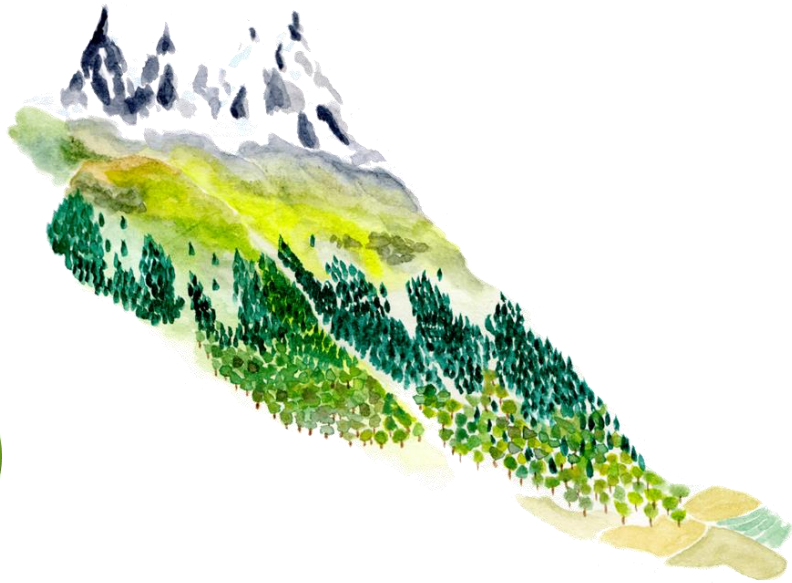




Discrimination des marqueurs d'ADN pour le metabarcoding d'ADN environnemental d'Arthropodes





Résumé

Le metabarcoding de l'ADN environnemental est un outil clé dans la compréhension des structures des communautés du sol. Cependant des manques de connaissances persistent sur certains groupes taxonomiques comme les *Arthropodes*. Dans cette étude nous cherchons à déterminer quels sont les avantages et inconvénients de quatre marqueurs d'ADN pour la lecture des communautés épigées d'*Arthropodes*.

Pour 2 types d'échantillons d'*Arthropodes*, nous avons regardé quelle lecture les 4 marqueurs montrent des structures intracommunautaires, intercommunautaires et les impacts des conditions environnementales sur celles-ci. Les résultats ont montré que CO1c est le marqueur qui amplifie de manière plus importante les échantillons d'ADN et qui associe le plus fréquemment un MOTUs aux taxons retrouvés. Par ailleurs, tous les marqueurs montrent des structures intercommunautaires similaires et globalement les mêmes tendances de structure selon les conditions environnementales.

Auteurs et contributions

Ce rapport sur l'analyse statistique des données de metabarcoding de l'ADN environnemental d'*Arthropodes*, a été rédigé par Mathieu BIANIC durant un stage au LECA dans le cadre du DU-Université-Entreprises de l'UGA.

Je remercie pour leur participation aux travaux et à la rédaction de ce rapport :

Camille MARTINEZ-ALMOYNA, Wilfried THUILLER, Marc OLHMAN, Giovanni POGGIATO, Maya GUÉGUEN et Clément LIONNET.



Table des matières

Résumé.....	2
Auteur et contribution.....	2
Introduction.....	4
Matériels et méthodes.....	5
Placettes ORCHAMP.....	5
Echantillonnage.....	5
Extraction, amplification et séquençage.....	7
Indices de mesures.....	8
Résultats.....	9
Structure intracommunautaire.....	9
Structure intercommunautaire.....	12
Impacts des conditions environnementales.....	13
Discussion.....	19
Inventaires exhaustifs.....	19
Difficultés d'échantillonnage.....	20
Échantillons litières.....	20
Conclusion.....	20



Introduction

Les grands progrès faits dans le domaine du séquençage ADN ont permis l'essor de nouvelles méthodes d'analyse des systèmes écologiques. L'une de ces méthodes est le metabarcoding de l'ADN environnemental qui sert à inventorier des espèces d'un milieu en se basant sur l'ADN que l'on y retrouve.

Le metabarcoding de l'ADN environnemental comprend plusieurs étapes. Après échantillonnage, l'ADN est extrait grâce à des protocoles spécialement adaptés au type d'échantillon environnemental (ex: sol, litière). L'extraction permet de récupérer l'ADN total de l'échantillon environnemental, c'est-à-dire à la fois l'ADN extracellulaire et l'ADN qui provient de cellules ou d'organismes multicellulaires vivants (intracellulaires). Après extraction, l'ADN est amplifié par PCR grâce à des marqueurs génétiques courts (150 paires de bases environ). Ces marqueurs sont des portions d'ADN monobrins qui se fixent sur des zones spécifiques de l'ADN dénaturé extrait. Grâce à ce marqueur l'ADN double brin est reconstitué par élongation du marqueur. Finalement une étape de traitement bio-informatique permet de minimiser les erreurs de séquençage, d'amplification ou de contamination.

Le metabarcoding de l'ADN, notamment du sol, est aujourd'hui largement utilisé car il est beaucoup moins chronophage que des inventaires exhaustifs de terrain et ne demande pas de faire appel à des spécialistes de taxons précis. Cependant étant relativement récent, le metabarcoding d'ADN environnemental présente aussi des failles de connaissances pour certains groupes taxonomiques. Les bases de références pour les arthropodes sont mauvaises donc les séquences associées aux taxons sont mal connues.

Par ailleurs, pour les arthropodes, ce protocole ne permet d'échantillonner que des individus présents dans le sol directement ou l'ADN dégradé des communautés épigées. Afin d'avoir des résultats plus représentatifs de ces dernières, il serait préférable de les échantillonner directement.

Dans cette étude nous avons utilisé 4 marqueurs sur 2 types d'échantillons afin de répondre aux questions suivantes :

- Les marqueurs révèlent-ils les mêmes structures intracommunautaires ?
- Les marqueurs révèlent-ils les mêmes structures intercommunautaires ?
- Quel impact des conditions environnementales sur ces structures sont révélées par les marqueurs ?

Matériel et méthode

Placettes ORCHAMP

Cette étude se place dans le contexte du projet d'observatoire spatio-temporel de la biodiversité en montagne : ORCHAMP. Ce projet vise à suivre sur le long terme les impacts du réchauffement climatique sur les écosystèmes de montagne. Ce suivi se fait au travers de différentes mesures comme les propriétés physico-chimiques du sol, des relevés de biodiversité, les fonctions du sol et l'activité humaine sur les terres. ORCHAMP s'articule en 2022 autour de 30 gradients représentatifs de l'espace environnemental dans les Alpes et autres massifs français (fig 1). Chaque gradient s'étale sur environ 1000 mètres de dénivelé et est composé de 4 à 8 placettes espacées de 200m de dénivelé. Chaque placette mesure 30 x 30 mètres et est subdivisée en plusieurs aires pour différents protocoles.

