêmes stations, réparties le long d'un gradient côte/large, dans (x1) et au dehors (x4) de la zone d'implantation du parc éolien (cf. Figure 2).

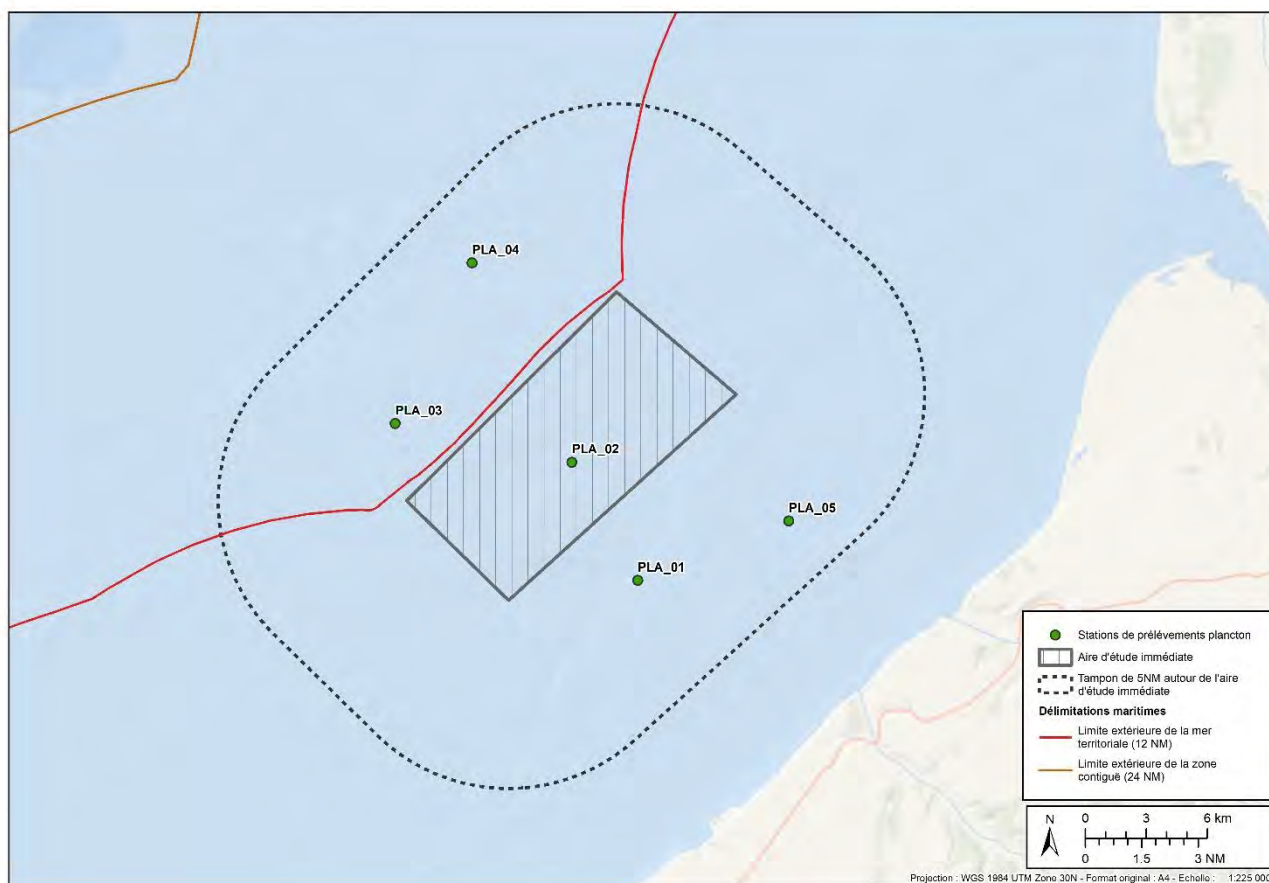


Figure 2 : Représentation du site d'étude et localisation des stations de suivi « Plancton ».

Deux moyens de prélèvements ont été mis en œuvre :

- Un Filet WP2 de vide de maille 200 μ m, *via* un échantillonnage vertical fond-surface de la masse d'eau au droit du point de suivi. Les échantillons (*bulk*) étaient alors fixés à l'éthanol 96% et conservés à 4°C pour stopper la dégradation de l'ADN jusqu'à livraison au laboratoire en charge des analyses.
- Une bouteille de prélèvement d'eau de type Niskin (5L), déployées en subsurface (1 à 3 m sous la surface). Les échantillons d'eau ont ici été stockés à bord du navire dans des contenants dédiés (jerricans). De retour à terre, l'eau de mer a ensuite été filtrée sur des capsules de type Waterra® 0.2 μ m puis un tampon de fixation (tampon longmire) a été ajouté pour stopper la dégradation de l'ADN et permettre la conservation du filtrat dans de bonnes conditions. Le volume d'eau filtré à chaque station a été compris entre 30 et 50 L suivant la turbidité et la

vitesse de colmatage de la membrane. Deux échantillons (réplicats) ont été prélevés à chaque station.

Un objectif de 15 échantillons (*i.e.* 1 *bulk* et 2 filtrats par station, 5 stations de suivi) était ainsi visé lors de chaque campagne.

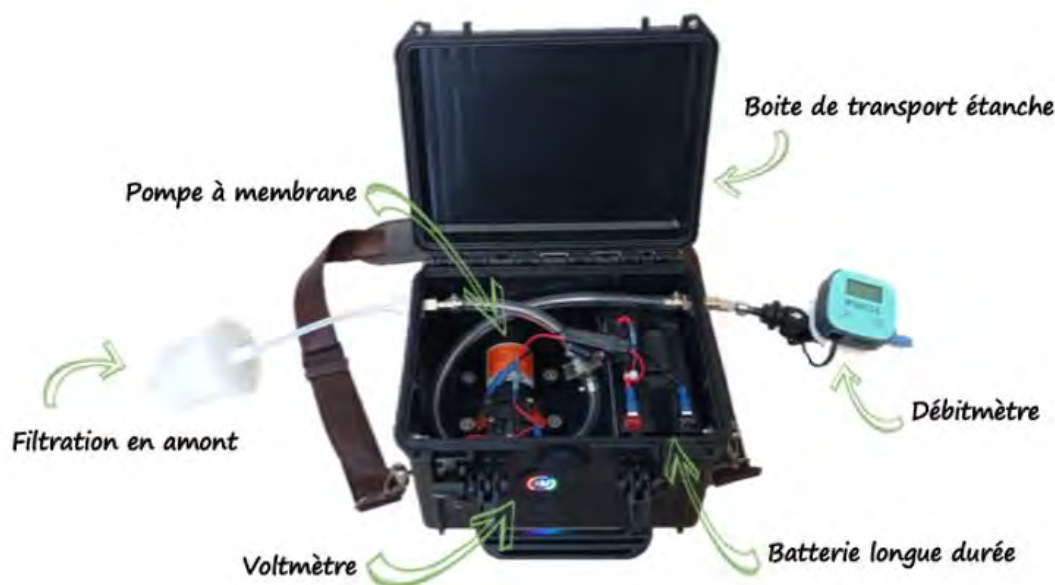


Figure 3 : illustration du système de filtration portatif employé (source : Argaly).

L'utilisation de ces deux moyens de prélèvement a été motivée par le fait qu'ils offrent l'un et l'autre la possibilité de traiter des questions complémentaires. Les échantillons « WP2 » doivent permettre de comparer efficacement les deux méthodes d'identification mises en œuvre (morphologiques vs ADN-*metabarcoding*) puisque les résultats seront produits à partir d'échantillons similaires. Les échantillons « Niskin » quant à eux, doivent permettre de tester réellement la puissance de l'outil moléculaire à partir d'échantillons d'eau uniquement (ADN environnemental *stricto sensu*). A noter que dans ce dernier cas, l'ADNe offre l'opportunité de détecter également les protistes (dont le phytoplancton).

La première campagne d'échantillonnage a été réalisée le 12 juin 2022 sur le *Celtic Wind* (société STO logistique). Cette campagne d'échantillonnage était initialement planifiée au cours du mois de mai, lors des plus bas coefficients de marée, mais plusieurs reports successifs se sont produits en raison de conditions météo-océaniques défavorables (05 au 12 mai puis du 22 au 28 mai), de l'indisponibilité du navire (30 mai au 03 juin) et des conditions météo défavorables (04 au 10 juin).

La seconde campagne d'échantillonnage a été réalisée le 18 septembre 2023 dans le respect du planning théorique.

Pour ces deux campagnes, le plan d'échantillonnage a été respecté, et permis l'échantillonnage d'1 *bulk* et de 2 filtrats par station, soit un volume total de 30 échantillons.

3.2 Traitement des échantillons et analyses moléculaires

L'objectif principal étant de décrire la diversité taxonomique de la communauté zooplanctonique, une approche de *metabarcoding* est suivie. Celle-ci constitue une extension du *barcoding* (identification d'un organisme à partir d'une séquence ADN, le plus souvent le gène COI), en permettant l'identification d'un ensemble de taxa présents en mélange dans un échantillon à partir du séquençage d'un ou plusieurs marqueurs moléculaires (amplicons) amplifiés à partir de tous les ADN présents dans l'échantillon (voir par ex. Taberlet et al. 2012¹⁶, Cristescu 2014¹⁷). Ceci est permis par les techniques de séquençage très haut-débit disponibles actuellement.

Après extraction de l'ADN selon des protocoles standards, deux marqueurs ont été amplifiés par PCR. Cette approche multi-marqueurs, couramment utilisée (e.g. Ficetola et al. 2021¹⁸), permet d'éviter des biais taxonomiques de l'amplification (non-amplification de certains taxons en raison par exemple de mutations sur la zone de fixation des amorces de PCR) tout en apportant des données complémentaires. Dans le cadre de ce projet, nous avons ciblé les marqueurs 18S (qui permet plutôt l'assignation à des taxa de niveau élevé, notamment familles) et selon les taxons COI (qui permet l'identification spécifique), à l'aide d'amorces « semi-universelles » classiquement utilisées dans ce type d'étude. Les amplicons obtenus ont ensuite été séquencés par séquençage Illumina. Les séquences obtenues ont ensuite été traitées à l'aide d'une chaîne de traitements bio-informatiques éprouvée (entreprise Argaly).

