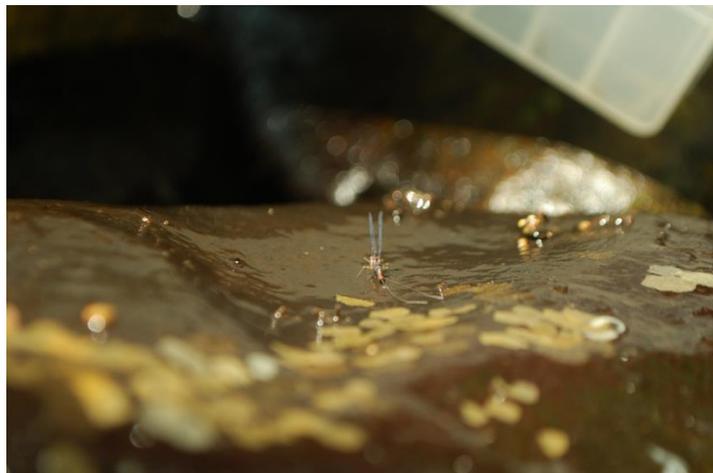


Accord cadre ZABR-Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse



Rapport final du projet DispEff

Estimation des distances de dispersion effective des insectes en cours d'eau par l'analyse moléculaire et isotopique de leurs œufs



Thème Flux - Formes - Habitats - Biocénoses (FFHB)

Site Vallée de l'Ain Confluences

Equipes de recherche « ZABR » concernées :

INRAE – unité RiverLy : M. Alp, E. Jaulin, U. Disdier, H. Sandquist, T. Detry, M. Forcellini, B. Launay

UMR 5023-Lyon 1-LEHNA : M. Floury, L. Simon, S. Dolédec



Table des matières

1. Introduction	2
2. Matériel et Méthodes	4
2.1 La zone d'étude : le cours d'eau de Buizin	4
2.2 Le choix des groupes taxonomiques étudiées.....	5
2.3 L'expérience de marquage isotopique.....	6
2.4 L'échantillonnage des adultes et des masses d'œufs.....	7
2.5 Le barcoding génétique	9
2.6 Les analyses isotopiques et l'estimation des distances de dispersion.....	10
3. Résultats	12
3.1 Estimation des distances de dispersion des <i>Baetis</i> spp. avec les approches isotopiques.....	12
3.2 Les variations interindividuelles en morphologie des ailes de <i>Baetis</i> spp.....	15
3.3 La diversité des masses d'œufs échantillonnés sur le Buizin	16
4. Discussion	18
4.1. La dispersion effective réalisée par les adultes de <i>Baetis</i> spp.	18
4.2 Mieux connaître les masses d'œufs d'insectes aquatiques	19
4.3 Perspectives opérationnelles.....	19
5. Remerciements	20
6. Bibliographie	21
7. Communications sur les résultats du projet.....	24

1. Introduction

Organisés dans des réseaux dendritiques avec un fort gradient des conditions physiques entre l'amont et l'aval, les cours d'eau imposent de fortes contraintes sur les organismes qui les habitent. Aujourd'hui exposés à une multitude de pressions anthropiques dont les effets continueront à s'accroître (Carpenter et al 2011), ces milieux reçoivent une attention toute particulière des politiques publiques avec l'établissement de réservoirs biologiques et des obligations légales imposant de réaliser des opérations de restauration pour protéger la biodiversité qu'ils accueillent (LEMA 2006). Dans ce contexte, le rôle primordial de la connectivité des réseaux fluviaux permettant les échanges entre les populations au sein des réseaux et assurant la (re)colonisation des habitats a été reconnu par de multiples travaux scientifiques (Tonkin et al., 2014 ; Hughes 2007 ; Crabot 2019), et la prise en compte des processus de dispersion paraît indispensable pour prédire les futures distributions des espèces dans les bassins versants (Heino et al. 2017).

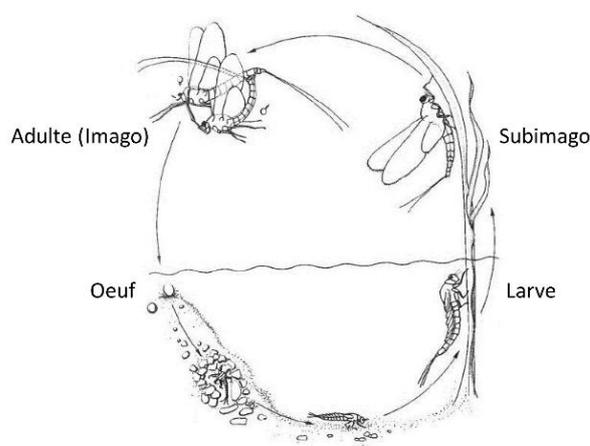


Figure 1 Le cycle de vie complexe des éphémères avec une larve qui se développe dans les milieux aquatiques, l'émergence des milieux aquatiques dans les milieux terrestres, la métamorphose de larve en subimago puis en adulte (imago) terrestre et finalement la reproduction et le retour à l'eau au stade œuf. Source d'image : Studemann 1992.

La difficulté tient à notre compréhension des processus de dispersion, encore largement incomplète pour beaucoup d'organismes, notamment ceux avec des cycles de vie complexes, comme les insectes aquatiques qui possèdent plusieurs stades de vie, d'une durée et avec des traits morphologiques et comportementaux très différents (Heino et al. 2017 ; Figures 1 et 2). Une approche souvent employée dans les modèles de distribution des espèces consiste à utiliser des traits biologiques liés à la dispersion comme indicateurs de leur capacité de déplacement et comme base pour estimer les distances moyennes de dispersion (e.g. Radinger et al., 2017 ; Sarremejane et al 2020). Une limite importante de cette approche est qu'elle se base sur une capacité potentielle de déplacement, tandis que le processus qui nous intéresse est celui d'une dispersion permettant une colonisation effective des taches d'habitat (Lancaster & Downes 2017). Pour beaucoup d'insectes aquatiques, c'est le stade terrestre réalisant une dispersion aérienne et assurant la reproduction qui joue un rôle clef dans ce processus (Hughes 2007).

Alors qu'il existe des travaux sur les distances franchies par les larves d'insectes aquatiques (Elliott, 2003), celles parcourues pendant la phase aérienne adulte restent très peu connues. La reproduction est le but ultime de la dispersion des adultes. Cependant, du fait d'une certaine difficulté d'échantillonnage et de reconnaissance, les œufs d'insectes ont jusqu'ici été très peu étudiés, notamment pour la bioindication. Il s'agit pourtant d'une phase critique pour repérer la présence ou l'absence avérée d'une espèce dans une localité (e.g. Peckarsky et al., 2000).

Malgré les challenges de l'étude de dispersion des insectes aquatiques, certaines techniques sont toutefois disponibles. Des méthodes directes telles que celle dite de capture-marquage-recapture permettent de suivre un individu pour mesurer une distance de dispersion, mais restent complexes lors d'étude des insectes en raison de leur taille réduite et applicable plutôt en laboratoire (Lieutier et al., 1986). D'autres méthodes indirectes peuvent être employées telles que l'étude de marqueurs moléculaires pour analyses la structure génétique de populations (Baguette et al., 2013) ou le marquage isotopique (Briers et al., 2004; Caudill, 2003; Macneale et al., 2005). Dans ce dernier cas, la base du

réseau trophique (les producteurs primaires) des milieux aquatiques où vivent les larves est marquée isotopiquement, permettant d'identifier l'origine d'un individu adulte émergé du site marqué et capturé à une distance donnée de celui-ci (Macneale et al., 2005).

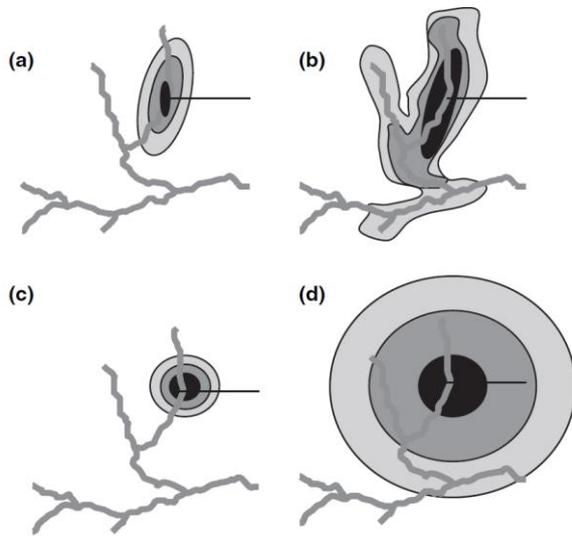


Figure 2 Les types de patrons de la distribution attendues pour les adultes des différentes espèces des insectes aquatiques selon leur capacité et mode de dispersion dans les milieux terrestres. Le gradient de couleurs indique la probabilité de détection avec les couleurs plus sombres correspondant à un plus grand nombre d'individus détectés. La capacité et le comportement de dispersion doivent fortement influencer ces patrons avec un gradient des capacités de dispersion et des comportements (a-d) : entre les petites et grandes distances de dispersion et entre les espèces qui se dispersent principalement le long de cours d'eau et celles qui s'éloignent plus de cours d'eau lors de leur dispersion. Source : Macneale et al (2005).