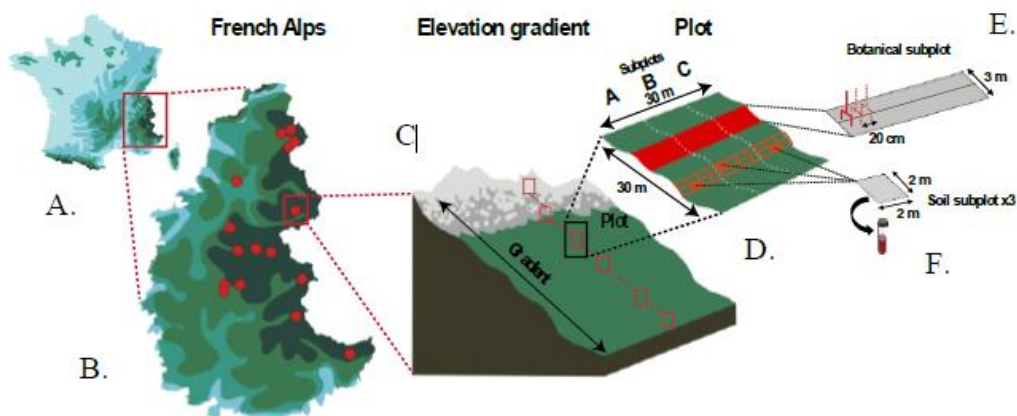
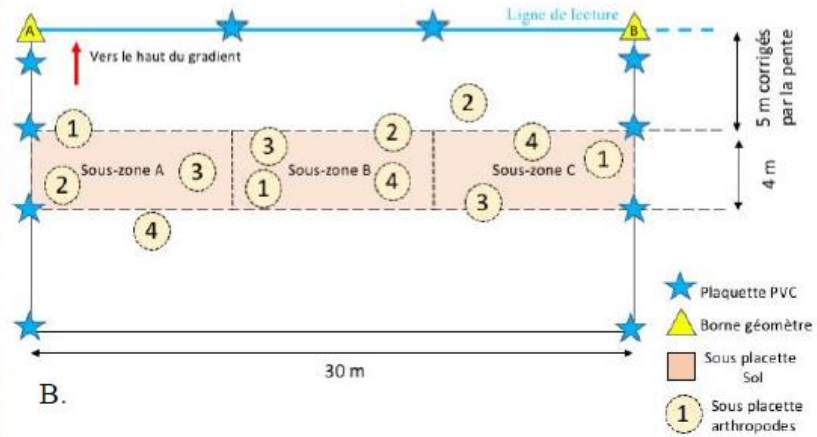


Figure 1 : Plan expérimental de l'observatoire à long terme ORCHAMP. (A) Localisation de l'observatoire dans les Alpes françaises, (B) emplacement des gradients d'élévation, (C) exemple de la distribution de l'élévation le long du gradient, (D) plan d'échantillonnage de l'observatoire.

Echantillonnage

Les échantillonnages d'arthropodes ont été réalisés selon 3 méthodes dans la partie basse des placettes au niveau de la zone d'échantillonnage de l'ADN environnemental. Chaque méthode vise une hauteur spécifique de végétation.

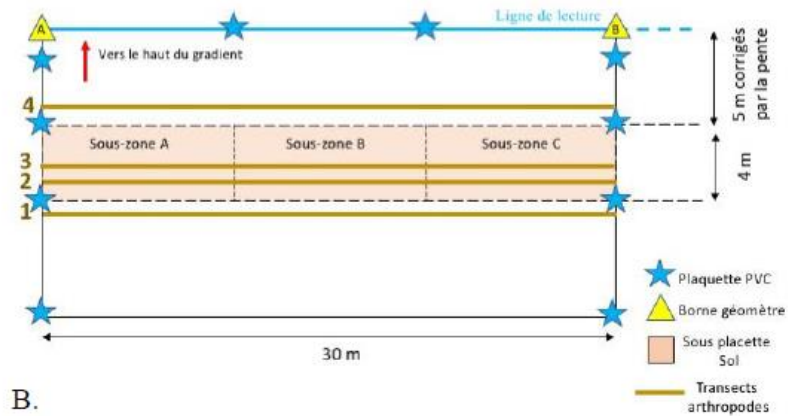
L'échantillonnage par aspiration vise la végétation basse entre 0 et 20 cm du sol. Dans les 3 sous-placettes (A, B et C, figure 2), 4 aspirations de 30 secondes sur des zones de 50 cm de diamètre (1, 2, 3 et 4, figure 2) permettent d'obtenir 4 échantillons représentatifs de la placette.



A.

Figure 2 : Echantillonnage avec la méthode "Aspirateur"

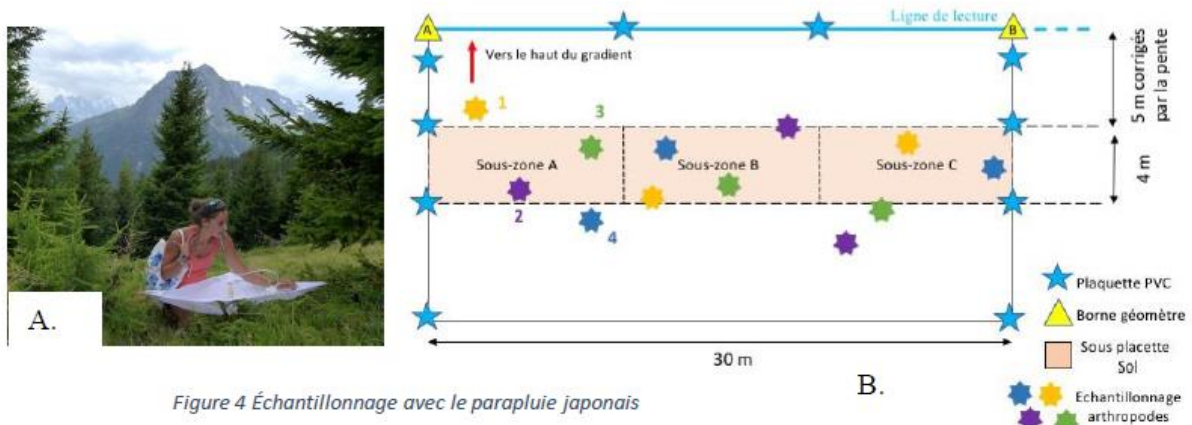
La méthode du filet-faucheur vise la végétation haute, entre 20 et 60 cm du sol. Dans les 3 sous-placettes (A, B et C, figure 3), 4 transects de fauchages parallèles à la ligne de lecture botanique (1, 2, 3 et 4, figure 3) sont réalisés, donnant 4 échantillons représentatifs de la placette.



A.

B. Figure 3 Échantillonnage avec la méthode "Filet-faucheur"

La méthode du parapluie japonais permet d'échantillonner la végétation au-dessus de 60 cm du sol. Dans les 3 sous-placettes (A, B et C, figure 4), sur 4 arbres (1, 2, 3 et 4, figure 4) de diamètres inférieurs à 10 cm ou avec des branches, sont donnés 2 coups secs pour faire tomber les arthropodes dans le parapluie japonais. Les arthropodes sont ensuite aspirés et transférés dans un tube à l'aide d'un aspirateur à bouche.



Du fait de la puissance de l'aspirateur, les échantillons récupérés par aspiration sont fortement composés de litière végétale. On retrouve donc dans ces échantillons des individus entiers, de l'ADN dégradé du sol mais surtout beaucoup de débris végétaux (ADN de plantes et inhibiteurs de la PCR). Ces échantillons sont donc à part et sont nommés LIT pour litière. Ceux faits par parapluie japonais et filet-faucheur sont majoritairement composés d'individus entiers et sont donc nommés BULK. Pour le stockage, les échantillons ont été conservés dans de l'éthanol pendant 24 heures. Pour 3 des 4 échantillons on a drainé l'éthanol et remplacé par du silicagel, qui permet de finir de sécher les échantillons.