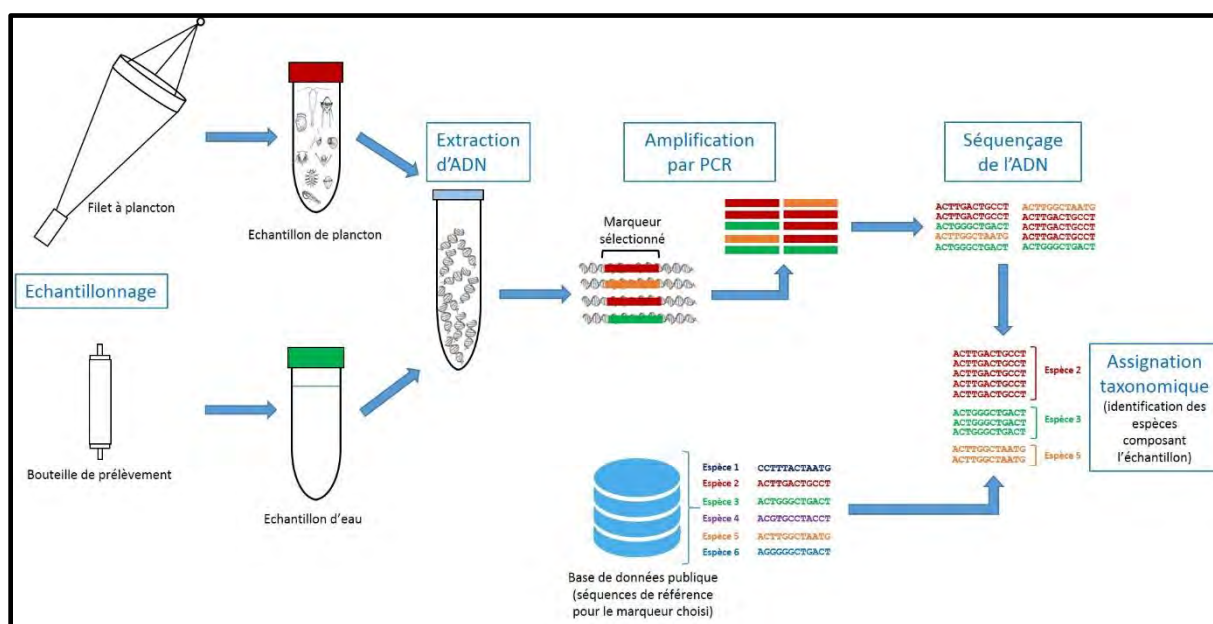


Figure 4 : Schéma des différentes étapes d'analyse d'ADN environnemental par metabarcoding (schéma : Thierry Comtet, Station Biologique de Roscoff).

L'étape ultime a été l'assignation taxonomique des séquences par comparaison à des séquences de référence. Cette étape est cruciale et la qualité de la base de données de référence conditionne toujours la qualité des données produites. Pour cette étape nous sommes appuyés sur (1) des bases

¹⁶ Taberlet P., Pompanon F., Coissac E. et al. (2012) Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21:2045–2050.

¹⁷ Cristescu M.E. (2014) From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends Ecol. Evol.* 29:566–571.

¹⁸ Ficetola G.F., Boyer F., Valentini A. et al. (2021) Comparison of markers for the monitoring of freshwater benthic biodiversity through DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 30:3189–3202.

de données existantes et dédiées, telles que la base publique *MetaZooGene Barcode Atlas and Database* (MZGdb), dédiée au zooplancton et contenant à ce jour 150 000 séquences COI appartenant à 5 600 espèces décrites de plancton métazoaire (holo- et méroplancton) (Bucklin et al. 2021¹⁹), et (2) sur l'expertise taxonomique de Thierry Comtet, chercheur à la station biologique de Roscoff, spécialiste du méroplancton.

Les étapes de séquençage et d'analyses bio-informatiques ont été réalisées à l'issue de la seconde campagne d'échantillonnage par l'entreprise Argaly et sont décrites comme suit.

3.2.1 Extraction d'ADN

L'ADN des 20 filtrations a été extrait en suivant le protocole *NucleoSpin eDNA Water* (Macherey Nagel) avec les modifications suivantes : les filtres ont d'abord été agités vigoureusement et horizontalement pendant deux minutes pour permettre à l'ADN d'être remis en suspension dans le tampon de conservation. Les filtrats ont été transférés en tubes 50mL pour être centrifugés 1h à 12000g. L'extraction s'est ensuite poursuivie selon le protocole du fabricant.

L'ADN des 10 échantillons de *bulk* de zooplancton a été extrait en suivant le protocole *NucleoSpin Tissue* (Macherey Nagel) selon le protocole du fabricant.

3.2.2 Amplification, purification et séquençage

Deux marqueurs ont été choisis pour l'amplification des ADNs issus des échantillons : le 18S et le COI.

Tableau 1 : Informations relatives aux marqueurs utilisés pour l'amplification ADN des échantillons

Locus	Nom amorces	Séquence 5' – 3'	Taille de l'amplicon	Référence
18S_Fonseca (V1-V2)	SSU_FO4 SSU_R22mod	GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC CCTGCTGCCTTCCTTRGA	350-450 pb	Blaxter et al, 1998 ²⁰ Sinniger et al, 2016 ²¹
COI_Leray	mlCOIintF jgHCO2198	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA	313 pb	Leray et al, 2013 ²² Geller et al, 2013 ²³

Le nombre de cycles optimal et la dilution optimale ont d'abord été testés par qPCR. Les conditions d'amplification utilisées sont décrites dans le tableau ci-dessous.

Chaque ADN a été amplifié en huit répliques et chaque réplique PCR a été identifiée de manière unique par une combinaison de deux tags de huit bases accolées en 5' à chaque amorce de PCR. Ces tags servent à assigner les séquences au réplique correspondant pendant l'analyse bioinformatique. Après amplification, tous les échantillons ont été purifiés avec le kit de purification MinElute (Qiagen GmbH).

¹⁹ Bucklin, A, Peijnenburg, KTCA, Kosobokova, KN, et al. (2021) Toward a global reference database of COI barcodes for marine zooplankton. *Mar Biol* 168:78.

²⁰ Blaxter, M., De Ley, P., Garey, J. et al. (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71–75.

²¹ Sinniger F., Pawlowski J., Harii S., Gooday A.J., Yamamoto H., Chevallon P., Cedhagen T., Carvalho G. et Creer S. (2016) Worldwide Analysis of Sedimentary DNA Reveals Major Gaps in Taxonomic Knowledge of Deep-Sea Benthos. *Front. Mar. Sci.* 3:92.

²² Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P. et al. (2013) A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front. Zool.* 10, 34.

²³ Geller J., Meyer C., Parker M., Hawk H. (2013) Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular ecology resources*, 13(5), 851-861.

La construction des librairies ainsi que le séquençage ont ensuite été effectués par la société FASTERIS (Genève, Suisse). Les librairies de séquençage ont été préparées suivant le protocole Metafast destiné à limiter les artéfacts de séquençage.

Les librairies ont ensuite été séquencées dans un *run* Illumina MiSeq avec des lectures *paired-end* de 2x250bp)

Tableau 2 : Informations relatives aux conditions d'amplification pour chaque marqueur

Marqueur	Nombre de cycles PCR	Dilution des ADNs extraits selon le type d'échantillon	Température d'hybridation
18S_Fonseca (V1-V2)	44 (eau)	1/2 (eau)	54°C
COI_Leray	50 (<i>bulk</i>)	1/10 (<i>bulk</i>)	48°C

3.2.3 Contrôles qualité

Différents contrôles ont été réalisés à chaque étape du protocole pour détecter les éventuelles contaminations et permettre une meilleure interprétation des résultats : deux contrôles négatifs d'extraction, un contrôle négatif PCR et 48 contrôles bioinformatiques. Le succès des amplifications et des purifications a été vérifié sur gel d'agarose à 2% (E-Gel Power Snap, Invitrogen®).

3.2.4 Analyses bioinformatiques

3.2.4.1 Analyse des séquences

Les données brutes issues du séquençage ont été analysées avec la suite de programmes OBITools (Boyer et al. 2016²⁴) spécialement dédiée au traitement de données de *metabarcoding*. Pour chaque marqueur, les séquences *paired-end* ont d'abord été assemblées avec le programme *illumina-paired-end*, et seules les séquences avec un score d'alignement supérieur à 40 ont été conservées. Ce score correspond à un chevauchement exact de 10 bases. Les séquences alignées ont ensuite été assignées au réplica PCR correspondant à l'aide du programme *ngsfilter*, en autorisant deux *mismatches* au plus par amorce PCR, et aucun *mismatch* sur les tags. Les séquences ont été dérépliquées grâce à *obiuniq*, puis celles contenant des nucléotides indéterminés, celles dont la longueur n'appartenait pas à l'intervalle attendu (< 106bp pour le marqueur 18S et < 103bp pour le marqueur COI), et celles observées une seule fois dans le jeu de données ont été éliminées. Sur les séquences restantes, un clustering à 97% a été réalisé à l'aide du programme *SumaClust* (Mercier et al. 2013²⁵) afin d'obtenir des *Molecular Operational Taxonomic Units* (MOTUs). La séquence la plus abondante au sein d'un cluster a été choisie comme représentante du cluster. Seuls les MOTUs observés au moins dix fois dans au moins un réplica PCR ont été conservés pour le reste des analyses.

Le programme *ecotag* des OBITools a été utilisé pour procéder à l'assignation taxonomique des MOTUs. Ce programme compare chaque MOTU à une base de référence de séquences de metabarcodes complets construite à partir de la base de séquences publiques GenBank (version 249) grâce au programme *ecoPCR* (Ficetola et al. 2010²⁶). Plus spécifiquement, *ecoPCR* effectue une PCR *in silico* sur les séquences de GenBank à l'aide des amorces associées au marqueur d'intérêt, et en

²⁴ Boyer F., Mercier C., Bonin A. et al. (2016) OBITools: a Unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16, 176–182.