Dans le cadre du projet RBio II, un projet s'inscrivant dans la deuxième phase d'expertise des réservoirs biologiques du bassin Rhône-Méditerranée, une expérience de marquage par enrichissement en isotope stable du réseau trophique (^{15}N) a été mise en place au printemps 2021 pour tracer les déplacements les adultes marqués de plusieurs espèces d'insectes aquatiques. S'appuyant sur cette expérience, nous nous sommes intéressés dans le cadre du projet DispEff à un stade de vie moins étudié, celui des œufs, pour estimer une distance de dispersion dite « effective », définie cette fois comme la distance entre la zone d'enrichissement et le lieu de ponte. Les objectifs du projet DispEff étaient non seulement de tester l'utilisation des masses d'œufs pour une estimation de distance de dispersion effective par les adultes (femelles) des insectes aquatiques (**Objectif 1**), mais aussi d'améliorer notre capacité de détermination des œufs des insectes aquatiques (**Objectif 2**). Les analyses génétiques (barcoding) complétant les analyses isotopiques dans le projet DispEff ont permis de travailler à l'échelle d'espèce pour les deux objectifs.

Les principaux questionnements posés dans le projet DispEff pour l'**Objectif 1** étaient les suivants :

Q1 : Est-ce que l'enrichissement isotopique des insectes au stade larvaire résulte dans un enrichissement des masses d'œufs au stade adulte ?

Q2 : Est-ce que les distances de dispersion estimées avec les adultes marqués concordent avec celles estimées avec les masses d'œufs marquées ?

Ces deux questions ont été abordées avec une analyse isotopiques des adultes et des œufs récoltés à des distances différentes amont et aval du site de marquage isotopique. Ces analyses se sont focalisées sur un genre d'éphémères, *Baetis* sp, dont les masses d'œufs sont facilement identifiables et pouvaient être échantillonnées dans le nombre suffisant tout le long de notre site d'étude. Nous avons profité de cette occasion pour ajouter un petit volet exploratoire au projet et regarder le degré de la diversité des paramètres de la morphologie des ailes au sein de la même population et le degré de corrélation entre ces paramètres et la distance de dispersion estimés pour les adultes à l'aide de marquage isotopique.

Le travail prévu pour répondre à l'**Objectif 2** visait d'explorer la diversité taxonomique des masses d'œufs fixés sur les substrats de ponte et donc facilement échantillonnables sur un exemple d'un cours d'eau de tête de bassin versant (Le Buizin, site de l'expérience isotopique). Combinant l'échantillonnage sur le terrain, la caractérisation des sites de ponte, la photographie de terrain et la description de la morphologie des masses d'œufs avec des analyses génétiques, nous avons visé d'améliorer notre

capacité de détermination des œufs d'insectes aquatiques et poser une première brique dans la description de leur diversité à l'échelle d'un site.

Un stage Master (E. Jaulin), un stage licence (U. Disdier) et un stage volontaire (H. Sandquist) ont été réalisés dans le cadre du projet DispEff (voir l'Appendice pour les rapports de stage).

2. Matériel et Méthodes

2.1 La zone d'étude : le cours d'eau de Buizin



Figure 3 Le Buizin dans le bassin versant de l'Albarine. Le carré représente la zone d'étude.

Tout terrain dans le cadre du projet DispEff a été réalisé sur le Buizin (45°56'56.0"N 5°19'49.8"E), un affluent de l'Albarine dans le bassin versant de l'Ain (Figure 3). Depuis sa source à Souclin (740 m au-dessus du niveau moyen de la mer) jusqu'à la confluence avec l'Albarine (243 m au-dessus du niveau moyen de la mer) ce petit cours d'eau de premier ordre parcourt une distance de 12 km. Le Buizin s'écoule sur une formation calcaire jurassique et possède une section intermittente d'approximativement 2 km dans sa partie amont suivie par une section à écoulement pérenne qui s'étend jusqu'à la confluence avec l'Albarine. Le Buizin est listé comme refuge biologique (dans le sens de l'Article R214-108 CE) et une zone ZNIEFF du type 1 grâce à la présence de la truite fario (*Salmo trutta fario*) et de l'écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*), une espèce en danger, considérée comme un potentiel indicateur de bonne qualité d'eau (Füreder & Reynolds, 2003).

Un tronçon de 1.6 km de la partie pérenne du Buizin a été sélectionné comme principale zone d'étude. Le cours d'eau dans ce secteur parcourt une vallée incisée et boisée et n'a pas d'affluents majeurs. Il n'y a pas de station de jaugeage dans la zone d'étude, mais des débits de 10-90 l/s ont été mesurés ponctuellement en période de bas débit. La zone d'étude ne présente pas de point de rejet d'effluent et se trouve à 3 km en amont de la zone d'habitation la plus proche (la commune de Vaulx-en-Bugey), limitant les risques de contamination. Les vitesses d'écoulement varient, avec une succession des mouilles et de radiers. Dans sa partie aval, le lit du Buizin présente un mélange des graviers et des galets (substrats dominants), tandis que dans sa partie amont, les blocs sont un substrat co-dominant (selon le système U.S.C.S. de classification unifié des sols). La végétation est dominée par des arbres feuillus, avec une forte présence du bois mort dans le lit du cours d'eau (Figure 4).



Figure 4 Une photo du site d'étude, avril 2021

2.2 Le choix des groupes taxonomiques étudiées

Plusieurs raisons étaient à la base de la sélection des éphémères du genre *Baetis* comme espèce modèle pour l'étude des distances de dispersion par marquage isotopique et la comparaison des différents stades de vie. *Baetis* spp. a une phase de développement aquatique, qui représente la plus grande partie de son cycle de vie (1 à 3 années au stade larvaire), et une phase aérienne, beaucoup plus courte, durant 24 à 48 h (Studemann et al., 1992). Au stade larvaire, *Baetis* spp. est un racleur-brouteur, se nourrissant principalement de biofilm (Cummins, 1973 ; López-Rodríguez et al., 2008). Le stade adulte ne procède qu'à la dispersion aérienne, à la reproduction et à la ponte des œufs. Suite à la dernière métamorphose, les femelles de *Baetis* entrent dans un essaim des mâles, s'accouplent et puis quitte l'essaim pour se disperser jusqu'au lieu de la ponte (Brittain, 1982; Sartori & Brittain, 2015). A la fin de leur vol, les femelles de *Baetis* pondent une masse d'œufs en montrant un comportement de ponte très sélectif et pas observé dans d'autres genre d'éphémères (Elliott & Humpesch, 1980). Les femelles atterrissent sur des substrats (cailloux, blocs, bois) émergents dans des zones de fortes vitesses de courant (Benech, 1972; Elliott, 1972), rampent sous l'eau et déposent une masse d'œufs (Figure 5) sur la partie inférieure du substrat (Brittain, 1982; Eaton, 1888; Elliott, 1972; Encalada & Peckarsky, 2007; Bauernfeind & Soldan, 2013). Dans certains cas, les femelles ont aussi été observées de pondre sur des substrats entièrement submergés mais en contact avec un substrat émergent (Lancaster et al., 2010a). Suite à la ponte la femelle meurt sur place (Eaton 1888), est emportée par le courant (Elliott, 1972), ou quitte l'eau et s'envole (Eaton, 1888; Elliott, 1972).