Extraction, amplification et séquençage

Nous avons extrait l'ADN des échantillons LIT en suivant un protocole sol classique (protocole sol Qiagen) dans du tampon phosphate.

Nous avons extrait l'ADN des échantillons BULK dans un tampon ATL avec de la protéinase K, une enzyme de lyse cellulaire, en suivant un protocole tissus adapté aux arthropodes (protocole tissus Qiagen).

L'ADN de chaque échantillon a été amplifié en utilisant trois marqueurs (Fig 5). Les échantillons LIT avec les marqueurs Arth02, CO1c et Euka02, les échantillons BULK avec les marqueurs Arth02, CO1c et CO1L.

		MARQUEUR			
		COC1	Arth02	Euka02	CO1L
ECHANTILLON	LIT	X	X	X	
	BULK		X	X	X

Figure 5 : Répartition des marqueurs par échantillons

Après séquençage, les données ont été nettoyées grâce à un pipeline bio-informatique qui utilise le logiciel OBITools. Le nettoyage a été affiné en utilisant le package metabaR du logiciel R (Figure 6).

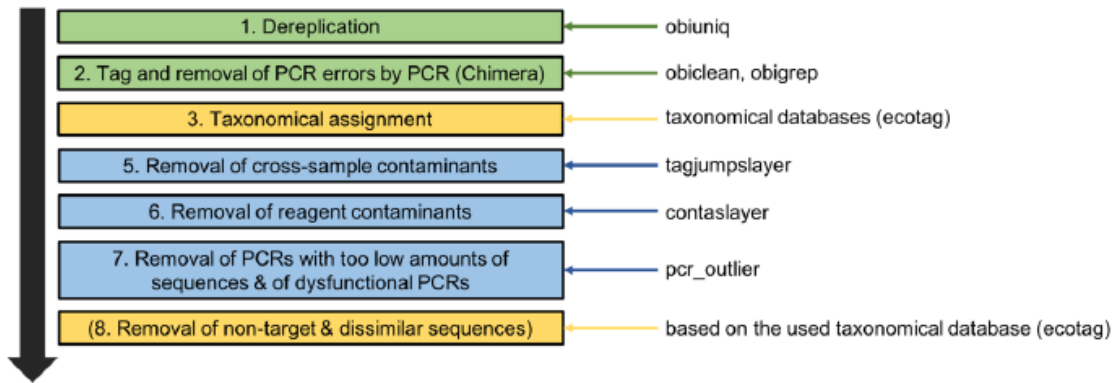


Figure 6 : Pipeline bioinformatique pour l'instant. En vert, les étapes avec obiTools ; en jaune les étapes avec ecotag ; en bleu, les étapes avec R

Indices de mesures

Les analyses de cette étude se basent sur des mesures de diversités alpha et bêta. La diversité alpha représente la richesse spécifique d'un milieu. Elle est calculée grâce à l'indice de Shannon.

La diversité bêta mesure la diversité ou dissimilarité d'espèces entre deux milieux. On la calcule grâce à l'indice de Sorensen qui ne prend pas compte de l'abondance. Pour prendre en compte l'abondance des espèces, elle est calculée avec l'indice de Bray-Curtis.

Résultats

Les marqueurs révèlent-ils les mêmes structures intracommunautaires ?

CO1c est un des marqueurs qui détecte le plus de MOTUs et celui qui identifie les plus précisément les taxons qui y sont associés.

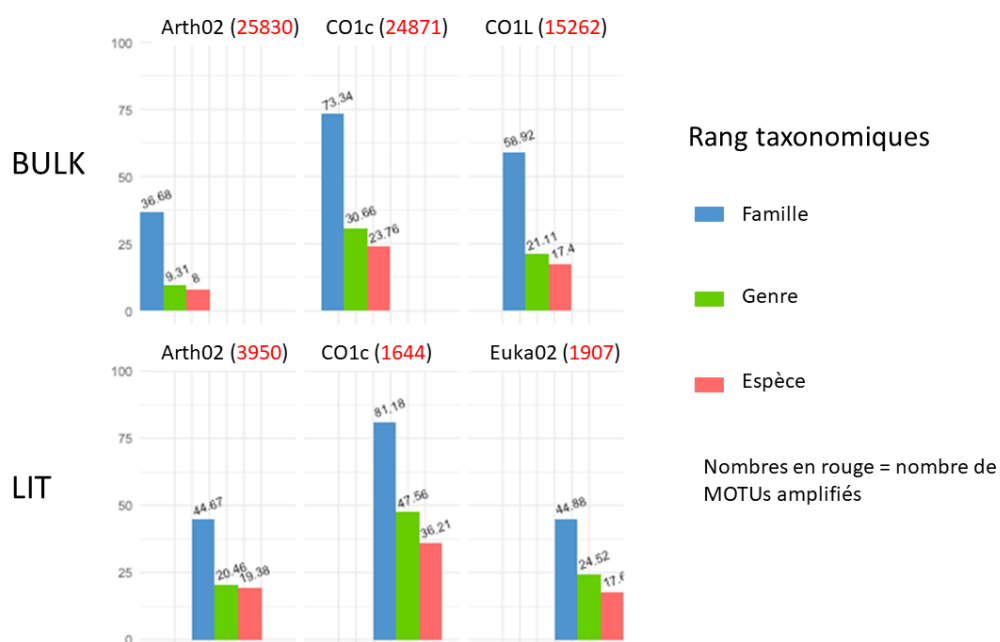


Figure 7 : Pourcentages des MOTUs assignés à l'espèce, au genre et à la famille pour les marqueurs Arth02, CO1c et Euka02 sur des échantillons environnementaux de litières (LIT, extraction avec protocole sol) et pour les marqueurs Arth02, CO1c et CO1L sur des bulks d'arthropodes (BULKs, extraction avec protocole tissu).

Les marqueurs qui ont amplifié l'ADN des échantillons de litière détectent beaucoup moins de MOTUs qu'avec les échantillons BULK. En effet, à marqueurs équivalents, ils détectent 6,5 à 15 fois moins de MOTUs avec les échantillons LIT que BULK.

Pour les échantillons BULK, CO1c est le marqueur qui permet le plus fréquemment d'assigner un MOTU à la famille, au genre et à l'espèce avec 43% en moyenne de MOTUs identifiés à ces rangs. CO1L et Arth02 permettent un peu moins fréquemment d'assigner les MOTUs à ces rangs, avec respectivement 32 et 18% de MOTUs assignés à la famille, au genre et/ou à l'espèce en moyenne.

Pour les échantillons LIT, c'est aussi CO1c qui permet d'assigner le plus de MOTUs à la famille, au genre et à l'espèce avec 55% de MOTUs assignés à ces rangs en moyenne. Ensuite viennent les marqueurs Euka02 et Arth02 avec respectivement 29 et 28% de MOTUs assignés à la famille, au genre et/ou à l'espèce en moyenne.