²⁵ Mercier C., Boyer F., Kopylova E., Taberlet P., Bonin A., Coissac E. (2013) SUMATRA and SUMACLUSt: Fast and exact comparison and clustering of sequences. *Programs and Abstracts of the SeqBio 2013 Workshop*, 27–29.

²⁶ Ficetola GF, Coissac E, Zundel S, et al. (2010) An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11, 434.

autorisant au plus trois *mismatches* par amorce. Les séquences obtenues ont ensuite été filtrées pour ne conserver que les séquences possédant une assignation à la famille, au genre et à l'espèce.

3.2.4.2 Filtrage des données

Après assignation taxonomique, un filtrage supplémentaire des données a été conduit dans R (R Core Team, 2020²⁷) avec le package *metabar* (Zinger et al. 2021²⁸), afin d'éliminer les séquences artéfactuelles ou contaminantes fréquentes dans les jeux de données de *metabarcoding*, et qui peuvent biaiser les conclusions écologiques basées sur de telles données (Calderón-Sanou et al. 2020²⁹).

Ainsi, les MOTUs avec une identité de séquence < 90% (marqueur 18S) ou < 70% (marqueur COI) avec n'importe quelle séquence de la base de référence ont été exclus, car ce sont vraisemblablement des chimères de séquences. De même, les MOTUs dont l'abondance est maximale dans au moins un réplica de contrôle négatif ont également été supprimés (méthode « max » de la fonction *contaslayer*), car ce sont des contaminants externes. D'autre part, si l'abondance relative d'un MOTU au sein d'un réplicat PCR était inférieure à 0,03% de son abondance totale sur le jeu de données, l'abondance au sein du réplica PCR a été réduite à 0 (méthode « cut » de la fonction *tagjumslayer*), afin de limiter les artéfacts générés au moment de la fabrication de la librairie de séquençage (i.e. « tag jumps »). Les réplicas PCR avec une couverture de séquence inférieure à 500 séquences ont été supprimés, puis les réplicas restants appartenant au même échantillon ont été agrégés en utilisant la fonction *aggregate_pcrs*. Enfin, l'abondance des MOTUs présents avec moins de 10 séquences dans un échantillon a été réduite à 0.

3.2.4.3 Post-traitement interne

Une vérification des assignations des MOTUs a été réalisée manuellement. Cette vérification de qualification a été réalisée avec l'outil BLASTn sur la base des séquences nucléotidiques. En fonction des résultats fournis par le matching (pourcentage de correspondance, origine de la séquence, etc.), une modification ou suppression des assignations a été réalisée.

3.3 Analyse des données

Les données de sortie de ces analyses moléculaires sont avant tout qualitatives. Chaque échantillon est traduit *in fine* par une liste d'espèces ou de groupes en présence. L'abondance, absolue ou relative, de séquences lues (nombre de *reads* par MOTUs) peut également être exploitée pour déterminer la capacité de détection des différents groupes taxonomiques en fonction de la méthode ou du marqueur utilisé. Néanmoins, cette donnée doit être utilisée avec précaution, elle ne constitue pas un indicateur de l'abondance réelle des taxons dans le milieu.

²⁷ R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

²⁸ Zinger L, Lionnet C, Benoiston AS, Donald J, Mercier C, Boyer F (2021) metabar: an R package for the evaluation and improvement of DNA metabarcoding data quality. *Methods in Ecology and Evolution*, 12, 586–592.

²⁹ Calderón-Sanou I, Münkemüller T, Boyer F, Zinger L, Thuiller W (2020) From environmental DNA sequences to ecological conclusions: How strong is the influence of methodological choices? *Journal of Biogeography*, 47, 193–206.

4. Résultats

4.1 Synthèse du jeu de données ADNe

Le tableau ci-dessous résume le nombre de séquences avant et après filtrage et le nombre de MOTUs et de taxons différents détectés par chaque marqueur. On remarque que pour le marqueur 18S, une proportion plus importante de séquences est conservée après filtrage que pour le marqueur COI. De même, même si le marqueur 18S détecte deux fois moins de MOTUs que le marqueur COI, il détecte légèrement plus de taxons différents (nb : un même taxon peut être associé à plusieurs MOTUs).

Marqueur	Nombre de séquences brutes	Nombre de séquences après filtrage	Nombre de MOTUs	Nombre de taxons
18S	2 785 012	1 747 307	290	200
COI	3 271 924	1 408 265	598	187

Le nombre de séquences lues (appelées *reads*) ainsi que le nombre de MOTUs (nombre d'unités moléculaires taxonomiques opérationnelles) apportent une première visualisation des résultats d'analyses et de la somme d'informations potentiellement apportées par les données moléculaires (Figure 3).

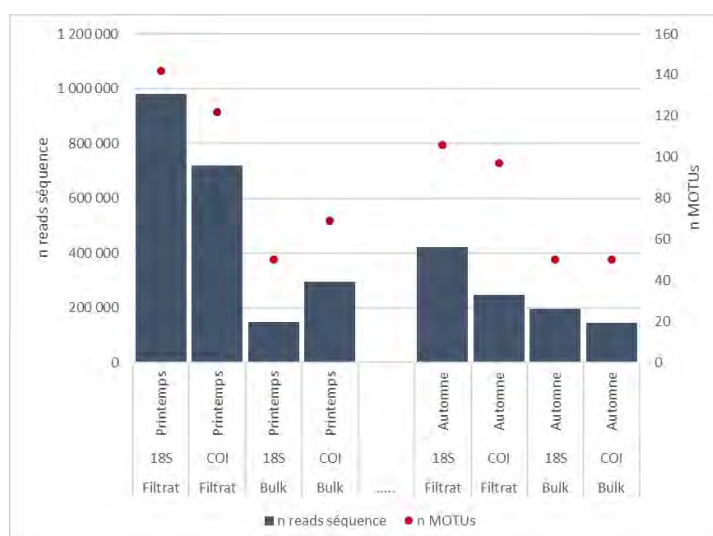


Figure 3 : Caractéristiques générales (nombre de reads et nombre de MOTUs) des jeux de données obtenus par méthode d'échantillonnage (bulk ou filtrat), marqueur (18S ou COI) et campagne (printemps ou automne).

L'analyse des échantillons génétiques collectés a permis la lecture de plus de 3 millions de séquences. Cette quantité varie en fonction de la méthode d'échantillonnage (*bulk* ou filtration d'eau de mer), du marqueur génétique utilisé (18S ou COI), et de la saison d'échantillonnage. Le maximum (toutes stations et répliques cumulés) a été observé pour la filtration d'eau de mer avec le marqueur 18S au printemps, avec près d'un million de *reads* de séquences, et le minimum pour le *bulk* sur le marqueur COI à l'automne. De manière générale, le nombre de *reads* de séquences est plus important : i) au printemps qu'en automne, ii) avec le marqueur 18S qu'avec le marqueur COI, et iii) avec la méthode des filtrats que du *bulk*. Il est à noter que la méthode de filtration d'eau de mer a été réalisée à raison de 2 répliques par station, contre un seul pour le *bulk*.

Le nombre de MOTUs détecté est systématiquement plus important pour les filtrats d'eau de mer que pour le *bulk*. Ceci s'explique probablement par le fait qu'un échantillonnage au WP2 induit une

sélection des organismes captés alors que les échantillons d'eau captent une diversité d'organismes plus grande.

A noter que le nombre de séquences amplifiées avec le COI mais non assignées est de 377 591 *reads*, soit 26,8%. Pour les séquences amplifiées avec le marqueur 18S, ce nombre est plus réduit (112 485 *reads*) et ne représente que 6,4%. Ce score est anormalement élevé dans le cas du marqueur COI. Le marqueur COI est couramment utilisé pour le *barcoding* et le *métabarcoding* en raison de l'abondance et de l'omniprésence du gène dans le vivant, en particulier chez les animaux. Parce qu'il permet de couvrir un large spectre du vivant et que le marqueur employé (COI-Leray) est commun, il était non seulement attendu une meilleure score assignation mais également une diversité (nb de MOTUs) plus importante qu'avec le marqueur 18S. Une erreur dans la chaîne de traitement bio-informatique est vraisemblable, sans que celle-ci n'ait été encore aujourd'hui comprise.

Enfin, le tableau suivant, en listant les phylums détectés grâce aux analyses moléculaires et en les comparant à ceux identifiés par reconnaissance de critères morphologiques, illustre rapidement l'atout présumé de ces nouvelles analyses.

Tableau 4 : Liste des phylums détectés à l'aide des marqueurs 18S et COI en comparaison de ceux identifiés sur la base de reconnaissance de critères morphologiques (toutes saisons confondues).

Phylum	18S	COI	Morpho
Annelida	x	x	x
Arthropoda	x	x	x
Bryozoa	x	x	x
Chaetognatha	x	x	x
Chordata	x	x	x
Cnidaria	x	x	x
Ctenophora	x	x	x
Echinodermata	x	x	x
Mollusca	x	x	x
Nemertea	x	x	x
Phoronida	x	x	x
Platyhelminthes	x	x	x
Bacillariophyta	x	x	
Chlorophyta	x	x	
Gastrotricha	x	x	
Haptophyta	x	x	
Imbricatea	x	x	
Rotifera	x	x	
Cercozoa	x		
Ciliophora	x		
Nematoda	x		
Picozoa	x		
Bacteroidetes		x	
Proteobacteria		x	
Rhodophyta		x	

Celles-ci permettent de couvrir un spectre beaucoup plus large d'espèces au sein des échantillons. Les diatomées, les algues vertes et rouges, les bactéries, etc. sont autant de groupes taxonomiques qui viennent compléter la liste des groupes taxonomiques qui avaient été identifiés par les méthodes traditionnelles.