Ce genre d'éphémère est très adapté comme objet d'étude dans le cadre d'une expérience d'enrichissement isotopique et ceci pour plusieurs raisons. Le biofilm est le premier compartiment de l'écosystème à s'enrichir en azote lourd (^{15}N). Il est donc attendu que le marquage soit particulièrement efficace pour les racleurs, et que leur signature isotopique soit conservée pendant la durée du stade adulte. Tout le stockage d'énergie chez *Baetis* s'effectue au stade larvaire, car au stade adulte, l'ensemble du système digestif des éphémères est atrophié, empêchant l'assimilation de nourriture. Ainsi on peut s'attendre que l'enrichissement isotopique peut persister jusqu'à la fin de la dispersion (et de vie) des adultes qui émergent des larves marquées. Les masses d'œufs de *Baetis* spp. sont faciles à trouver et à identifier visuellement sur le terrain ayant une forme caractéristique en « fer-à-cheval » (cf. Figure 5). Finalement, ce genre d'éphémère est très répandu en Europe et des espèces telles que *B. rhodani* et *B. alpinus* ont déjà été recensées sur le site d'étude par des échantillonnages préliminaires.

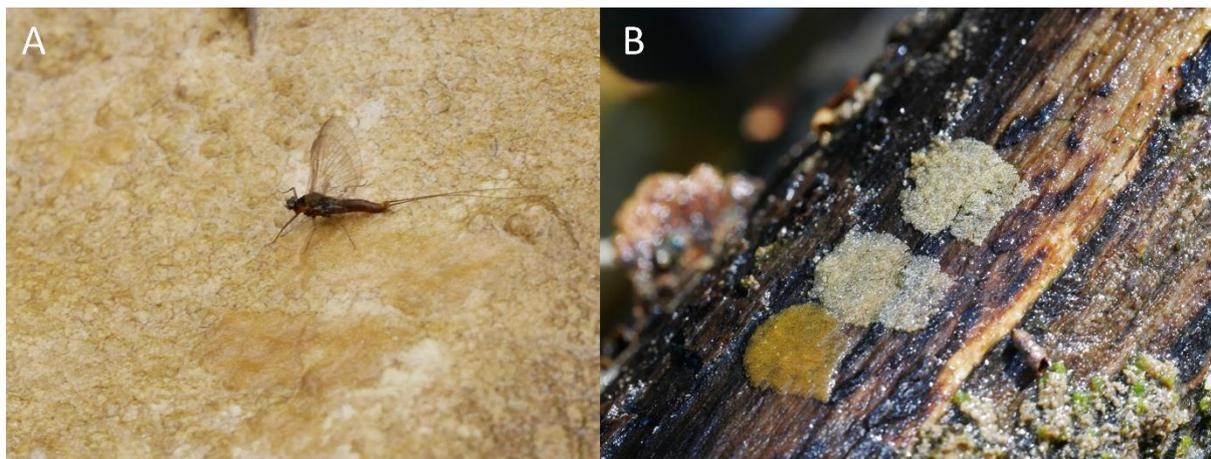


Figure 5 L'imago (A) et les masses d'œufs (B) des éphémères du genre *Baetis*. La femelle photographiée est en train de pondre une masses d'œuf sur le caillou au moment où il est retourné. Les masses d'œufs fraîchement pondues sont de couleur beige claire et en cours de leur développement prennent progressivement une couleur jaune foncée (B).

D'autres ordres d'invertébrés sont connus à fixer leurs masses d'œufs sur des substrats durs (bois morts, cailloux), les macrophytes et la végétation (Hinton 1981 ; Lancaster et al 2010b ; Alp et al 2013 ; Smith & Storey 2018). Parmi les insectes aquatiques se sont en particulier les espèces des ordres Trichoptères et Diptères qu'on pouvait s'attendre dans un petit cours d'eau de premier ordre comme le Buizin.

2.3 L'expérience de marquage isotopique

L'expérience d'enrichissement isotopique sur le Buizin a eu lieu au printemps 2021 (entre mars et mai), correspondant à la période principale d'émergence des éphémères (Brittain, 1982). Le principe de cette approche est d'ajouter à l'environnement des isotopes stables des éléments clés des molécules organiques (souvent la forme ^{15}N de l'azote) dans une forme biodisponible. L'intégration des molécules marquées par les producteurs primaires (biofilm, algues) résulte dans l'enrichissement isotopique artificiel de ces derniers : ils présentent une proportion élevée des isotopes stables plus rares par rapport à leur signature isotopique naturelle. D'autres maillons du réseau trophiques sont ensuite enrichis en ces isotopes (en première ligne des brouteurs des algues, mais aussi des filtreurs, des prédateurs, etc) (Peterson et al 1993). Les expériences précédentes ont montré que si les larves étaient enrichies dans la période précédant leur émergence, les stades adultes émergées étaient aussi enrichis isotopiquement et ainsi « marqués » par rapport à leur site d'émergence (Hershey et al 1993; Caudill 2003; Macneale 2004). Cependant aucune étude n'avait jusqu'à présent regardé si ce marquage était aussi préservé dans les masses d'œufs pondues par les femelles marquées.

La distance de dispersion estimée pour les individus marqués correspond à la distance réalisée depuis le site d'enrichissement jusqu'au lieu de capture (Figure 6). Cette estimation de distance est associée avec une certaine incertitude, dans la mesure où les adultes sont interceptés par les pièges avant d'atteindre leur destination finale (lieu de ponte pour les femelles). La direction du vol des adultes par rapport au site d'enrichissement n'est pas connue. L'échantillonnage des adultes et des masses d'œufs doit ainsi être réalisé en amont et en aval du site de marquage. Cependant suivant l'hypothèse de cycle de colonisation de Müller (1982), nous pouvions attendre, qu'afin de compenser la dérivation vers l'aval ayant eu lieu au stade larvaire, la dispersion au stade adulte serait principalement dirigée vers l'amont. En suivant cette hypothèse, un nombre plus important d'individus marqués serait attendu en amont du site de l'émergence (Figure 6).

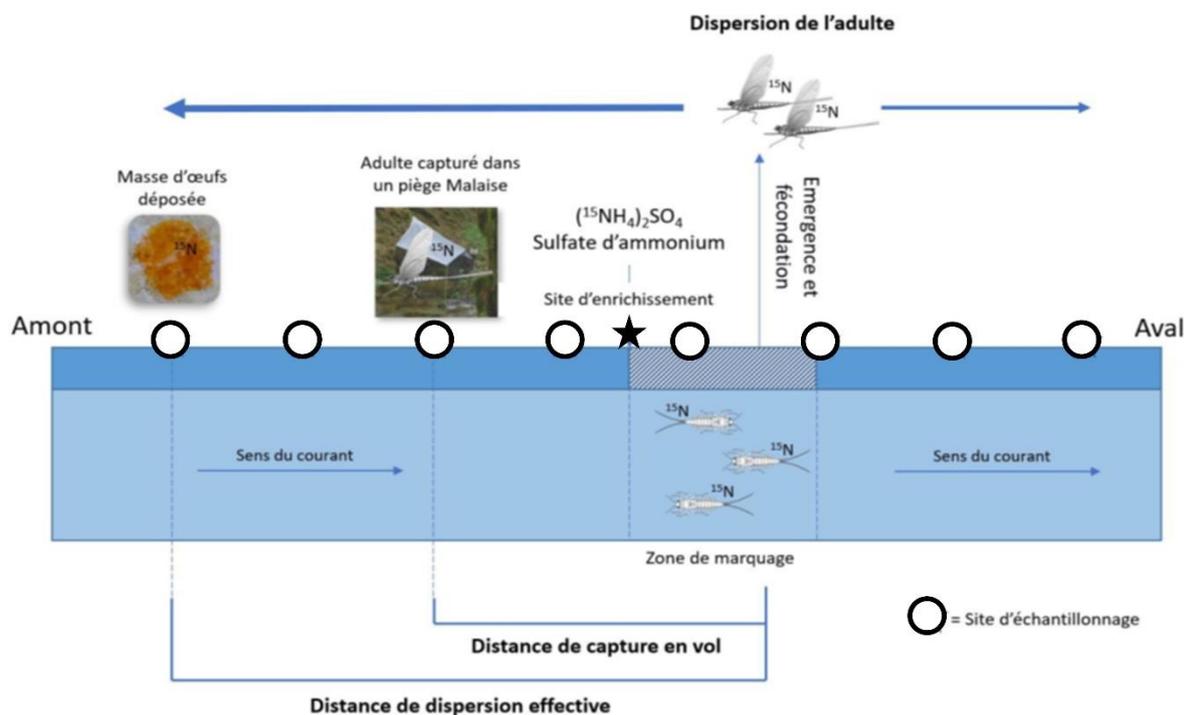


Figure 6 Schéma du principe de l'expérience isotopique avec une hypothèse de dispersion principalement amont des adultes. La zone de marquage isotopique des larves aval du point d'enrichissement est représentée en gris rayé. Les étoiles représentent les sites d'échantillonnage amont et aval de la zone de marquage.