Pour les deux types d'échantillons cependant, c'est le marqueur Arth02 qui permet de détecter le plus grand nombre de MOTUs.

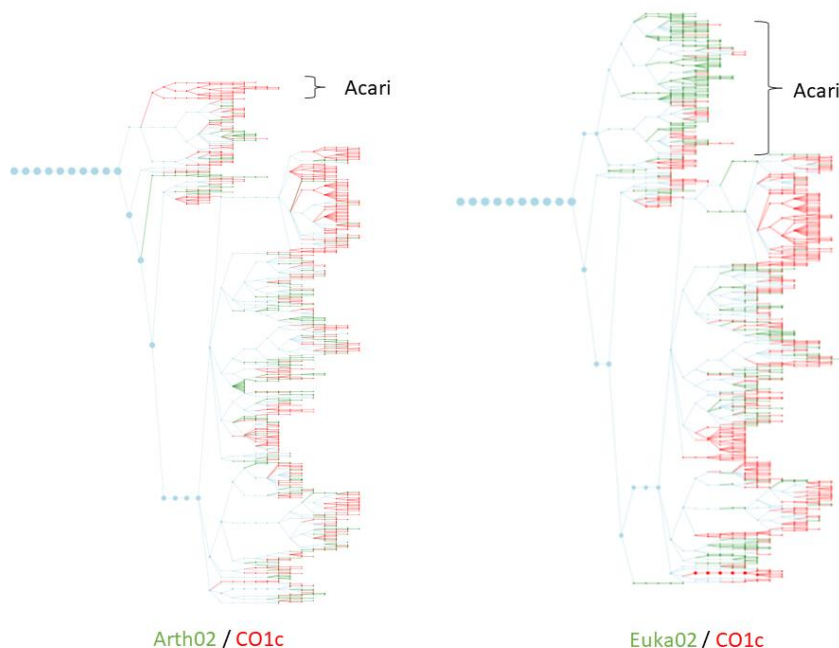


Figure 8 : Arbres de comparaison d'arbres taxonomiques de deux marqueurs. Comparaison des arbres taxonomiques de Arth02 avec CO1c (à gauche) et de Euka02 avec CO1c (à droite) sur les échantillons de litière (LIT).

Le marqueur CO1c est celui qui permet les meilleures assignations taxonomiques (i.e. le plus de MOTUs assignés à des rangs taxonomiques proches de l'espèce). Pour chaque comparaison et chaque type d'échantillons CO1c retrouve la grande majorité des taxons détectés par les 2 marqueurs. CO1L est proche de CO1c en terme de précision des assignations taxonomiques, cependant il retrouve moins de taxons. Arth02 est le seul marqueur à retrouver des *Crustacés* et un groupe de *Diptères* non identifiés. Tous les marqueurs détectent des *Arachnides* en faible proportion sauf Euka02 qui en détecte beaucoup plus que les autres et surtout plus d'*Acari*.

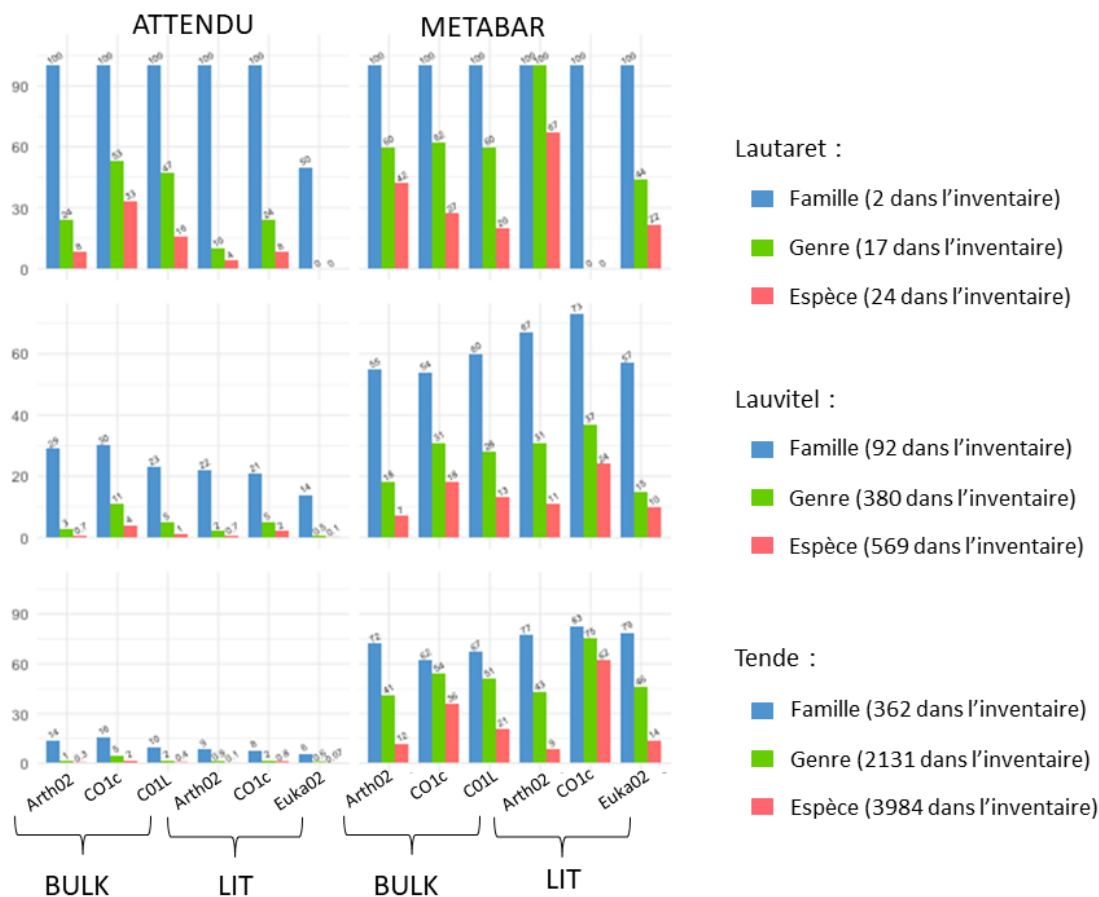


Figure 9 : Comparaison des espèces, genres et famille identifiés par nos marqueurs avec les espèces, genre et familles identifiés lors d'inventaires exhaustifs faits sur 3 gradients ORCHAMP (Lautaret, Lauvitel et Tende). Sur les gradients du Lauvitel et de Tende les inventaires ont été réalisés sur tous les Arthropodes par des spécialistes. Sur le gradient du Lautaret l'inventaire à été réalisé par une classe de M2 sur les Orthoptères. Les inventaires exhaustifs du Lautaret et de Tende ont été réalisés respectivement sur l'ensemble de la réserve biologique intégrale du Lautaret et sur l'ensemble du parc naturel du Mercantour, dans lesquelles se trouvent les gradient ORCHAMP. Les nombres de taxons identifiés pendant l'inventaire sont indiqués entre parenthèses. Proportion des taxons des inventaires exhaustifs communs aux taxons observés par metabarcoding de l'ADNe (ATTENDU, panel de gauche). Proportion des taxons observés par metabarcoding de l'ADNe communs aux taxons identifiés par les inventaires exhaustifs (METABAR, panel de droite).