4.2 Règne Animalia

Pour la partie suivante, un filtrage des MOTUs a été effectué pour ne conserver que ceux du règne animal.

4.2.1 Diversité taxonomique

La diversité taxonomique révélée par le *métabarcoding* est comprise entre 55 et 70 taxons suivant la méthode d'échantillonnage et le marqueur sélectionné. La majorité des taxons est assignée au niveau de l'espèce. Cette diversité est comparable (même ordre de grandeur) à celle observée par l'analyse sur critères morphologiques, si ce n'est que cette dernière offre moins de précision quant au niveau d'assignation (50% des espèces sont assignées au niveau du genre ou de l'espèce). C'est notamment le cas des crustacés ou des échinodermes qui sont observés au stade de larves dans la colonne d'eau et ne peuvent être déterminés avec davantage de précision.

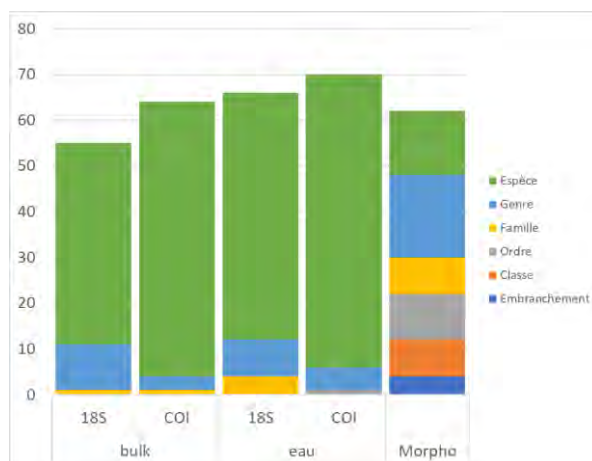


Figure 5 : Diversité des MOTUs par niveau taxonomique, en fonction de la méthode de collecte et du marqueur génétique

La capacité de détection des embranchements animaux par les différents marqueurs et méthodes est synthétisée dans les diagrammes de Venn suivants.

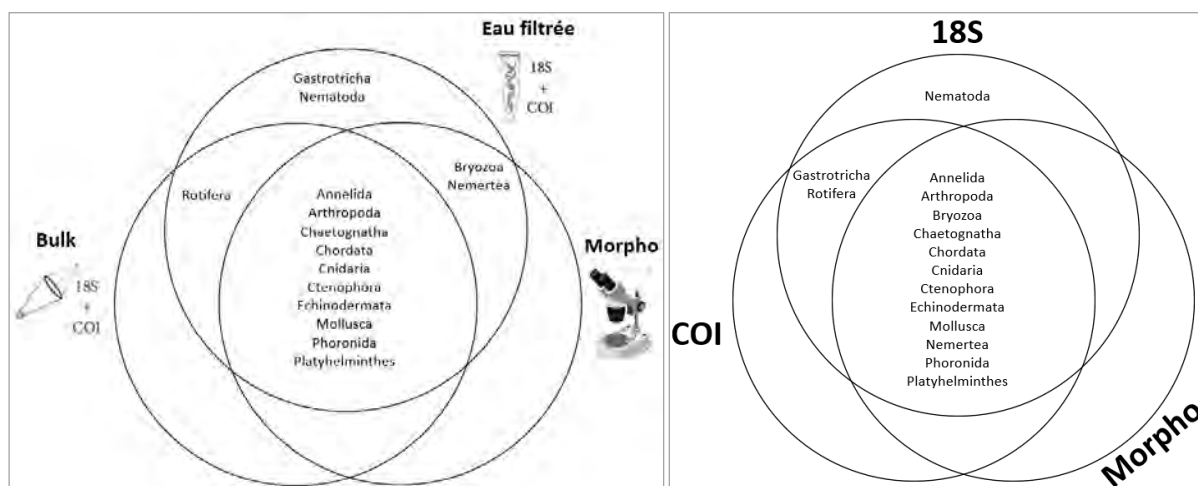


Figure 6 : Diagramme de Venn des embranchements animaux détectés en fonction de la méthode et du marqueur génétique

La capacité de détection des embranchements animaux est de manière générale très bonne, avec un *overlap* important des méthodes ou du marqueur génétique utilisé. Sur les 15 embranchements détectés au total, seuls cinq sont incomplètement détectés. Les rotifères ne sont pas observés par l'analyse morphologique classique, ce qui pourrait s'expliquer par leur petite taille et leur capturabilité faible avec l'engin d'échantillonnage utilisé. De la même manière, divers embranchements de vers sont incomplètement détectés : gastrotriches et nématodes non détectés par l'analyse morphologique classique et le séquençage du *bulk*, némerthes non détectés par le *bulk*. Cela pourrait être la

conséquence de leur très petite taille et de leur écologie benthique, avec parfois une seule phase larvaire pélagique. Enfin, pour les mêmes raisons citées ci-dessus (organismes benthiques, avec une potentielle phase larvaire pélagique de petite taille), les bryozoaires ne sont pas détectés lors du séquençage du *bulk*.

Les graphiques ci-dessous présentent la diversité observée au rang taxonomique du genre détectée selon le type de marqueur analysé (COI, 18S ; Figure 7) ou le type d'échantillons (Filtrat, Bulk ; Figure 8), comparée avec les résultats obtenus par l'analyse basée sur la reconnaissance de critères morphologiques.

On constate par ailleurs que l'analyse moléculaire, quel que soit le marqueur, offre une meilleure détection de nombreux genres au sein de classes détectées mais qui restent peu renseignées par l'identification morphologique : Polychaeta, Malacostrata, Teleostei, Bivalvia et Gastropoda en particulier.

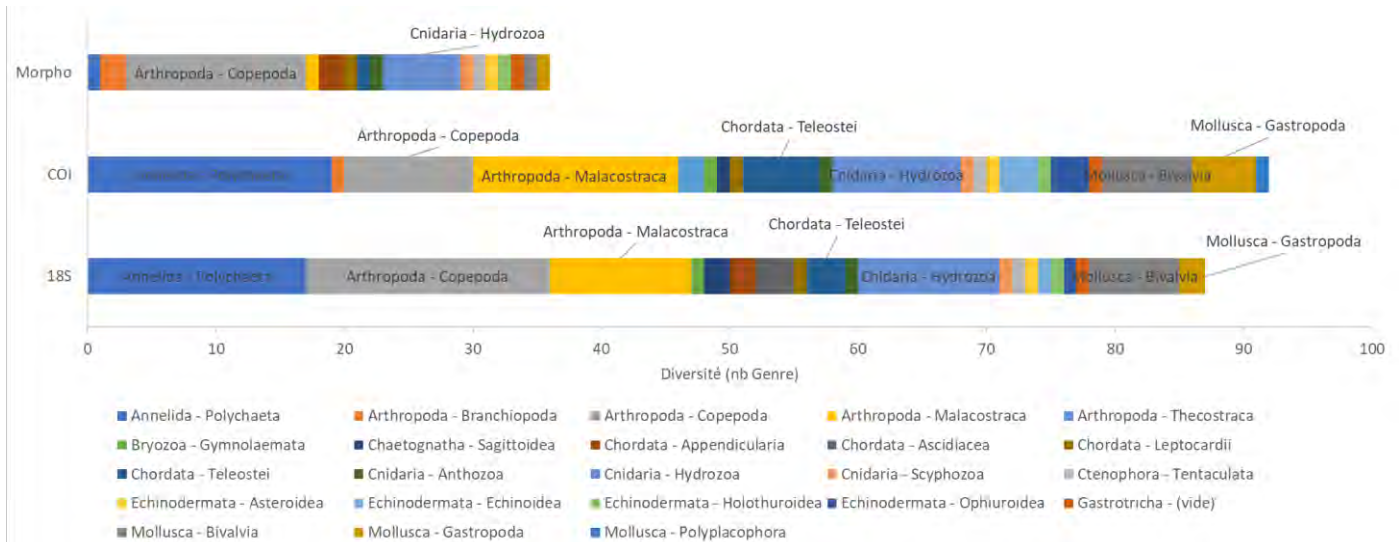


Figure 7 : Diversité taxonomique (nb de Genres par Classe) détectée selon le type d'analyse produite (Identification morphologique, marqueur moléculaire 18S ou COI)

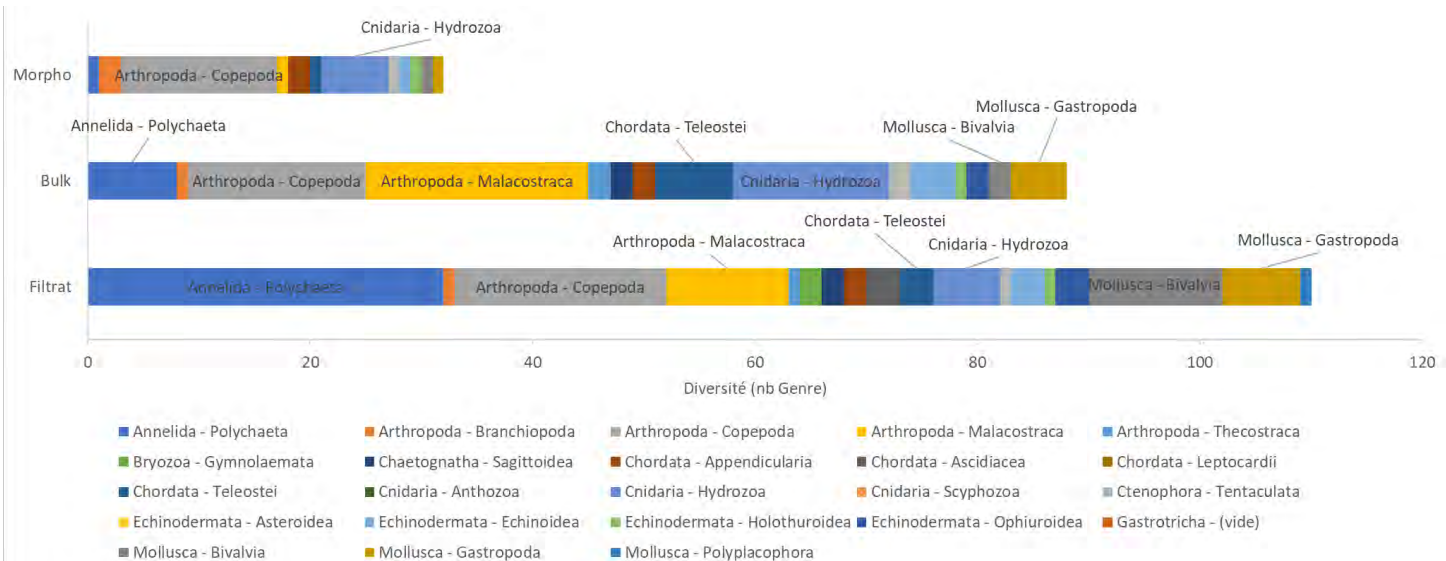


Figure 8 : Diversité taxonomique (nb de Genres par Classe) détectée selon le type d'échantillon analysé (Identification morphologique, bulk ou filtrat)