Dans le cadre de l'expérience isotopique du projet RBio II, le sulfate d'ammonium enrichi en ^{15}N ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Eurisotop) a été ajouté à un taux d'égouttement constant à l'eau du Buizin. Le site d'enrichissement a été positionné approximativement au milieu de la zone d'étude et l'ajout de la solution enrichie a eu lieu pendant presque 7 semaines entre le 19 mars et le 11 mai 2021. L'expérience a été arrêtée suite à une crue décennale sur le Buizin en mai 2021. Le dosage journalier était d'approximativement 0.7 g (dilués dans 10 L de l'eau purifié) par jour. Pour surveiller l'efficacité de l'enrichissement isotopique du réseau trophique, les larves des éphémères de la famille Heptageniidae (broueteuses) ont été échantillonnées amont et aval du site d'enrichissement toutes les semaines à partir du début de l'expérience jusqu'au moment où un changement significatif de leur signature isotopique n'était détecté (10 jours suite au début de l'expérience). Une fois des larves enrichies étaient détectées, l'étendu spatial de la zone enrichie en ^{15}N (zone de marquage) était déterminée par un échantillonnage de biofilm et des larves de *Baetis* sp. 25 jours après le début d'expérience. Cet échantillonnage a été réalisée à 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 m aval ainsi que à un point amont du site d'enrichissement. A partir du moment, où l'enrichissement significatif de biofilm a été détecté, un échantillonnage hebdomadaire des adultes (projet RBio II) et des masses d'œufs (projet DispEff) a été réalisé sur le Buizin.

2.4 L'échantillonnage des adultes et des masses d'œufs

Les imagines des *Baetis* sp. ont été capturés avec les tentes Malaise (Malaise, 1937), installées sur 26 sites distribués amont et aval du site d'enrichissement (Figures 7 et 8). Les tentes Malaise étaient espacées de 50 m en proximité du site d'enrichissement et de 100 m en marge de la zone d'étude. Chaque tente était installée au milieu du lit de cours d'eau à 30-35 cm au-dessus de la ligne d'eau. Les deux ouvertures permettant de capter les insectes étaient orientées vers l'amont et vers l'aval permettant d'attraper des adultes qui volaient soit vers l'amont soit vers l'aval à la hauteur de 0.3-1.2 m au-dessus de l'eau. Les insectes capturés par la tente tombaient dans un récipient contenant l'éthanol. Les tentes Malaise étaient vérifiées 1-2 fois par semaine. Les échantillons récupérés ont été stockés en éthanol (96%) et ramenés au laboratoire. Une première détermination à la base des traits morphologique a été réalisée sous la loupe binoculaire. Une extrémité ou une tête a été gardé pour les analyses génétiques,

les ailes (si encore en bon état) ont été prélevées pour les analyses morphométriques. Le reste de l'échantillon a été réservé pour les analyses isotopiques.

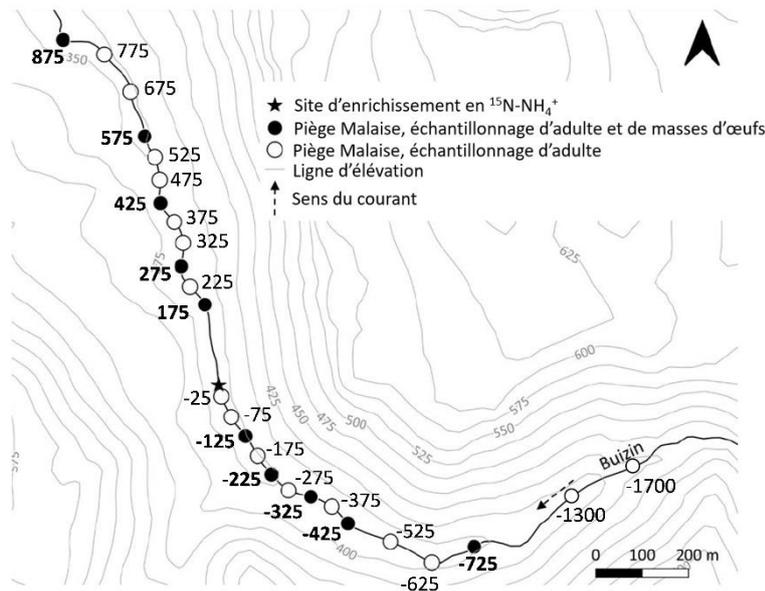


Figure 7 La distribution des sites de capture des adultes et des sites d'échantillonnage des masses d'œufs des insectes aquatiques sur la durée de l'expérience. Les valeurs correspondent aux distances entre les sites d'échantillonnage et le point d'ajout de ^{15}N représenté par une étoile. Les valeurs négatives correspondent aux sites situés amont et les valeurs positives aux sites situés aval du site d'enrichissement. Les tentes Malais (capture des adultes) ont été installées sur tous les sites représentés. Les masses d'œufs de *Baetis* spp. ont été échantillonnées dans une manière régulière que sur les sites en noir et occasionnellement sur les deux sites les plus amont (« -1300 » et « -1700 »).

De 26 sites échantillonnés d'une manière régulière pour les adultes des insectes (projet RBio II), 10 ont été échantillonnés pour les masses d'œufs (Figure 6) avec 8 sorties terrain « œufs » réalisées entre avril et septembre 2021 (dont 4 avant la crue décennale qui a arrêté l'expérience isotopique). Le choix de ses 10 sites était guidée i) par la diversité des potentiels substrats de ponte disponibles dans le lit de cours d'eau et en zones de berge et ii) par la distance par rapport au point d'enrichissement avec une distribution équilibrée des sites en amont et en aval de celui-ci (Figure 7).

Pour l'échantillonnage des masses d'œufs, les substrats susceptibles d'être utilisés pour la ponte (substrats minéraux de différentes tailles, bois mort, plantes) ont été examinés dans les 5-10 m autour de chaque tente Malaise (amont et aval de chaque tente). La typologie et les caractéristiques de chaque masse d'œufs trouvée, du substrat de ponte et de la position de la masse sur le substrat étaient décrits. Le plus long axe des substrats minéraux a été mesuré pour les classer en graviers (0.5-8 cm), galets (8-26 cm) et blocs (> 26 cm). Des échantillons des masses d'œufs étaient ensuite prélevés avec un scalpel ou une pincette et chaque masse d'œufs prélevée a été stockée individuellement dans un tube Eppendorf avec de l'éthanol à la concentration de 95%. Pour la détermination des distances de dispersion du genre *Baetis*, un effort a été fait pour équilibrer au maximum le nombre d'échantillons récoltés par site. Plus de 1000 échantillons de masses d'œufs au total ont ainsi été récoltés dont une centaine de masses d'œufs appartenant à d'autres groupes que *Baetis*. Plusieurs photos ont été prises sur le terrain pour chaque type de masse d'œufs échantillonné.



Figure 8 Echantillonnage des adultes et des masses d'œufs des insectes aquatiques sur le terrain. A gauche : une tente Malaise installée sur le terrain pour la capture des imagines. A droite : Prélèvement des masses d'œufs attachés aux blocs avec un zoom sur une masses d'œufs du genre *Baetis*.

2.5 Le barcoding génétique

503 échantillons d'adultes et 354 échantillons de masses d'œufs de *Baetis* spp. ont été soumis aux analyses génétiques par barcoding pour l'identification à l'espèce. Toutes les masses d'œufs autres que *Baetis* (N= 94) ont été incluses dans ces analyses.

Les échantillons sélectionnés pour les analyses génétiques étaient d'abord séparés de leur milieu de conservation (éthanol à 96%) pour réaliser les analyses génétiques. Soit deux pattes soit la tête (si extrémités manquantes ou trop abimées) ont été prélevées de chaque individu adulte. Pour les masses d'œufs, environ dix œufs ont été prélevés de chaque masse à la loupe binoculaire. Si une matrice gélatineuse (observée pour certains Trichoptères et certains Diptères) étaient présente, les œufs ont été séparés de celle-ci pour faciliter l'extraction d'ADN. Pour chaque échantillon, une solution Chelex 100 Resin (Bio-rad) à 7 % a été utilisée comme milieu d'extraction (Walsh et al., 1991), ainsi que de la Protéinase K à une concentration finale de 6,25 %, pour un volume final de 160 µl. Les échantillons ont ensuite été vortexés et centrifugés, avant d'être incubés dans un thermocycleur (Techne Prime Thermal Cycler) pendant 2 heures à 56 °C puis 15 minutes à 90 °C et enfin 5 minutes à 15 °C. Après ce cycle, les lysats étaient centrifugés et conservés à - 18 °C.