96% en moyenne des espèces identifiées lors des inventaires exhaustifs ne sont pas retrouvées par le metabarcoding de l'ADN environnemental (Fig 9, panel "ATTENDU"). En effet, aucun marqueur ne détecte plus de 33% des espèces référencées par les inventaires, et une grande majorité des marqueurs détecte plutôt entre 0 et 10% des espèces référencées. Par ailleurs les marqueurs détectent en moyenne 22, 58 et 77% de MOTUs assignés à une espèce, à un genre ou à une famille qui ne sont pas référencés dans les inventaires exhaustifs. Sur l'inventaire du Lautaret le marqueur Arth02 ne détecte que 33% d'espèces non inventoriées. Sur l'inventaire de Tende le marqueur CO1c détecte 38% d'espèces non inventoriées.

Sur l'inventaire du Lautaret, où la méthode d'échantillonnage est connue, les marqueurs ne retrouvent que 11,5% des espèces de l'inventaire en moyenne.

Les marqueurs révèlent-ils les mêmes structures intercommunautaires ?

Globalement, les variations de la structure des communautés détectées par les différents marqueurs sont très similaires.

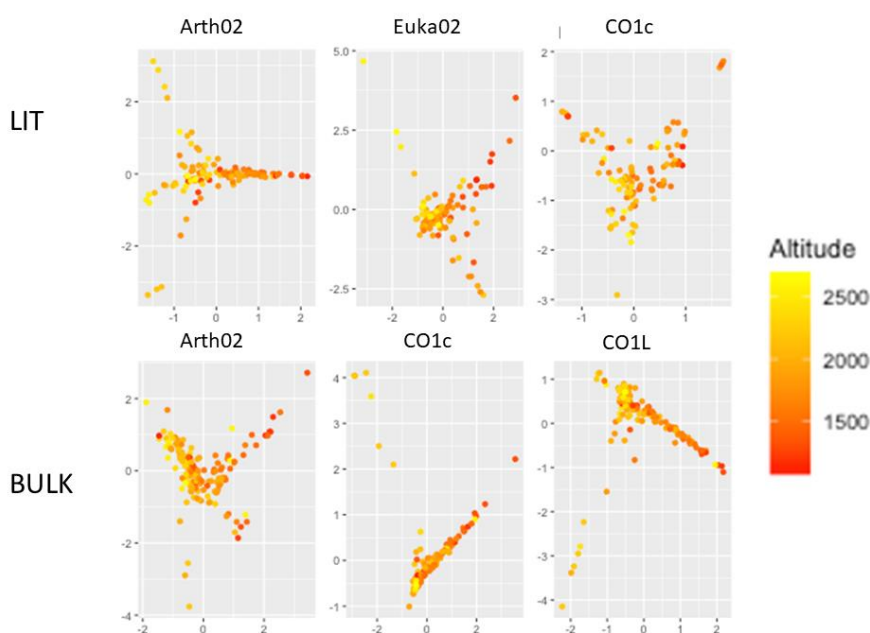


Figure 10 : AFC des placettes ORCHAMP pour les marqueur Arth02, Euka02 et CO1c sur les échantillons de litière (LIT, panel du haut) et Arth02, CO1c et CO1L sur les échantillons bulk (BULK, panel du bas) en fonction de leur altitude. Les points représentent les placettes ORCHAMP et la distance qui les sépare représente leur similarité de composition.

Pour les deux types d'échantillons, tous les marqueurs tendent à montrer que les placettes de haute altitude ont des compositions proches, ce qui est moins le cas pour les placettes de moyenne et basse altitude.

Pour les échantillons BULK, les marqueurs CO1c et CO1L montrent exactement les mêmes tendances. Cependant, le marqueur Arth02 montre plus de variabilité de compositions au sein des placettes de moyenne altitude.

Pour les échantillons LIT, CO1c et Euka02 montrent également des tendances proches. Cependant, pour le marqueur Arth02, la tendance est très différente, avec une grande variabilité dans la composition des placettes de moyennes/hautes altitudes.

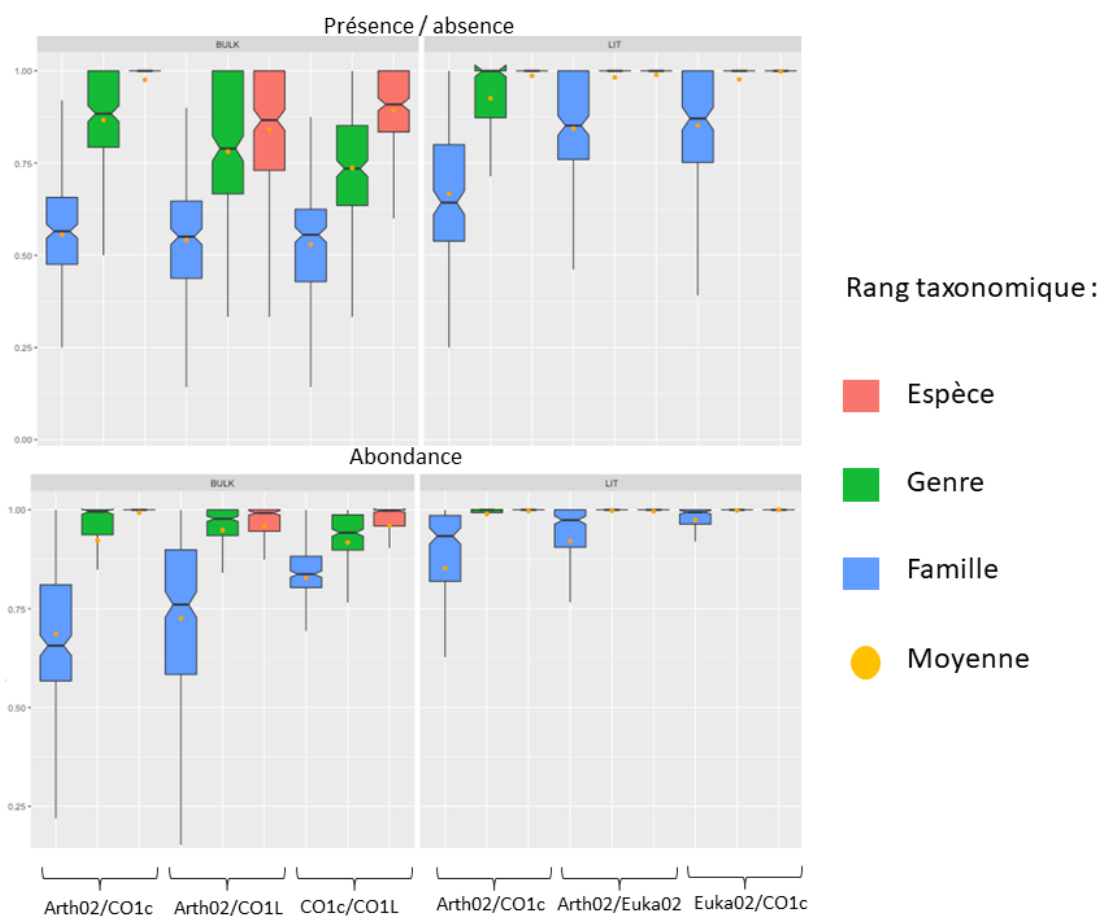


Figure 11 : Diversité bêta moyenne au rang de l'espèce, genre et famille pour la même placette, entre 2 marqueurs, sur les échantillons BULK (panel de gauche) et LIT (panel de droite). La diversité bêta est calculée selon l'indice de Sorensen (Présence/absence, panels du haut) et l'indice de Bray-Curtis (Abondance, panels du bas).