4.2.1.1 Intérêt de l'ADNe dans l'étude du méroplancton et du zooplancton benthique

Dans le cas de l'identification morphologique, le méroplancton détecté et identifié se compose majoritairement, en termes d'abondance, de larves d'échinodermes, puis dans une moindre mesure de larves de mollusques et d'arthropodes (notamment crustacés décapodes). L'identification à l'espèce des individus observés restent néanmoins impossible par cette méthode parce que chacun de ces groupes taxonomiques présente des stades larvaires commun entre des individus d'espèces différentes (par exemple les stades zoé ou mysis sont communs à tous les crustacés, le stade plutéus est commun à tous les échinodermes, les stades trochophores et veligère sont communs à tous les mollusques).

Les analyses moléculaires s'affranchissent complètement de ces ressemblances morphologiques et permettent une description plus précise de la diversité taxonomique rencontrée en autorisant une description au genre voire à l'espèce au sein de chacune de ces classes. A titre d'exemple, les listes d'espèces de mollusques et d'échinodermes recensées dans le cadre de ce projet (Figure 9) sont extraits des jeux de données obtenus par l'analyse moléculaire.

A ces exemples, d'autres cas particuliers peuvent s'ajouter, comme notamment les œufs et larves de poissons pour lesquels un degré d'expertise rare et une spécialisation en ichtyoplancton est nécessaire pour permettre l'identification morphologique des espèces.

Identification Morphologique	Identification moléculaire (18S + COI)			
Bivalvia 	 <i>Abra longicallus</i>	 <i>Kurtiella bidentata</i>	 <i>Lutraria angustior</i>	 <i>Mytilus edulis</i>
	 <i>Arcopagia crassa</i>	 <i>Laevicardium crassum</i>	 <i>Mactra glauca</i>	 <i>Pecten maximus</i>
	 <i>Ensis spp.</i>	 <i>Polititapes rhomboides</i>		
Gastropoda 	 <i>Crepidula fornicata</i>	 <i>Euspira nitida</i>	 <i>Jujubinus montagui</i>	 <i>Tritia reticulata</i>
	 <i>Embletonia pulchra</i>	 <i>Facelina bostoniensis</i>	 <i>Rissoa labiosa</i>	
Ophiuroidea 	 <i>Ophiothrix fragilis</i>	 <i>Ophiura albida</i>	 <i>Ophiura ophiura</i>	
Echinoidea 	 <i>Echinocardium cordatum</i>	 <i>Echinocardium pennatifidum</i>	 <i>Echinocyamus pusillus</i>	
	 <i>Psammechinus miliaris</i>	 <i>Spatangus sp.</i>		

Figure 9: Illustration de la complémentarité offerte entre des techniques d'identification morphologique (données quantitatives mais peu précises) et d'identification moléculaires (données qualitatives permettant d'atteindre une précision à l'espèce).

4.2.1.1 Intérêt de l'ADNe dans l'étude de l'holoplancton

Les résultats issus des analyses morphologiques précisent que l'holoplancton est majoritairement composé de copépodes, avec un effectif représentant plus de 93% de l'effectif total. La diversité des espèces y est importante avec 17 genres appartenant à 5 Classes : Copepoda, Appendicularia, Branchiopoda, Sagittoida, Tentaculata.

Par comparaison, la composition taxonomique de l'holoplancton révélée par les analyses de métabarcoding reste en tout point comparable : les 5 Classes sont retrouvées dans les deux types d'échantillons analysés (filtrat d'eau de mer et bulk). Les bulks ont permis la détection complémentaire d'une méduse sur 1 échantillon, *Chrysaora hysoscella* (Classe des Scyphozoa ; Figure 10), dont des fragments de filaments peuvent avoir été piégés dans le filet WP2.



Figure 10 : Méduse rayonnée ou méduse compas (*Chrysaora hysoscella* ; source : www.inaturalist.org)

Par ailleurs, bien que les données obtenues par analyses moléculaires ne permettent pas de traiter quantitativement les résultats obtenus, le nombre de *reads* observé par Classe reste malgré tout cohérent avec les résultats d'abondance issus de l'identification morphologique (cf. Figure 11).

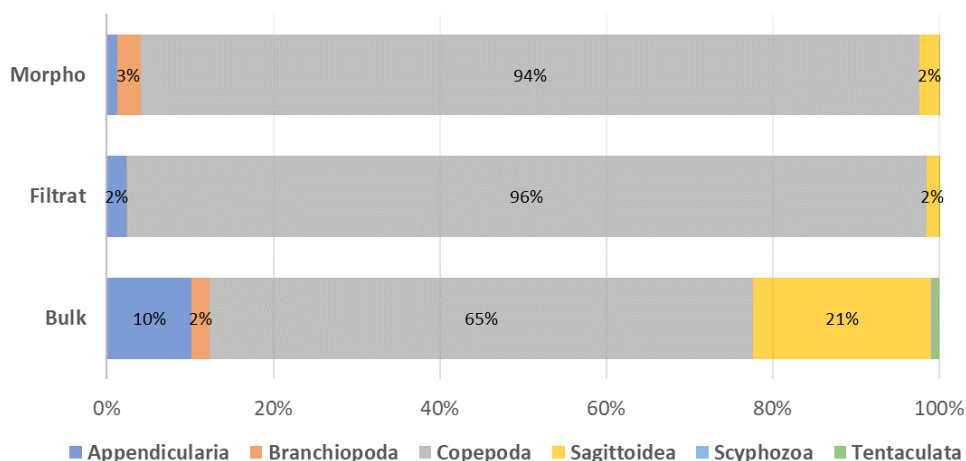


Figure 11 : Composition de l'Holoplancton observée en termes de fréquence d'abondance par Classe suivant la méthode d'investigation employée (identification morphologique ou moléculaires). Le calcul des fréquences est basé sur le dénombrement des individus dans le cas de l'identification morphologique et sur le nombre de *reads* obtenus dans le cas du moléculaire.

4.2.1.2 Focus sur la Classe Copepoda

Les copépodes sont des petits crustacés constituant une part prépondérante du plancton marin. En particulier, ceux de l'ordre des Calanoida jouent un rôle structurant dans les écosystèmes en étant un maillon clé des réseaux trophiques, par l'alimentation des poissons et autres prédateurs secondaires, par la prédation et la régulation du phytoplancton, par leur rôle de puit de carbone d'importance pour la régulation du climat.

D'autres copépodes, tels ceux appartenant aux ordres Cyclopoida et Harpacticoida, peuvent aussi être des organismes benthiques, c'est-à-dire vivant sur ou à proximité du fond.

Au total, ce sont 35 espèces de copépodes qui ont été détectées par l'ensemble des techniques d'investigation. Parmi celles-ci, 80% sont détectées à l'aide des outils ADNe mais moins d'1 espèce sur 3 sont communes entre les techniques d'identification morphologique et moléculaire (Tableau 5).

Tableau 5 : Liste des genres et espèces de copépodes détectés par l'identification morphologique et moléculaire.

Ordre	Genre	Espèce	ADNe	Morpho
Calanoida	Acartia	<i>Acartia clausi</i>		X
		<i>Acartia sp.</i>		X
	Calanus	<i>Calanus helgolandicus</i>	X	X
	Calocalanus	<i>Calocalanus pavo</i>	X	
	Centropages	<i>Centropages hamatus</i>	X	X
		<i>Centropages spp.</i>		X
		<i>Centropages typicus</i>	X	X
	Chiridiella	<i>Chiridiella reductella</i>	X	
	Isias	<i>Isias clavipes</i>		X
		<i>Isias sp.</i>		X
	Labidocera	<i>Labidocera pectinata</i>	X	
		<i>Labidocera sp.</i>		X
		<i>Labidocera wollastoni</i>		X
	Metridia	<i>Metridia lucens</i>	X	
	Paracalanus	<i>Paracalanus parvus</i>	X	X
		<i>Paracalanus sp.</i>		X
	Pseudocalanus	<i>Pseudocalanus elongatus</i>	X	X
		<i>Pseudocalanus moultoni</i>	X	
	Pseudodiaptomus	<i>Pseudodiaptomus marinus</i>		X
	Sulcanus	<i>Sulcanus conflictus</i>	X	
	Temora	<i>Temora longicornis</i>	X	X
		<i>Temora sp.</i>		X
Cyclopoida	Tortanus	<i>Tortanus sp.</i>	X	
	Undinula	<i>Undinula vulgaris</i>	X	
	Parapontella	<i>Parapontella sp.</i>		X
	Critomolgus	<i>Critomolgus vicinus</i>	X	
	Cyclopinella	<i>Cyclopinella sp.</i>	X	
	Ditrichocorycaeus	<i>Ditrichocorycaeus anglicus</i>	X	X
		<i>Ditrichocorycaeus sp.</i>		X
	Hemicyclops	<i>Hemicyclops thalassius</i>	X	
	Hermannella	<i>Hermannella longicaudata</i>	X	
		<i>Hermannella sp.</i>	X	
Harpacticoida	Lichomolgidium	<i>Lichomolgidium sp.</i>	X	
	Lichomolgus	<i>Lichomolgus canui</i>	X	
		<i>Lichomolgus marginatus</i>	X	
	Alteutha	<i>Alteutha sp.</i>		X
	Alteuthellopsis	<i>Alteuthellopsis sp.</i>	X	
	Euterpina	<i>Euterpina acutifrons</i>	X	X
	Longipedia	<i>Longipedia coronata</i>	X	
		<i>Longipedia ulleungensis</i>	X	
	Parabradia	<i>Parabradia dilatata</i>	X	

Bien que les copépodes des genres *Acartia* et *Isias* représentent plus du tiers des individus observés par identification morphologique, ces groupes d'espèces sont totalement absents des séquences amplifiées, et cela quel que soit le marqueur utilisé (18S et COI) ou le type d'échantillon analysé (Bulk et Filtrat). D'autres taxons en revanche sont bien détectés, notamment *Euterpina acutifrons*, *Paracalanus parvus*, *Centropages hamatus*, *Temora longicornis* pour lesquels le nombre de reads important indique la présence d'un signal fort et fiable.