Le barcoding génétique a ensuite été utilisé pour déterminer l'espèce à laquelle appartenait chaque échantillon. Cette technique est basée sur l'analyse du gène mitochondrial COI (Cytochrome C Oxydase I), codant pour la sous-unité primaire de l'enzyme Cytochrome c oxydase, intervenant dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Folmer et al., 1994). Les compositions des amorces utilisées pour l'amplification du gène COI sont les suivantes : amorce sens (Forward) LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG- 3') et amorce anti-sens (Reverse) HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994). Une amplification du gène COI a été réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans un thermocycleur (Techne Prime Thermal Cycler). Le programme débutait par 3 minutes à 95 °C, suivies de 40 cycles de 20 secondes de dénaturation à 95 °C, 30 secondes d'hybridation à 51 °C puis 45 secondes d'élongation à 72 °C, terminant par 5 minutes à 72 °C. Le volume final de chaque échantillon était de 25 µl, avec une concentration finale pour chaque amorce de 0,4 µM. La concentration finale en dNTP (Eurobio Scientific GAEPCR11-5D) était de 0,8 mM et de 0,05 mg/ml pour l'albumine de sérum bovin (BSA) (Biolabs B9000S). Le tampon de réaction (Eurobio Scientific) a été utilisé à 1X comprenant 3 mM de MgCl₂. La polymérase (Eurobiotaq DNA Eurobio Scientific GAETAQ00-4D) a été utilisée à une concentration finale de 0,05 U/µl. Les produits PCR ont ensuite été analysés sur un gel agarose 1,3 %

(Eurobio) avec du GelRed (6X) avec un temps de migration de 20 minutes à 100 V dans une cuve d'électrophorèse. Les gels ont ensuite été observés au transilluminateur UV (UVIdoc HD6) pour visualiser les produits PCR. Le séquençage des produits PCR a été réalisé par un prestataire extérieur (Laboratoire Microsynth).

Les produits PCR ont été analysés par séquençage forward Sanger (Zimmermann et al., 1988). Les séquences ont été obtenues après trimming des bases de mauvaise qualité, à chaque extrémité pour améliorer le signal. Chaque séquence a ensuite été analysée par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur la plateforme NCBI (National Center for Biotechnology Information). Un BLAST a été réalisé sur la database nr/nt, avec un programme de recherche de séquences dites similaires. Chaque espèce a été confirmée en observant les différents paramètres : E-value, Bit score, pourcentage d'identité et de recouvrement (Altschul et al., 1990; Pertsemliadis and Fondon, 2001). Les séquences ayant des bit scores inférieurs à 50 n'étaient pas retenues (Pearson, 2013).

2.6 Les analyses isotopiques et l'estimation des distances de dispersion

Les œufs et les adultes confirmés comme appartenant au genre *Baetis* ont été analysés en isotopie. Les échantillons ont été rincés avec de l'eau purifiée pour enlever l'éthanol, conservés au congélateur à -18°C pour au moins 24h. pour ensuite être lyophilisés. Les autres types d'échantillons (larves, biofilm) ont été séchés à l'étuve à 65°C pendant 48h. L'ensemble des échantillons ont ensuite été lyophilisés (48h dans un lyophilisateur Christ Alpha 1-4 LDplus) pour enlever toute trace d'eau. Chaque échantillon lyophilisé a été pesé individuellement à la microbalance (Ultra-microbalance Sartorius SE2) pour préparer l'analyse au spectrophotomètre de masse (EA-IRMS : Elemental Analyzer Isotope-Ratio Mass Spectrometry). Les œufs et les adultes ont été mis en poudre individuellement et entre 500 et 600 µg de poudre ont été prélevés et déposés dans une capsule en étain (Elemental Microanalysis D1008). Les capsules ont été pliées et compactées avant d'être passées au spectrophotomètre de masse (Isoprime 100, Elementar), couplé avec un analyseur élémentaire (Vario PYRO Cube, Elementar), afin de déterminer leur ratio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Deux standards (témoins négatifs) sont utilisés au début et à la fin de chaque analyse : Aspartate-3 et Caséine. De plus, un standard d'Aspartate-3 (environ 500 mg) est mesuré tous les 10 échantillons.

Pour l'analyse des données isotopiques, un seuil, à partir duquel les échantillons des adultes et des œufs seraient considérés comme marqués, a dû être sélectionné. Cette sélection s'est fait sur trois critères :

1) la valeur du seuil devait être suffisamment haute pour distinguer la signature isotopique due à l'enrichissement de la variation des taux de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ observés dans les signatures isotopiques naturelles des organismes de cours d'eau (jusqu'à 10-20‰ ; Kendall 1998 ; Diebel & Vander Zanden 2009 ; Pastor et al 2013) ;

2) l'étendue de la « zone marquée » (zone source de la dispersion) selon le seuil devait être suffisamment restreinte pour aboutir à une précision satisfaisante des estimations des distances de dispersion ;

3) le nombre d'échantillons considérés comme « marqués » soit suffisamment haut pour assurer une certaine puissance statistique suffisante des données. Ainsi le choix d'un seuil trop conservateur résulterait dans une définition d'une zone marquée très restreinte permettant une très haute précision des estimations des distances de dispersion. En revanche peu d'individus seraient considérés comme marqués et la puissance statistique des données serait très faible. Le cas contraire serait de sélectionner un seuil trop bas qui résulterait dans une étendue très large de la « zone marquée » (basse précision des estimations de distances de dispersion) mais on nombre d'individus marqués haut.

L'équation d'advection-diffusion a été utilisée pour modéliser la probabilité de retrouver des individus marqués (y) en fonction de la distance du site de d'enrichissement (x):

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}$$

C'est une équation typiquement utilisée pour modéliser le cycle des nutriments dans les cours d'eau comportant leur transport vers l'aval (« nutrient spiralling » en anglais). Pour avoir une puissance statistique suffisante et une bonne couverture de l'espace en termes d'échantillonnage, la modélisation a été faite à l'échelle de genre *Baetis*. Que les données des 10 sites DispEff (échantillonnés pour les adultes comme pour les masses d'œufs) ont été incluses dans cette analyse.

2.7 Mesures morphométriques

Les ailes des adultes de *Baetis* spp. identifiés comme marqués isotopiquement ont été sélectionnés parmi les échantillons disponibles (ailes en bon état) pour les mesures morphométriques (N=24). Que les deux ailes antérieures ont été utilisées pour ces analyses. Chaque paire d'ailes a été étalée avec un pinceau sur une lame en verre transparent puis fixée avec un milieu de montage et recouverte d'une fine lamelle (Figure 9). L'échantillon ainsi fixé a été prise en photo sous une loupe binoculaire.

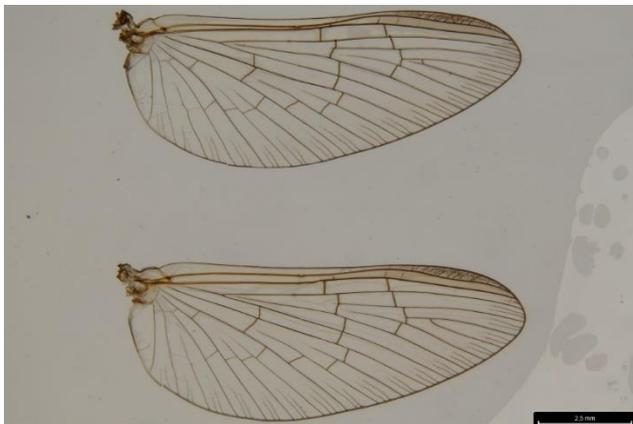


Figure 9 Les ailes antérieures d'une femelle de *Baetis* sp. fixées sous une lame pour les analyses morphométriques.