Comme attendu, toutes les comparaisons de marqueurs montrent plus de différences entre marqueurs entre les genres que les familles, et entre les espèces que les genres. Cette tendance se présente pour tous les types d'échantillons.

On remarque des différences plus importantes lorsqu'on donne plus de poids aux taxons abondants (indice de Bray-Curtis). Cette tendance montre que pour tous les marqueurs les espèces communes entre marqueurs ne sont pas abondantes.

Quels impacts des conditions environnementales sur ces structures sont révélés par les marqueurs ?

De manière générale, les marqueurs montrent les mêmes évolutions des compositions de communautés en fonction des conditions environnementales.

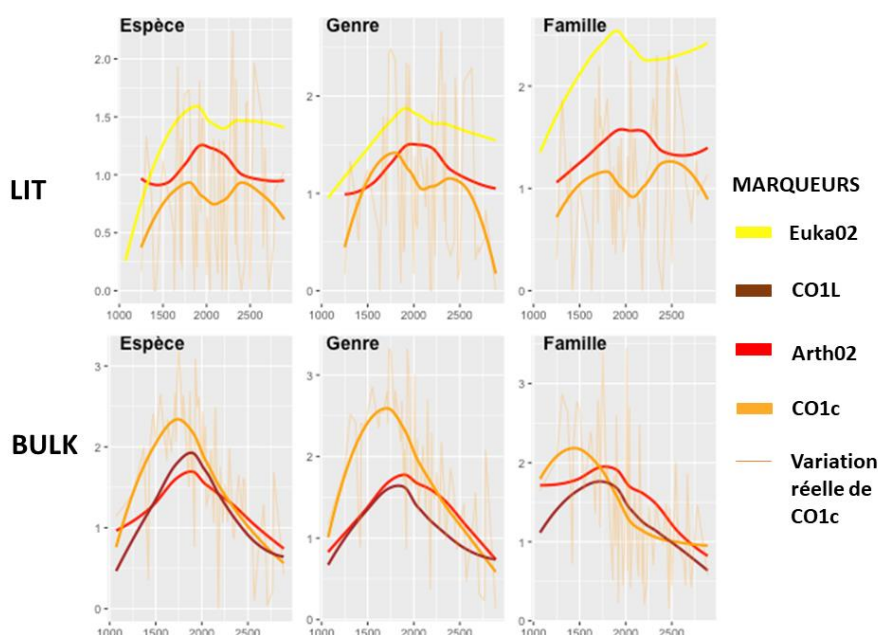


Figure 12 : Tendence de la diversité alpha (Shannon) en fonction de l'altitude pour les marqueurs Arth02, CO1c et Euka02 sur les échantillons de litière (LIT, panel du haut) et Arth02, CO1c et CO1L sur les échantillons bulk (BULK, panel du bas). La diversité alpha est calculée au rang de l'espèce, du genre et de la famille. La variation réelle de la diversité alpha selon l'altitude pour le marqueur CO1c est représentée par une ligne fine.

Pour les échantillons BULK, pour tous les marqueurs, la diversité alpha des arthropodes suit une courbe en cloche et est maximale aux altitudes intermédiaires. Dans le cas du marqueur CO1, la diversité est maximale pour des altitudes plus basses que dans le cas des autres marqueurs (pic de diversité respectivement à 1600m et 1900m).

Pour les échantillons LIT, on a des tendances différentes pour chaque marqueur. Dans le cas des marqueurs Arth02 et Euka02, la diversité alpha atteint son maximum pour des altitudes intermédiaires, et on trouve une plus grande diversité alpha aux altitudes élevées qu'en basse altitude. Dans le cas du marqueur CO1C, la diversité alpha en fonction de l'altitude est bimodale, avec un pic à 1700 mètres d'altitude et un autre à 2400 mètres.

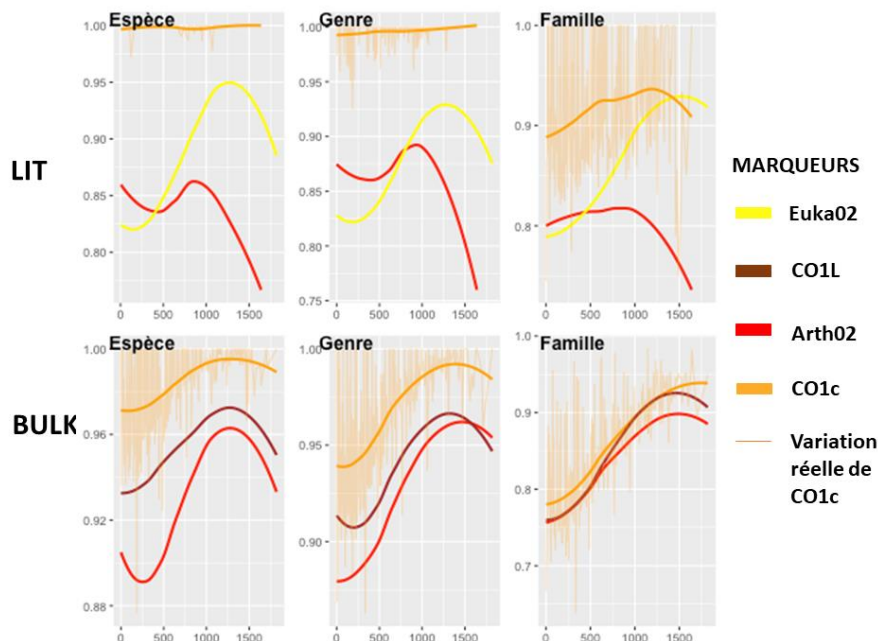


Figure 13 : Diversité bêta (Sorensen) en fonction de la différence d'altitude pour les marqueurs Arth02, CO1c et Euka02 sur les échantillons de litière (LIT, panel du haut) et Arth02, CO1c et CO1L sur les échantillons bulk (BULK, panel du bas). La diversité bêta est calculée au rang de l'espèce, du genre et de la famille. La variation réelle de la diversité bêta selon l'altitude pour le marqueur CO1c est représentée par une ligne fine.

Pour les échantillons BULK, tous les marqueurs montrent une augmentation de la dissimilarité en fonction de la différence d'altitude. Cependant, CO1c a toujours des valeurs de dissimilarité de composition plus importantes que les autres marqueurs.

Pour les échantillons LIT, les variations de dissimilarités détectées par CO1c varient très peu au rang de l'espèce en restant proche de 1. Ceci est dû au fait que le marqueur CO1c ne détecte peu d'espèces sur ces échantillons.

Euka02 présente les mêmes tendances que Arth02 et CO1L avec une décroissance sur les grandes différences d'altitude et une atténuation aux rangs du genre et de la famille. Arth02 présente un pic de dissimilarité autour de 900 mètres de différence d'altitude puis une décroissance.