A noter, en lien très probable avec le nombre important de séquences non assignées concernant le COI (cf. § 4.1), les marqueurs 18S et COI génèrent une information contrastée, avec une détection et une diversité plus importante pour le 18S.

Sur les 28 genres de copépodes observés au total, seuls 8 sont communs aux deux méthodes d'identification (cf. Figure 12). Quinze genres n'ont été observés qu'à l'aide des outils moléculaires, indépendamment de la méthode ou du marqueur employée. Enfin, il est intéressant de souligner l'illustration offerte par cette représentation des résultats en comparant par exemple les espèces détectées à partir d'un bulk suivant que cet échantillon ait été traité par metabarcoding ou identification morphologique : 8 genres (50%) sont communs aux deux méthodes, 5 sont apportés par la morphologie (30%) et 3 par l'analyse moléculaires (20%).

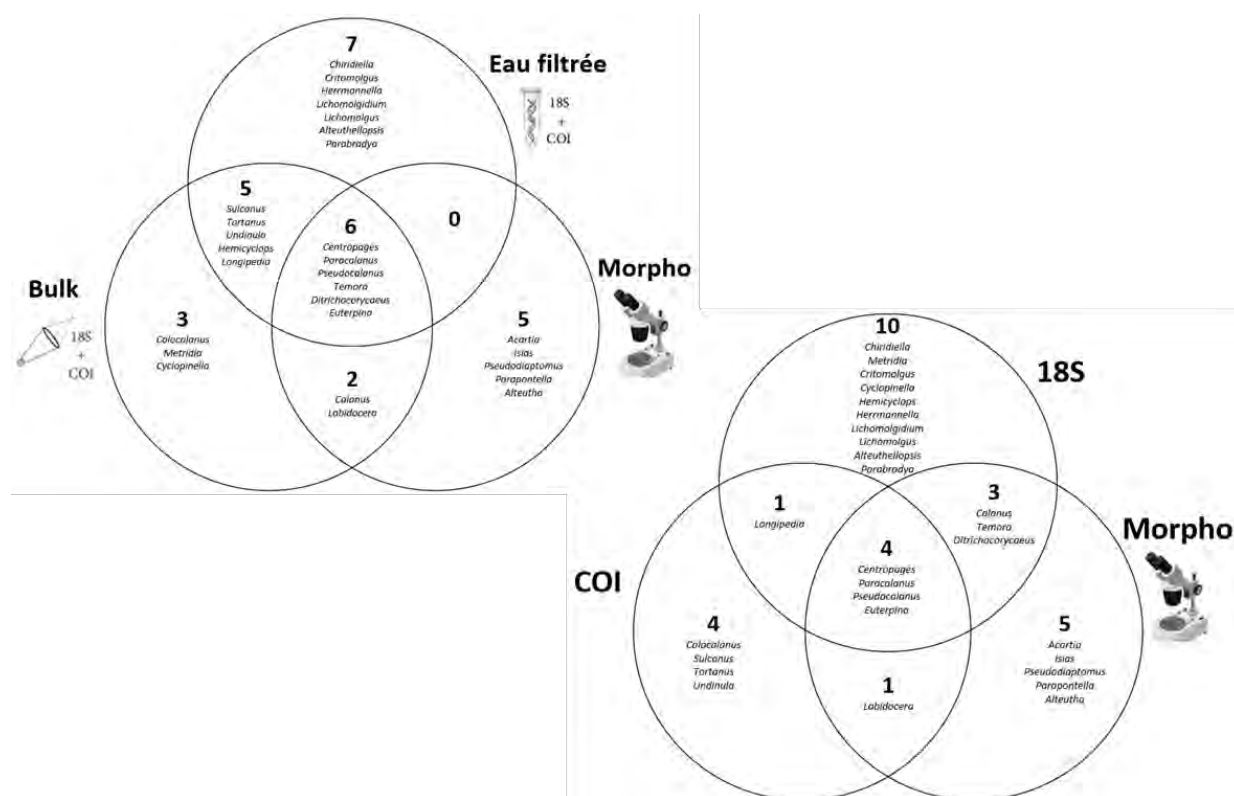


Figure 12 : Diagramme de Venn pour les genres de copépodes détectés suivant la méthode d'échantillonnage employée d'une part (à gauche) et d'identification d'autre part (à droite).

Le tableau suivant présente un résultat similaire mais y ajoutant une information quantitative. Ce caractère quantitatif est apporté par la proportion d'individus dénombrés au sein des échantillons analysés morphologiquement et pour les données moléculaires, par une simple comparaison des *reads* obtenus (cf. Figure 13).

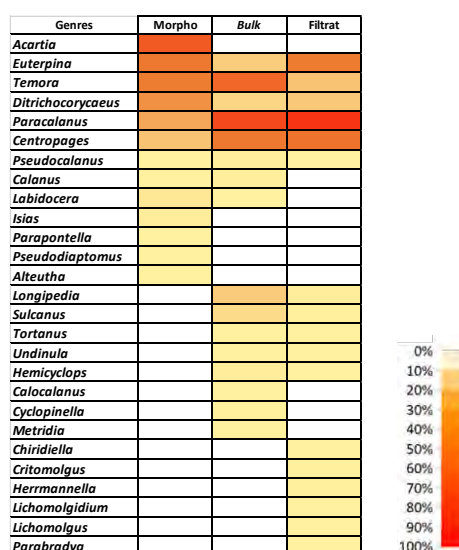


Figure 13 : Abondance relative des genres de copépodes suivant la méthode d'identification considérée. Les fréquences concernant les données moléculaires sont obtenues en exploitant le nombre de reads.

Parce que la diversité détectée est fonction du type d'échantillon mais aussi de la méthode d'identification employée, la structure des communautés observées sera nécessairement décrite différemment suivant les moyens d'analyses mobilisés. Néanmoins, le cortège d'espèces présentant de forte abondance et dominant le peuplement d'après les résultats de l'identification morphologique, à l'exception du genre *Acartia* non détecté par les outils moléculaires, sont également celles pour lesquelles le nombre de *reads* représente une proportion majoritaire des séquences détectées.

4.3 Intérêt de l'ADNe pour la détection d'espèces invasives

Dans les échantillons collectés, plusieurs signaux ou séquences sont identifiés comme indiquant la détection d'espèces exotiques. En effet, sur les 224 taxons observés dans la présente étude, 20 peuvent être considérés comme non natifs de la zone de collecte, bien que pour certains taxons, le caractère natif ou non reste difficile à déterminer : l'absence de détection historique ne signifie pas une preuve d'absence.

Certaines détections d'espèces au caractère invasif avéré l'ont été uniquement via l'analyse des échantillons par les outils moléculaires. Par exemple :

- La crépidule *Crepidula fornicata*, espèce introduite en France de longue date. Son introduction sur les côtes européennes a été détectée dès la fin du XIX^{ème} siècle, elle est désormais considérée comme naturalisée ;
- Le cténaire *Mnemiopsis leidyi* est originaire de l'Atlantique Nord-Ouest et a été récemment introduit en Europe via les eaux de ballast. Il est désormais régulièrement observé en Manche depuis la fin des années 2000³⁰ ;

³⁰ Antajan Elvire, Bastian Thomas, Raud Thomas, Brylinski Jean-Michel, Hoffman Stefan, Breton Gerard, Cornille Vincent, Delegrange Alice, Vincent Dorothee (2014). The invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 along the

- L'ascidie *Ciona intestinalis* est quant à elle une espèce non indigène avec un fort potentiel invasif. Elle est cependant aujourd'hui naturalisée sur une grande partie de la planète.

Inversement, notons que certaines espèces invasives, pourtant détectées et recensées par l'identification morphologique, n'ont produit aucun signal via l'analyse moléculaire des échantillons. C'est le cas par exemple du copépode *Pseudodiaptomus marinus* observé en France pour la première fois en 2010, proche de la zone d'étude³¹.

Précisons ici que le processus d'assignation reste un point d'étape central mais qui peut s'avérer délicat. En effet, certains taxons identifiés à l'issue de l'étape d'assignation (pipeline bio-informatique) n'étaient vraisemblablement que de faux positifs :

- Un MOTU a été assigné au crabe *Homalaspis plana*, espèce native d'Amérique du Sud mais qui a déjà été détectée en dehors de son aire de distribution native³². Néanmoins, pour ce MOTU, la fiabilité de l'assignation de la séquence peut poser question et ne permet pas de déterminer avec certitude que cette espèce a été véritablement détectée (voir figure ci-dessous) : A niveau de fiabilité équivalent, cette même séquence aurait pu être assignée au crabe *Eriocheir sinensis*, espèce invasive également mais introduite en Europe il y a plus d'un siècle³³, ou à l'étrille *Necora puber* ou certaines espèces du genre *Liocarcinus*, toutes des espèces indigènes.

Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Eriocheir sinensis	695	695	100%	0.0	100.00%	392	MF077387.1
Liocarcinus marmoreus	695	695	100%	0.0	100.00%	717	KJ193787.1
Liocarcinus navigator	695	695	100%	0.0	100.00%	769	KJ193762.1
Liocarcinus depurator	695	695	100%	0.0	100.00%	774	KJ193759.1
Eriocheir sinensis	695	695	100%	0.0	100.00%	1873	XR_007745376.1
Homalaspis plana	695	695	100%	0.0	100.00%	1796	HM638007.1
Necora puber	695	695	100%	0.0	100.00%	1742	DQ079759.1

Figure 14 : Résultats d'alignement de la séquence SSU_F04_SSU_R22mod_00014 sur BLASTn

- Un MOTU a été assigné à l'espèce de crabe *Pseudosesarma glabrum* dont les cas d'introduction ont été signalés par le passé³⁴ probablement en lien avec le fait que ce soit une espèce couramment disponible à la vente pour les terrariophiles. Mais, comme pour le MOTU précédent, le résultat d'assignation peut poser question, puisque le pourcentage de correspondance de la séquence fourni par l'outil BLASTn à l'espèce n'est que de 85%. En s'appuyant sur BOLD, une autre base de données de séquences nucléotidiques (marqueur COI

English Channel and the North Sea French coasts: another introduction pathway in northern European waters? *Aquatic Invasions*, 9(2), 167-173.

³¹ Brylinski Jean-Michel, Antajan Elvire, Raud Thomas, Vincent Dorothee (2012). First record of the Asian copepod *Pseudodiaptomus marinus* Sato, 1913 (Copepoda: Calanoida: Pseudodiaptomidae) in the southern bight of the North Sea along the coast of France. *Aquatic Invasions*, 7(4), 577-584.

³² Peters, K. & Robinson, T. B. (2018). From Chile to the South African west coast : first reports of the Chilean stone crab *Homalaspis plana* (H. Milne Edwards, 1834) and the South American sunstar *Heliaster helianthus* (Lamarck, 1816) outside their natural ranges. *BioInvasions Records*, 7(4):421-426.

³³ Herborg, LM., Rushton, S.P., Clare, A.S., Bentley, M.G. (2003). Spread of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards) in Continental Europe: analysis of a historical data set. In: Jones, M.B., Ingólfsson, A., Ólafsson, E., Helgason, G.V., Gunnarsson, K., Svavarsson, J. (eds) Migrations and Dispersal of Marine Organisms. *Developments in Hydrobiology*, vol 174.

³⁴ Pezy, JP., Shahdadi, A., Baffreau, A. et al. (2017) An unexpected record of an African mangrove crab, *Perisesarma alberti* Rathbun, 1921, (Decapoda: Brachyura: Sesamidae) in European waters. *Mar. Biodivers. Rec.* 10, 33.

uniquement), le match de la même séquence produit un résultat différent : *Asthenognathus atlanticus*, espèce native de la zone et classée déterminante ZNIEFF (catégorie "espèces autochtones rares »).

Ces deux exemples soulignent les limites induites par les données issues des analyses moléculaires et les précautions qu'elles imposent dans leur exploitation.

5. Discussion

Les techniques d'ADN environnemental, ou de métagénomique environnementale, offrent de nombreux avantages dans le suivi des communautés planctoniques. Ces techniques utilisent l'ADN extrait d'échantillons environnementaux, tels que les filtrats d'eau de mer ou directement les organismes (bulk), pour identifier et quantifier les espèces présentes dans un écosystème sans avoir à observer individuellement chaque organisme. Ce projet avait pour but de tester ces techniques (faisabilité, intérêt) en mutualisant l'effort d'échantillonnage aux campagnes en mer menées parallèlement dans le cadre du suivi des communautés planctoniques réalisé dans le cadre du projet éolien de Dieppe Le Tréport. La démarche était de permettre une première comparaison de ces méthodes et outils par rapport aux techniques d'analyses classiques utilisant les critères morphologiques comme clé de détermination des organismes observés. Cette étude a permis de mettre en avant certains avantages offerts mais aussi certaines limites induites par ces techniques nouvelles dans le suivi des communautés planctoniques.

Le recours à l'ADNe présente de nombreux avantages. Le premier est que ces techniques d'analyses permettent d'accéder, bien que certains groupes puissent être complexes à identifier, à un large éventail de groupes taxonomiques à partir de l'analyse d'un seul et unique échantillon. Les méthodes d'analyses traditionnelles, par comparaison, imposeront toujours un certain silotage dans le traitement et l'acquisition de données en raison du degré d'expertise et du haut niveau de spécialisation nécessaire pour identifier et reconnaître les espèces d'un groupe particulier sur la seule reconnaissance de leurs caractéristiques morphologiques. Par exemple, identifier conjointement des espèces du phytoplancton, du zooplancton et de l'ichtyoplancton présent dans un échantillon nécessitera de faire appel à au moins 3 experts simultanément.

L'intérêt de ces techniques moléculaires réside également dans le fait qu'elles offrent sur certains groupes taxonomiques des résultats d'identification plus précis en permettant d'accéder au rang de l'espèce là où les critères morphologiques ne peuvent parfois permettre de distinguer les familles appartenant à une même classe. Ce gain de précision est particulièrement vrai dans le cas des organismes méroplanctoniques où seul le stade larvaire est pélagique, et pour lesquels les larves d'une même classe ou famille prennent une apparence similaire. Ce gain de précision doit être vu comme un atout réel tout particulièrement pour alimenter les travaux de recherche visant à suivre et comprendre les changements qui seront induits au sein de la communautés planctoniques par la présence de structures en mer. Si l'hypothèse selon laquelle les communautés benthiques seront impactées par l'implantation du parc éolien s'avère juste (e.g. nouvel équilibre), alors une modification de la fraction méroplanctonique est attendue parallèlement. Dans cette perspective d'analyses et de suivi, l'outil moléculaire offrira la capacité de décrire précisément les groupes et les espèces en présence.

Enfin, l'ADNe se positionne comme un outil dont la complémentarité aux techniques d'identification morphologique semble évidente. C'est tout d'abord en utilisant ces deux approches de manière

conjointe que la plus grande diversité d'organismes est détectée. Ensuite, la multiplicité des points d'accès à l'information qu'elles offrent est aussi un atout indéniable. Dans ce projet, les données morphologiques ont été complétées de données moléculaires issues de deux marqueurs (complémentaires l'un de l'autre) chacun appliqué à deux types d'échantillon (bulk et filtrat). Ceci a permis un « contrôle-qualité » des résultats obtenus parce que le croisement des informations facilite la détection des faux signaux et parce qu'il permet également d'associer une échelle de fiabilité à l'assignation examinée.

Par conséquent, l'utilisation de l'ADNe est prometteuse comme méthode complémentaire de monitoring du milieu marin dans un contexte d'implantation de parcs éoliens en mer, bien qu'encore peu utilisée à cette fin à l'heure actuelle. Cette technique permet la production de données qualitatives avec une méthode non invasive. Pour la description et le suivi du compartiment zooplanctonique, son application permettrait de mieux suivre et de mieux décrire les modifications éventuelles au sein de ces peuplements, en offrant la possibilité de suivre des taxons spécifiques ou une catégorie du plancton (e.g. méroplancton). Plus largement, cette même technique permet aussi l'acquisition d'autres informations (e.g. diversité) et offre un outil de veille intéressant (e.g. meilleure détection d'espèces exotiques, cryptiques, ou rares).

Cependant, malgré son intérêt indéniable, les techniques de métagénomique environnementale restent encore complexes à mettre en œuvre et se heurtent à plusieurs difficultés. La première réside dans le fait qu'il s'agisse d'une technique récente, en pleine expansion, sans qu'aucune norme ou standard ne permette de définir un cadre précis pour la mise œuvre de ces outils. Que ce soit l'étape d'échantillonnage (e.g. matrice, profondeur, volume, etc.), de sélection des amorces, de traitement bio-informatique (définition des MOTUs), toutes conditionnent la qualité des résultats obtenus³⁵.

Il convient également de rappeler que cette méthode est aussi particulièrement sensible au risque de contamination. Bien que des précautions soient prises pour les limiter au maximum et en particulier pendant la phase de collecte des échantillons, ce risque ne peut être complètement exclu. Le jeu de données produit dans le cadre de ce projet ne fait pas exception (détection d'insectes par exemple) et souligne plusieurs points d'amélioration à considérer si ce travail de suivi devait être poursuivi. Ces points sensibles ont tous pour origine le fait que ce projet devait s'inscrire dans une enveloppe budgétaire contrainte et dans cet objectif, les moyens à la mer ont été mutualisés avec ceux déjà prévus dans le cadre des suivis réglementaires E9 (communautés planctoniques) et SE6F (ichtyoplancton). De même, les campagnes d'échantillonnage se sont inscrites en suivant la même temporalité (deux interventions d'une nuit) sans pouvoir modifier la durée de celles-ci. En positionnant les contraintes imposées par l'échantillonnage ADNe en amont, il conviendrait à l'inverse de prévoir :

- Un navire disposant d'un espace de travail plus grand _ le rinçage du filet de prélèvement serait facilité et plus efficace en permettant son déploiement complet.
- Une durée de mission plus importante _ les filtrats d'eau de mer gagneraient à être réalisés directement en mer, soit en filtrant les échantillons d'eau prélevés sur le lieu de prélèvement, soit par l'immersion d'une pompe ADNe (~ 45' par points de prélèvement).

Le choix du ou des marqueurs génétiques (et de l'amorce) constitue également un point d'attention particulier. Ce choix doit être étudié attentivement au préalable et résulte d'un nécessaire compromis entre la résolution attendue et la diversité du groupe d'organismes ciblés. La région de la sous-unité I

³⁵ van der Loos, L. M., & Nijland, R. (2021). Biases in bulk: DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved. *Molecular Ecology*, 30(13), 3270-3288.