Après un ajustement de contraste pour faciliter les mesures, l'aire et la longueur (Figure 10) de chaque aile ont été mesurées avec le logiciel IMAGE J (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

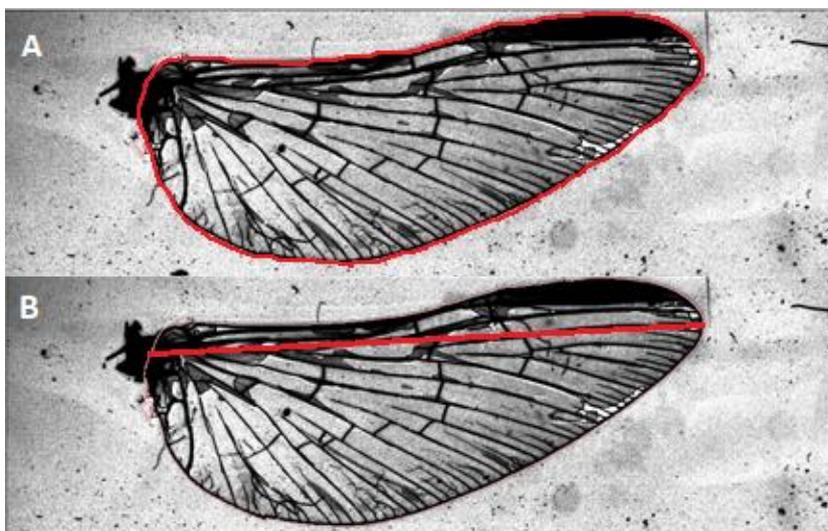


Figure 10 Estimation de la surface (A) et de la longueur des ailes (B) avec le logiciel IMAGEJ.

3. Résultats

3.1. Comportement de ponte des éphémères du genre *Baetis*

Les masses d'œufs de *Baetis* spp. ont été observées dans le site d'étude pendant toute la période d'expérience avec jusqu'à 124 masses d'œufs comptées sur un seul site par date d'échantillonnage. Une diversité de choix des substrats de ponte a pu être observée. Les masses d'œufs des *Baetis* spp. étaient fixées sur la partie submergée des substrats minéraux de toutes tailles échantillonnées (graviers, galets, blocs) ainsi que sur les branches et les troncs du bois mort. Les substrats de pontes se trouvaient dans les zones de fort et moyen courant avec des agglomérations de plusieurs masses (jusqu'à 30) observées sur des substrats de grande taille. Les masses d'œufs ont été trouvées majoritairement sur des substrats partiellement émergés, mais aussi occasionnellement observées sur des substrats complètement submergés. Deux espèces du genre *Baetis* ont été détectées morphologiquement (stade larvaire et adulte) et génétiquement (stade adulte et masses d'œufs) sur le Buizin sur la durée de l'expérience : *Baetis rhodani* et *Baetis alpinus*. La répartition de ces deux espèces dans les échantillons des adultes (capture avec les tentes Malaise) était très proche : 51.6% de *Baetis rhodani* et 48.4% de *Baetis alpinus*. En revanche, la majorité des échantillons des masses d'œufs identifiés à l'espèce appartenait à *Baetis rhodani* ce qui peut indiquer un possible biais d'échantillonnage. Ainsi lors des échantillonnages des masses d'œufs de *Baetis* spp. sur le terrain nous avons privilégié des masses d'œufs de plus grande taille pour avoir suffisamment de matériel biologique pour faire les analyses génétiques et isotopiques à la fois. Suite aux analyses génétiques, des sous-échantillons des masses d'œufs des deux espèces ont été comparés en termes de taille et morphologie (pour les détails voir le rapport Jaulin 2021 en Appendix). Cette analyse a démontré que les masses d'œufs de *Baetis rhodani* étaient significativement plus grandes que celles de *B. alpinus* avec une longueur moyenne de 8 ± 0.3 mm pour *B. rhodani* (N=39) et de 5.9 ± 0.4 mm pour *B. alpinus* (N=12). En revanche, pas de différence significative en termes des caractéristiques de substrat de ponte a été trouvé entre ces deux espèces (rapport Jaulin 2021). Les masses d'œufs des deux espèces ont ainsi souvent été retrouvées sur les mêmes substrats (Figure 11).



Figure 11 Masses d'œufs de *Baetis alpinus* et *Baetis rhodani* pondues sur le même substrat.

3.2 Estimation des distances de dispersion des *Baetis* spp. avec les approches isotopiques

L'expérience de marquage isotopique sur le Buizin (projet RBio II) a eu lieu entre mars et mai 2021. A partir de 10 jours après le début de l'expérience, un fort enrichissement en ^{15}N a été détecté d'abord pour le biofilm et ensuite pour les larves de *Baetis* spp. (Figure 12).

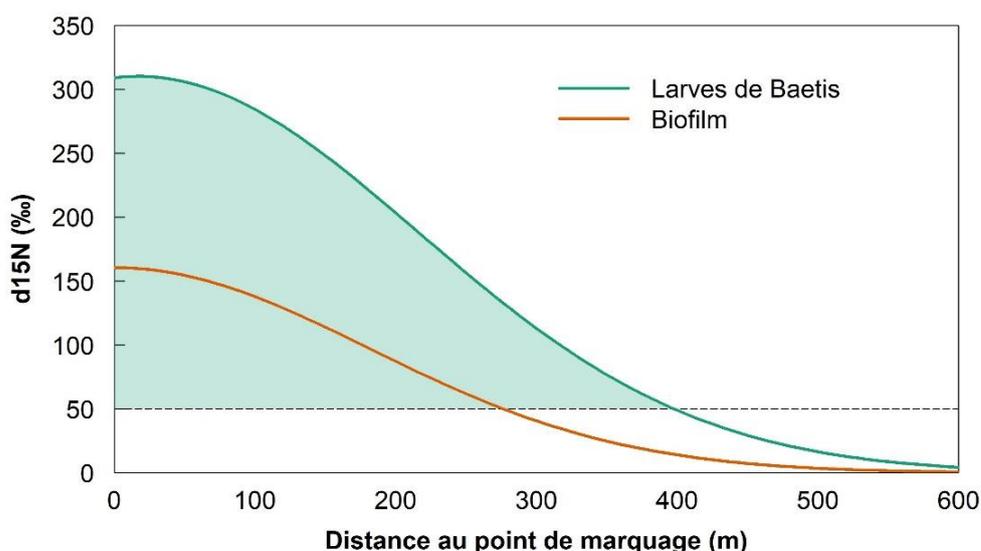


Figure 12 Distance de marquage isotopique (enrichissement de plus de 50 ‰) de biofilm et des larves aval de point d'ajout des $^{15}\text{N-NH}_4^+$ (point 0). La relation a été modélisée avec l'équation d'advection-diffusion.

505 adultes et 354 masses d'œufs de *Baetis* spp. ont été analysés au spectromètre. Nous avons exploré plusieurs seuils d'enrichissement en ^{15}N (Tableau 1) et avons sélectionné la valeur de 50 ‰ comme valeur limite à partir de laquelle nous avons considéré les échantillons marqués isotopiquement. Cette valeur permettait d'atteindre un équilibre entre l'étendue de la zone considérée comme marquée (400 m pour le seuil de 50 ‰), avec la précision recherchée pour les estimations des distances et le nombre d'échantillons déterminés comme marqués (111 pour les adultes et 53 pour les masses d'œufs). En prenant ce seuil, 22 % des adultes et 15% des masses d'œufs analysés étaient considérés comme marqués isotopiquement.

Tableau 1 Bilan des échantillons des adultes et des œufs considérés comme enrichies selon le seuil d'enrichissement.

Seuil d'enrichissement	> 95 ‰	> 150 ‰	> 50 ‰	> 10 ‰
Longueur de la zone de marquage selon le compartiment considéré				
Biofilm	60 m	180 m	270 m	430 m
Larves de <i>Baetis</i> spp.	250 m	310 m	400 m	500 m
Nombre d'échantillons marqués				
Adultes <i>Baetis</i> spp.	41	78	111	204
Masses d'œufs <i>Baetis</i> spp.	16	34	53	126

Les adultes et les masses d'œufs marqués ont été retrouvés sur toute l'étendue du site d'étude avec la plus grande distance de vol détectée pour la dispersion vers l'amont : sept adultes et une masse d'œufs marqués ont été retrouvés à 1300 m amont du site de marquage. Seulement deux adultes marqués ont été capturés à la marge aval de la zone d'étude (site « 875 » à 675 m aval du milieu de la zone de marquage), tandis que aucune masse d'œufs n'a été retrouvée plus loin que le site « 425 » (à 225 m aval du milieu de la zone de marquage).