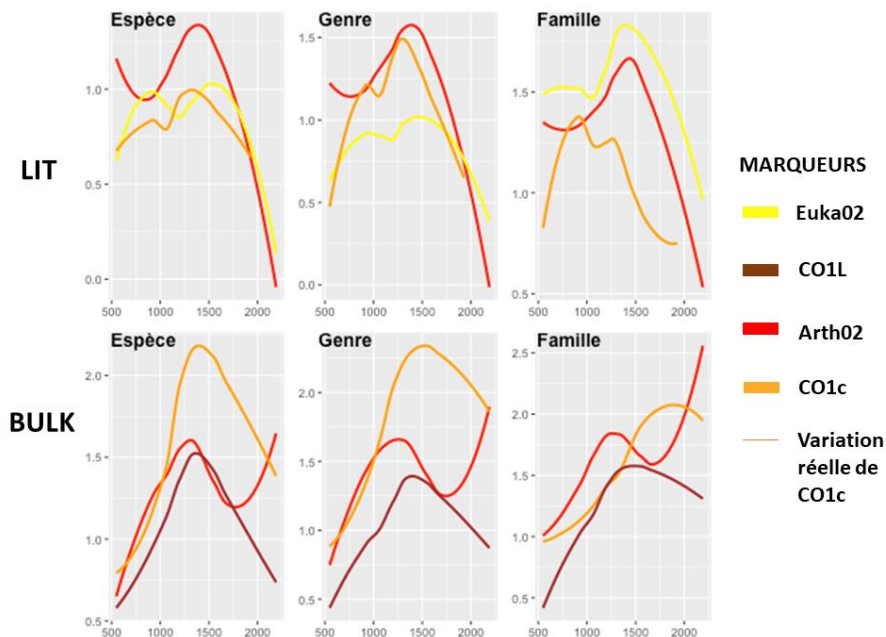


Figure 14 : Courbes de tendances de l'évolution de la diversité alpha (Shannon) en fonction du GDD (Growing Degree Day) à 1 cm pour les marqueurs Arth02, CO1c et Euka02 sur les échantillons de litière (LIT, panel du haut) et Arth02, CO1c et CO1L sur les échantillons bulk (BULK, panel du bas). La diversité alpha est calculée au rang de l'espèce, du genre et de la famille.

Sur les échantillons BULK les marqueurs CO1L et CO1c montrent un pic de diversité alpha autour de 1400 °C/an puis une décroissance. CO1c montre des valeurs de diversité alpha plus fortes que les autres marqueurs. Arth02 montre une tendance différente avec un pic vers 1350 °C/an puis une deuxième forte croissance de diversité alpha à partir de 1700 °C/an .

Sur les échantillons LIT les marqueurs Arth02 et CO1c montrent un pic de diversité alpha à 1400 °C/an tandis que Euka montre 2 pics à 900 °C/an et 1500 °C/an. Au rang de la famille Euka ne montre plus que 1 pic à 1500 °C/an .

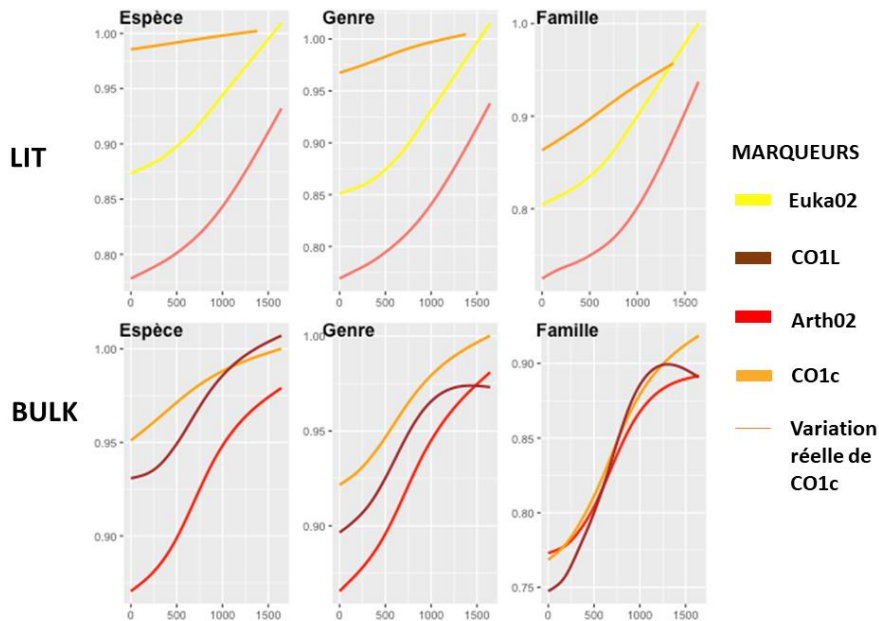


Figure 15 : Courbes de tendances de l'évolution de la diversité bêta (Sorensen) en fonction du GDD (Growing Degree Day) à 1 cm pour les marqueurs Arth02, CO1c et Euka02 sur les échantillons de litière (LIT, panel du haut) et Arth02, CO1c et CO1L sur les échantillons bulk (BULK, panel du bas). La diversité bêta est calculée au rang de l'espèce, du genre et de la famille.

Sur les échantillons LIT et BULK tous les marqueurs montrent une croissance continue de la dissimilarité de composition en fonction de la différence de GDD. CO1c est le marqueur présentant les plus hautes valeurs de dissimilarités.

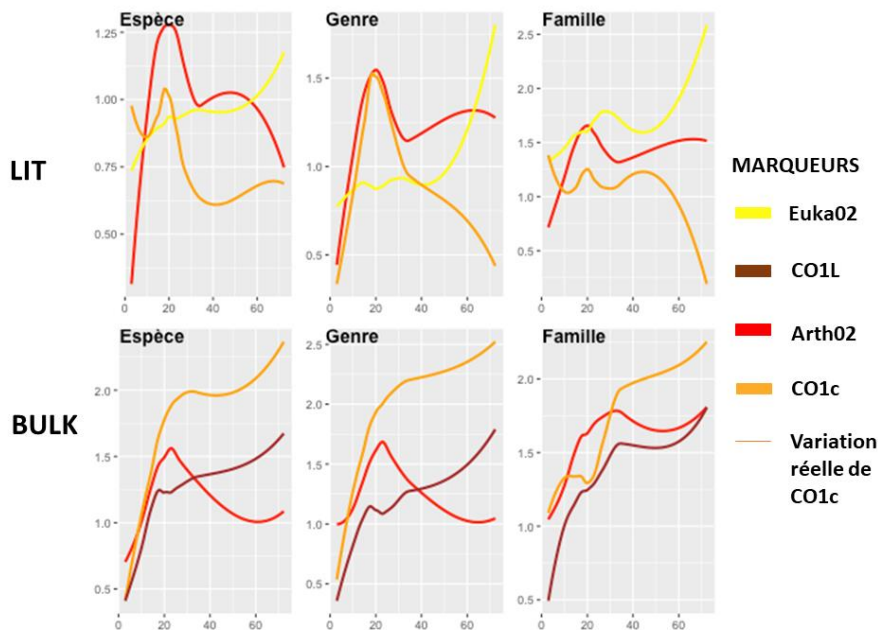


Figure 16 : Courbes de tendances de l'évolution de la diversité alpha (Shannon) en fonction de la quantité de matière organique après tamisage à 2 mm, pour les marqueurs Arth02, CO1c et Euka02 sur les échantillons de litière (LIT, panel du haut) et Arth02, CO1c et CO1L sur les échantillons bulk (BULK, panel du bas). La diversité alpha est calculée au rang de l'espèce, du genre et de la famille

Sur les échantillons BULK, les marqueurs CO1c et CO1L montrent une croissance de la diversité alpha en fonction de la matière organique (MO). En revanche, dans le cas du marqueur Arth02 la diversité alpha est maximale pour des valeurs intermédiaires de MO. La tendance montrée par Arth02 semble se rapprocher de celle de CO1L et CO1c au rang de la famille.