(COI) de la cytochrome oxydase mitochondriale est la région de l'ADN la plus fréquemment utilisée (Hebert et al., 2003³⁶) dans les analyses métabarcoding pour une identification précise des espèces, car la plupart des taxons présentent une variabilité intra- versus interspécifique significativement différente de cette région ADN, ce qui autorise la discrimination d'espèces pouvant être pourtant étroitement apparentées. Dans le cas particulier du zooplancton marin, ce groupe étant constitué d'animaux appartenant à presque tous les phylums, il est difficile de trouver une amorce parfaitement appropriée, couvrant toute la biodiversité du zooplancton (A. Schroeder et al., 2021³⁷). Pour décrire cette diversité et l'assemblage complexe d'espèces, quatre régions génétiques sont couramment utilisées : 16S (Clarke et al., 2017³⁸ ; Lindeque et al. 2006³⁹), 28S (Harvey et al., 2017⁴⁰ ; Hirai et al., 2013⁴¹), 18S (Blanco-Bercial, 2020⁴² ; Chain et al., 2016⁴³) et le gène mitochondrial COI (Carroll et al., 2019⁴⁴ ; Schroeder et al., 2020⁴⁵ ; Stefanni et al., 2018⁴⁶).

Ces deux dernières, 18S et COI, restent celles qui sont les plus utilisées. Le 18S présente des régions hypervariables attachées à d'autres portions bien conservées, permettant de distinguer un large éventail de groupes taxonomiques (Amaral-Zettler et al., 2009⁴⁷). Seulement, le 18S n'offre souvent qu'une faible résolution taxonomique (genre voire famille). Pour pallier ces limites, de nombreuses études préfèrent utiliser le gène COI, qui lui, présente une excellente résolution taxonomique. Son inconvénient réside dans les difficultés voire les échecs d'amplification (Clarke et al., 2017). Ainsi, pour

³⁶ Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

³⁷ A. Schroeder, A. Pallavicini, P. Edomi, M. Pantera, E. Camatti (2021). Suitability of a dual COI marker for marine zooplankton DNA metabarcoding, *Marine Environmental Research*, Volume 170.

³⁸ L.J. Clarke et al. (2017). Effect of marker choice and thermal cycling protocol on zooplankton DNA metabarcoding studies *Ecol. Evol.*

³⁹ Lindeque, P. K., Hay, S. J., Heath, M. R., Ingvarsdottir, A., Rasmussen, J., Smerdon, G. R., & Waniek, J. J. (2006). Integrating conventional microscopy and molecular analysis to analyse the abundance and distribution of four *Calanus* congeners in the North Atlantic. *Journal of Plankton Research*, 28(2), 221-238.

⁴⁰ Harvey, J. B., Johnson, S. B., Fisher, J. L., Peterson, W. T., & Vrijenhoek, R. C. (2017). Comparison of morphological and next generation DNA sequencing methods for assessing zooplankton assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 487, 113-126.

⁴¹ Hirai, J., Katakura, S., Kasai, H., & Nagai, S. (2017). Cryptic zooplankton diversity revealed by a metagenetic approach to monitoring metazoan communities in the coastal waters of the Okhotsk Sea, Northeastern Hokkaido. *Frontiers in Marine Science*, 4, 379.

⁴² Blanco-Bercial, L. (2020). Metabarcoding analyses and seasonality of the zooplankton community at BATS. *Frontiers in Marine Science*, 7, 173.

⁴³ Chain, F. J., Brown, E. A., MacIsaac, H. J., & Cristescu, M. E. (2016). Metabarcoding reveals strong spatial structure and temporal turnover of zooplankton communities among marine and freshwater ports. *Diversity and Distributions*, 22(5), 493-504.

⁴⁴ Carroll, E. L., Gallego, R., Sewell, M. A., Zeldis, J., Ranjard, L., Ross, H. A., ... & Constantine, R. (2019). Multi-locus DNA metabarcoding of zooplankton communities and scat reveal trophic interactions of a generalist predator. *Scientific Reports*, 9(1), 281.

⁴⁵ Schroeder, A., Stanković, D., Pallavicini, A., Gionechetti, F., Pantera, M., & Camatti, E. (2020). DNA metabarcoding and morphological analysis-Assessment of zooplankton biodiversity in transitional waters. *Marine Environmental Research*, 160, 104946.

⁴⁶ Stefanni, S., Stanković, D., Borme, D., de Olazabal, A., Juretić, T., Pallavicini, A., & Tirelli, V. (2018). Multi-marker metabarcoding approach to study mesozooplankton at basin scale. *Scientific Reports*, 8(1), 12085.

⁴⁷ Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W., & Huse, S. M. (2009). A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PloS one*, 4(7), e6372.

intégrer ces deux biais, une approche multi-marqueurs, telle que celle proposée dans ce projet, devient de plus en plus commune et fréquente (Djurhuus et al., 2018⁴⁸ ; Questel et al., 2021⁴⁹ ; Feng et al., 2023⁵⁰). Celle-ci permet également de réduire les biais résultant d'un succès d'amplification qui peut être différent entre les groupes taxonomiques.

La qualité de l'assignation des séquences produites par ces amorces dépend ensuite essentiellement de l'alimentation des banques de données en échantillons de référence fiables. Les principales banques de données, GenBank et BOLD, couvrent respectivement 504 000 et 350 000 espèces différentes, avec un niveau de fiabilité bon (taux d'erreur < 1% au niveau du genre selon Leray *et al.*, 2019). Ce nombre est important mais néanmoins loin de couvrir l'ensemble du vivant (près de deux millions d'espèces sont décrites à ce jour). Ainsi l'alignement recherché entre les MOTUs obtenus et ces banques de données non exhaustives peuvent générer l'apparition de faux signaux parce qu'une séquence « inconnue » pourra malgré tout présenter un taux de similitude significatif avec une séquence référence mais appartenant à une autre espèce, proche génétiquement. Parmi les pistes pouvant être explorées pour rechercher un gain de qualité, il est ici utile de mentionner la création récente d'une nouvelle base de données de séquences COI pour les communautés de zooplancton (Bucklin et al., 2021⁵¹), appelée MetaZooGene Barcode Atlas and Database (MZGdb) (<https://metazoogene.org/database>). Elle a exploité les données disponibles sous GenBank et BOLD, en éliminant les erreurs identifiées, et a créé des bases de données de séquences de référence mondiales et géographiquement spécifiques qui pourraient être avantageusement utilisées dans le cadre spécifique de cette étude du zooplancton sur le site de Dieppe – Le Tréport, pour ce marqueur génétique. Notons également que Clarke et al. (2017) ont démontré que le COI permettait d'atteindre un taux d'assignation spécifique jusqu'à trois fois plus de taxons que le 18S, et qu'il bénéficie également d'une énorme base de données (>3,5 millions de séquences déposées sur Genbank). Ces quelques éléments soulignent la pertinence de l'utilisation du COI en tant que marqueur génétique pour le métabarcoding du zooplancton. Parallèlement, l'amorce du gène 18S que nous avons utilisée, avait initialement été développée dans le cadre de l'étude de la méiofaune benthique. Les bons résultats observés ici confirment également sa pertinence dans cette étude.

Enfin, bien que l'approche moléculaire type métabarcoding restitue surtout une information qualitative, des éléments quantitatifs peuvent malgré tout être recherchés en exploitant l'information du nombre de séquences lues (nombre de *reads*). Dans cette étude, une bonne corrélation a été observée entre ce nombre et les abondances obtenues par dénombrement. Seulement l'exploitation de ce signal reste délicate pour décrire la structure d'une communauté parce que l'image restituée est nécessairement extrêmement dépendante des options qui auront été prises, tels que le choix du marqueur ou de la méthode de regroupement des MOTUs. En revanche, à une échelle de description large (par exemple en recherchant les proportions relatives d'holoplancton et de méroplancton ou

⁴⁸ Djurhuus, A., Pitz, K., Sawaya, N. A., Rojas-Márquez, J., Michaud, B., Montes, E., ... & Breitbart, M. (2018). Evaluation of marine zooplankton community structure through environmental DNA metabarcoding. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(4), 209-221.

⁴⁹ Questel, J. M., Hopcroft, R. R., DeHart, H. M., Smoot, C. A., Kosobokova, K. N., & Bucklin, A. (2021). Metabarcoding of zooplankton diversity within the Chukchi Borderland, Arctic Ocean: improved resolution from multi-gene markers and region-specific DNA databases. *Marine Biodiversity*, 51, 1-19.

⁵⁰ Feng, Y., Sun, D., Shao, Q., Fang, C., & Wang, C. (2023). COI metabarcoding better reveals the seasonal variations in the zooplankton community in the western Pacific Warm Pool. *Ecological Indicators*, 156, 111183.

⁵¹ A. Bucklin et al. (2021). Toward a global reference database of COI barcodes for marine zooplankton. *Marine Biology*

bien des Classes composant ces catégories), l'utilisation de cette information complémentaire semble rester pertinente.

Pour conclure, ce travail exploratoire a permis de tester l'intérêt et l'apport des outils moléculaires dans le suivi des communautés zooplanctoniques. Les résultats obtenus soulignent en particulier l'accès offert à la description d'un spectre faunistique plus large et plus diversifié, et le gain de précision apporté avec une résolution taxonomique plus forte. Pour être envisagée de façon pérenne, le protocole mis en œuvre dans cette étude gagnerait néanmoins à être amélioré et tout particulièrement sur deux points : i) en prévoyant une durée de mission plus longue pour autoriser l'utilisation de pompes ADNe immergeables et rendre ainsi plus précis et plus rigoureux l'échantillonnage, et ii) en adaptant davantage les périodes d'échantillonnage aux objectifs de l'étude. En effet, si l'atout principal de cet outil réside dans les capacités qu'il offre pour décrire la composition du méroplancton, le protocole actuel ne prévoit que deux points de mesure par an (printemps puis fin d'été). A l'inverse, il faut considérer ce compartiment comme extrêmement dynamique, où l'émission de larves dans la colonne d'eau n'est pas synchrone entre toutes les espèces, et où la durée des stades larvaires (de quelques jours à quelques semaines) sera aussi variable suivant les conditions trophiques du milieu. En ne considérant qu'un échantillonnage ponctuel, l'image de la communauté obtenue ne peut-être que limitée.