La distribution des adultes et des masses d'œufs marqués des deux espèces de *Baetis* (*B. rhodani* et *B. alpinus*) dans la zone d'étude était très similaire avec un pic très prononcé pour les adultes dans la zone de marquage (Figure 13). La modélisation de la probabilité de capture en fonction de la distance du site de marquage a ainsi été réalisée pour l'ensemble des observations de *Baetis* spp. Cela a permis d'inclure les échantillons attribués au genre *Baetis* mais qui n'ont pas pu être identifiés à l'espèce. Pour cette analyse, la distance de dispersion (variable de réponse) a été calculée, comme la distance entre le point d'échantillonnage et le milieu de la zone de marquage (à 200 m aval du site d'enrichissement).

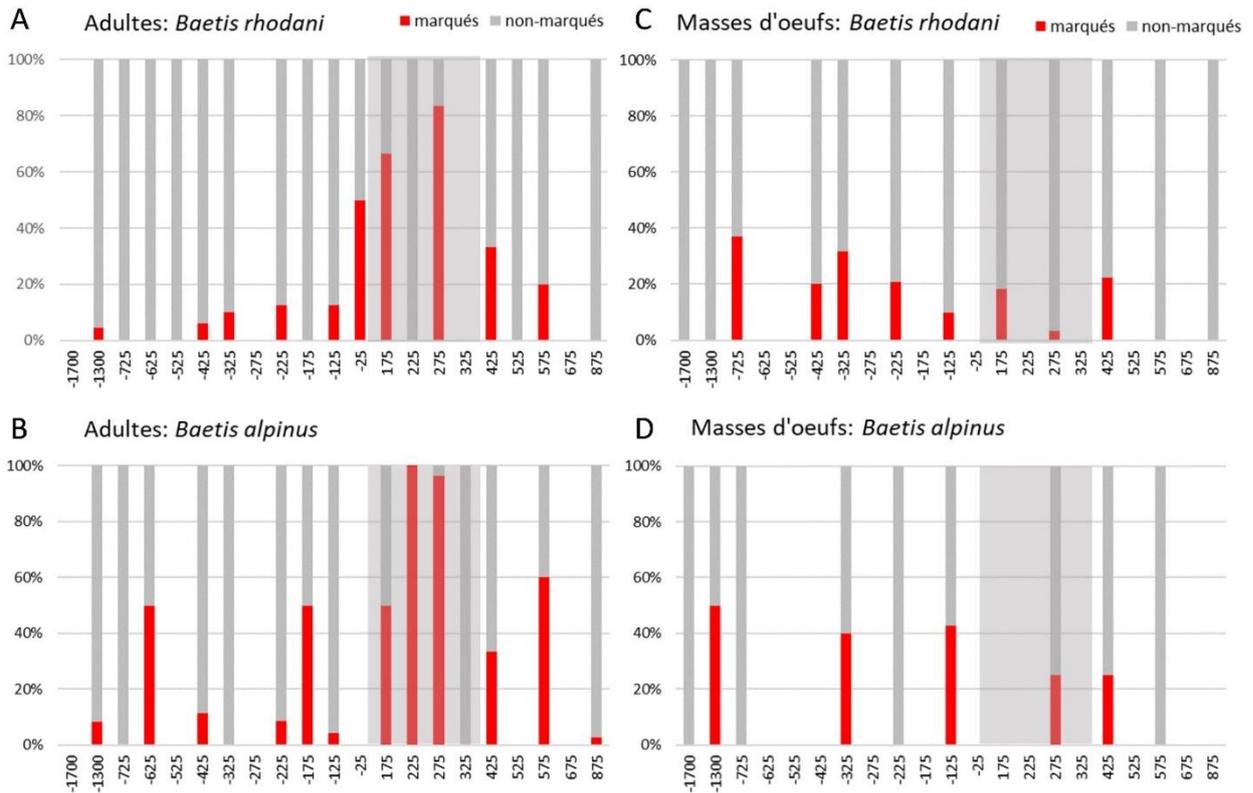


Figure 13 : La distribution des adultes et des masses d'œufs marqués des deux espèces de *Baetis* dans la zone d'étude. Les échantillons pour lesquels l'espèce n'a pas pu être déterminé ont été exclus de ce graphe. La zone marquée en gris semi-transparent sur chacun des graphes correspond à l'étendu du site de marquage (source de dispersion). Les valeurs sur l'axe X correspondent aux distances entre les sites d'échantillonnage et le point d'ajout de ^{15}N (ici point 0). Les valeurs négatives correspondent aux sites situés amont et les valeurs positives aux sites situés aval du point de marquage.

La modélisation de la probabilité d'échantillonnage des adultes et des masses d'œufs marqués a permis de mettre en avant les différences dans la distribution de ces deux stades de vie dans la zone d'étude (Figure 14). Pour les adultes le modèle ($R^2=0.93$, $\mu=60.28$, $\sigma=236.12$) prédisait une forte concentration des individus marqués en proximité de la zone de marquage. La distribution des masses d'œufs était décrite par une courbe beaucoup plus aplatie avec les maximums amont de la zone de marquage ($R^2=0.70$, $\mu=-694.1$, $\sigma=649.9$). Dans les deux cas une dissymétrie vers l'amont a été démontré, légère pour la courbe estimée à la base des adultes et très prononcée pour la courbe estimée à la base des masses d'œufs marquées (Figure 14).

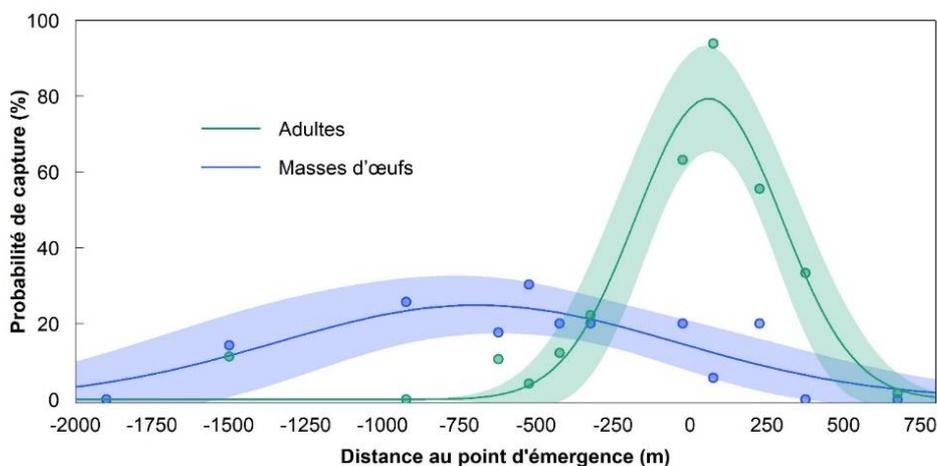


Figure 14 : Probabilité de retrouver des masses d'œufs ou des adultes de *Baetis* marqués en fonction de la distance par rapport au point au milieu de la zone de marquage (point 0). Axe X : les valeurs négatives correspondent aux détections amont de la zone de marquage, les valeurs positives correspondent aux détections aval de la zone de marquage. Le point « 0 » correspond au point au milieu de la zone de marquage définie à la base de la distribution des larves marquées de *Baetis* spp.

3.2 Les variations interindividuelles en morphologie des ailes de *Baetis* spp.

Les mesures réalisées sur les 25 paires d'ailes des individus marqués ont démontré une certaine variabilité des ailes en termes de morphologie. La longueur des ailes variait de 22 % avec des valeurs entre 8.6 et 11.1 mm. Elle était fortement corrélée ($R^2 = 0.97$) avec la surface moyenne de l'aile intérieure qui variait entre 23.4 et 40.5 mm². Une faible relation entre la distance de dispersion réalisée par l'adulte et la surface de l'aile antérieure a été détectée par une régression linéaire ($p = 0.05$) : avec les individus possédant des ailes de plus grande surface retrouvés plus en amont (Figure 15).

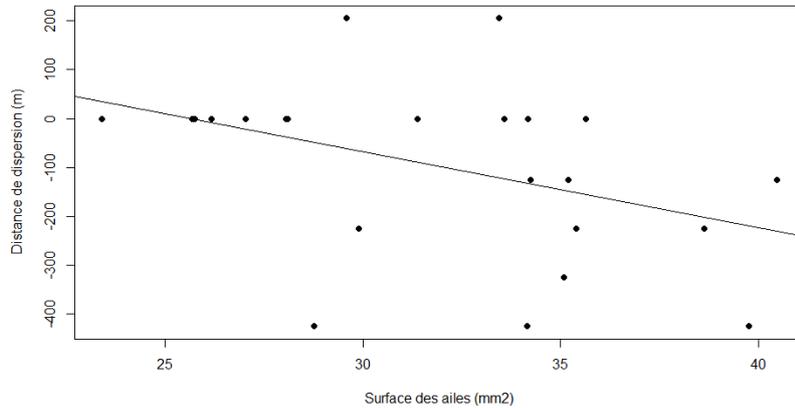


Figure 155 La distance de dispersion en fonction de la surface totale des ailes antérieures.