Sur les échantillons LIT, Arth02 et CO1c présentent un pic à 20% de MO puis une forte décroissance. Euka, cependant, montre une tendance semblable à celle des marqueurs sur les échantillons BULK.

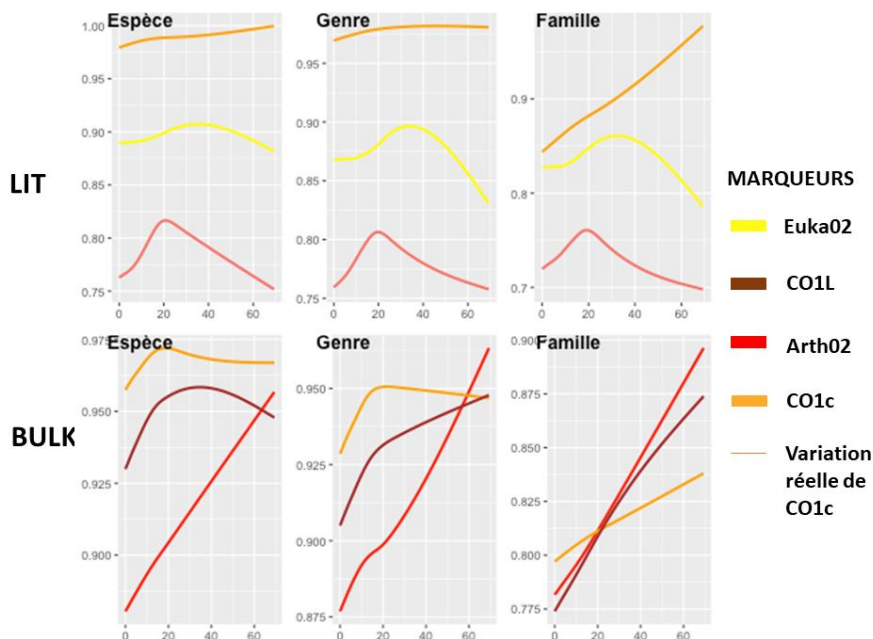


Figure 17 : Diversité bêta (Sorensen) en fonction de la quantité de matière organique après tamisage à 2mm, pour les marqueurs Arth02, CO1c et Euka02 sur les échantillons de litière (LIT, panel du haut) et Arth02, CO1c et CO1L sur les échantillons bulk (BULK, panel du bas). La diversité bêta est calculée au rang de l'espèce, du genre et de la famille.

Chez les échantillons BULK, les marqueurs montrent une croissance linéaire en se rapprochant du rang de la famille. CO1c montre des valeurs de dissimilarité plus hautes que les autres marqueurs. Chez les échantillons LIT seul CO1c montre une tendance de croissance linéaire. Euka02 et Arth02 présentent un pic de dissimilarité aux différences de MO basses et moyennes.

Discussion

Inventaires exhaustifs

La comparaison entre les taxons détectés par les marqueurs et ceux détectés par les inventaires exhaustifs nous interroge sur les causes de la faible proportion de marqueurs attendus détectés. En effet, les 2 méthodes ne font pas preuve du même effort d'échantillonnage. Les inventaires exhaustifs sont faits par des spécialistes des taxons étudiés, pendant un temps long et surtout sur des zones vastes. Nos échantillons ont été prélevés sur des placettes de 30 X 30 mètres avec des temps d'échantillonnages courts. La faible proportion d'espèces référencées par les inventaires, retrouvés par le metabarcoding de l'ADN environnemental peut être dû soit à la faible efficacité des marqueurs, soit à la différence d'effort d'échantillonnage.



Difficultés d'échantillonnage

Par ailleurs, certaines placettes sont plus difficiles à échantillonner du fait du type de végétation en présence. Sur certaines placettes la végétation est dense (ex. rhododendron) rendant l'échantillonnage par aspiration inefficace. Par ailleurs l'échantillonnage par filet faucheur a posé 2 problèmes. D'une part les transects font fuir les insectes, et d'autre part sur les placettes en pente le filet faucheur se vide. Plusieurs éléments laissent penser que l'échantillonnage par aspiration s'est avéré peu efficace dans l'ensemble. On remarque que le nombre de MOTUs détectés chez les échantillons LIT est beaucoup plus bas avec les échantillons LIT que BULK.

Échantillons litières

L'ADN environnemental des échantillons bulk n'ont pas été amplifiés par Euka02. De ce fait, et à cause de la probable inefficacité de l'échantillonnage par l'aspirateur, nous ne pouvons pas tirer de conclusions sûres de l'efficacité de ce marqueur.

Par ailleurs, le fait que les marqueurs ne retrouvent que très peu des espèces inventoriées (*Fig 9*), même sur l'inventaire du Lautaret où la méthode d'échantillonnage est connue, peut s'expliquer de 2 manières. Soit les marqueurs ne détectent que très peu des espèces présentes dans l'échantillon, soit la méthode d'échantillonnage est mauvaise et ne permet pas de récolter efficacement l'ADN environnemental.

Conclusion

CO1c est, parmi les 4 marqueurs étudiés, celui qui est le plus performant pour le métabarcoding de l'ADN environnemental chez les Arthropodes pour des échantillons de litière et des échantillons bulk. En effet sur les 2 types d'échantillons CO1c détecte presque autant que le marqueur Arth02 mais il y associe un taxon plus fréquemment (*Fig 7 et 8*). Ces taxons sont également plus souvent déjà référencés que pour les autres marqueurs (*Fig 9*). Par ailleurs CO1c montre systématiquement des tendances cohérentes des structures intercommunautaires (*Fig 10 et 11*). Il démontre également des tendances cohérentes sur l'impact des conditions environnementales sur les structures communautaires (*Fig 12, 13, 14, 15, 16 et 17*).

CO1L fait preuve de caractéristiques proches de celles de CO1c mais il détecte moins de MOTUs et les associe moins fréquemment (*Fig 7 et 8*) et avec moins de certitude (*Fig 9*) à un des trois niveaux taxonomiques étudiés.

Euka ne détecte pas autant de MOTUs que CO1c et associe moins fréquemment un des niveaux taxonomiques étudiés à ces MOTUs (*Fig 7, 8*). En revanche, Euka est de loin le marqueur qui détecte le plus Acariens et les Arachnides en général (*Fig 8*).

Arth02 détecte le plus de MOTUs, en revanche il les associe rarement aux trois niveaux taxonomiques étudiés (*Fig 7 et 8*) et ces MOTUs sont peu référencés (*Fig 9*). Il montre également une évolution de



structures communautaires en fonction du GDD et de la MO différentes des autres marqueurs (*Fig 14 et 16*).