Cette analyse exploratoire basée sur un très faible nombre d'échantillons a démontré l'existence d'une variabilité interindividuelle non-négligeable en termes de la morphologie des ailes de *Baetis* spp. qui pourrait influencer la capacité de dispersion des individus.

3.3 La diversité des masses d'œufs échantillonnés sur le Buizin

38 masses d'œufs n'appartenant pas au genre *Baetis* ont pu être identifiées au rang taxonomique de l'espèce, 5 à celui du genre et 2 à celui la famille (Tableau 2). Les masses d'œufs restantes n'ont pas pu être identifiées soit car le gène COI n'a pas été correctement amplifié, soit par contamination de micro-organismes (e.g. algues, rotifères) sur les masses d'œufs. Parmi les masses d'œufs pour lesquelles l'identification a fonctionné, deux ordres principaux ont été identifiés : les Trichoptères (4 familles identifiées ; Tableau 2 ; Figure 16A) et les Diptères (2 familles identifiées ; Tableau 2, Figure 16B). Aucune espèce exclusivement aquatique n'a été détectée lors de cet échantillonnage, seulement des espèces d'insectes ayant un stade larvaire aquatique et un stade adulte aérien.

Tableau 2 Les espèces identifiées sur des masses d'œufs échantillonnées sur le cours d'eau du Buizin par barcoding génétique.

Ordre	Famille	Sous-Famille	Genre	Espèces identifiées	Nombre de masses d'œufs analysés
Trichoptera	Hydropsychidae	Hydropsychinae	<i>Hydropsyche</i>	<i>Hydropsyche instabilis</i>	9
			<i>Hydropsyche</i>	<i>Hydropsyche dinarica</i>	1
	Limnephilidae	Drusinae	<i>Drusus</i>	<i>Drusus annulatus</i>	8
	Philopotamidae		<i>Philopotamus</i>	<i>Philopotamus variegatus</i>	8
	Odontoceridae		<i>Odontocerum</i>	<i>Odontocerum albicorne</i>	2
Diptera	Chironomidae				2
		Orthoclaadiinae	<i>Orthocladus</i>		1
			<i>Cricotopus</i>		3
			<i>Parametriocnemus</i>	<i>Parametriocnemus stylatus</i>	3
		Prodiamesinae	<i>Prodiamesa</i>	<i>Prodiamesa olivacea</i>	1
		Tanypodinae	<i>Macropelopia</i>	<i>Macropelopia nebulosa</i>	5
	Dixidae	-	<i>Dixa</i>		1
	Dixidae	-	<i>Dixa</i>	<i>Dixa submaculata</i>	1

La phénologie de ponte n'était pas la même entre les différents taxons (Tableau 3). Ainsi les masses d'œufs de certains taxons comme *Hydropsyche instabilis* ont été échantillonnés que à une seule occasion d'échantillonnage (en juillet), tandis que les masses d'œufs d'autres comme *Philopotamus variegatus* pouvaient être observées pendant toute la période entre la fin du printemps et début d'automne.

Tableau 3 La phénologie des observations des masses d'œufs des différentes espèces sur le Buizin. Le gradient des couleurs met en avant le nombre d'échantillons récoltés à chaque campagne d'échantillonnage (une par mois).

Ordre	Espèce	Sites	avril	mai	juin	juillet	aout	septembre
Trichoptera	<i>Drusus annulatus</i>	-1300 : -725			1	1		6
	<i>Hydropsyche instabilis</i>	1700 : 425				9		
	<i>Hydropsyche dinarica</i>	-225	1					
	<i>Odontocerum albicorne</i>	-1300 : 425			1	1		
	<i>Philopotamus variegatus</i>	-725 : 425		1	4	2		1
Diptera	<i>Orthocladus sp.</i>	-325		1				
	<i>Cricotopus sp.</i>	425			1			2
	<i>Parametriocnemus stylatus</i>	275 : 425			2	1		
	<i>Chaetoclaadius perennis</i>	-125 : 425		1	4			
	<i>Prodiamesa olivacea</i>	-1300				1		
	<i>Macropelopia nebulosa</i>	-1300 : 175	2	1	2			
	<i>Dixa submaculata</i>	-325		1				

Les observations faites sur le terrain et les photographies prises lors de l'échantillonnage de ces masses d'œufs ont permis de constater une grande diversité morphologique avec des formes allant des rondes et sphériques jusqu'aux masses filiformes, avec ou sans présence d'une protection gélatineuse ainsi qu'avec la taille, la couleur et la disposition caractéristique des œufs visibles au sein des masses (Figure 16). Les caractéristiques morphologiques décrites pourraient être suffisantes pour distinguer facilement entre les ordres d'insectes étudiés ici (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera) et dans beaucoup de cas d'aller jusqu'à l'échelle de la famille voire genre.

Le matériel photographique rassemblé lors de cette étude a fait la base d'un petit « catalogue » photographique qui permet d'avoir un premier aperçu de la diversité des masses d'œufs des insectes aquatiques et potentiellement distinguer entre les grandes groupes (Annexe 3).



Figure 166 Masses d'œufs de différentes espèces d'insectes observées dans le cours d'eau de Buizin, analysées par barcoding, puis identifiées par BLASTn sur la plateforme NCBI. De nombreuses morphologies de masses d'œufs en termes de tailles, couleurs, formes et textures ont pu être observées dans les ordres de Trichoptères (A) et des Diptères (B).

4. Discussion

Dans le cadre des études scientifiques comme dans le cadre d'évaluation et de la gestion des cours d'eau, les insectes aquatiques, indicateurs importants de la qualité écologique des rivières, sont très rarement considérés « hors eau ». Pourtant, les passages entre les milieux aquatiques et terrestres ainsi que la reproduction et la dispersion qui ont lieu hors eau pour beaucoup d'entre ces espèces, sont cruciaux pour qu'elles puissent compléter leur cycle de vie et persister dans les milieux aquatiques.

Le projet DispEff a permis d'avancer significativement notre connaissance des stades de vie sous-étudiés des insectes aquatiques (imagines, œufs) et de les utiliser dans une manière très innovante pour l'estimation empirique des distances de dispersion des insectes aquatiques hors milieux aquatiques. Ouvrant des nouvelles perspectives à la fois scientifiques et opérationnelles, cette étude est novatrice sur plusieurs aspects :

- C'est pour la première fois que la persistance d'un marquage isotopique jusqu'au stade œuf a pu être démontré et aussi la première fois, que les masses d'œufs ont été utilisées pour l'estimation des distances de dispersion réalisés par les adultes des insectes aquatiques (4.1) ;
- C'est une rare étude, où un effort a été fait de décrire la diversité des morphologies des masses d'œufs d'insectes aquatiques sur tous les groupes présents sur un site d'étude et la première à notre connaissance où les outils moléculaires ont été utilisés dans une manière systématique pour leur identification (4.2).

4.1. La dispersion effective réalisée par les adultes de *Baetis* spp.

Plusieurs études ont démontré que le vol des adultes est le mode de dispersion principal des éphémères pour les longues distances (Hershey et al., 1993; Hughes et al., 2003; Masters et al., 2007; Schmidt et al., 1995). Les résultats de l'expérience isotopique sur le Buizin ont été très concluants, démontrant que malgré la très courte durée de leur vie, les femelles de *Baetis* spp. peuvent parcourir plus de 1300-1700 m dans leur dispersion dans un tronçon de cours d'eau relativement préservé des impacts anthropiques et avec une ripisylve naturelle. Nos estimations sont dans les mêmes ordres de grandeurs que les estimations observées dans la littérature. Ainsi des distances de dispersion des adultes *Baetis* spp. comprises entre 1,6 et 1,9 km ont été rapporté dans une étude comparable (marquage isotopique) réalisée dans une rivière arctique en Alaska (Hershey et al., 1993).

Conformément à l'hypothèse de cycle de colonisation de Müller (1982) nous avons détecté un biais de la dispersion des adultes vers l'amont par rapport à leur site d'émergence. Plusieurs autres études ont détecté ce comportement chez les femelles des éphémères (Bird & Hynes, 1981; Flecker & Allan, 1988; Hershey et al., 1993; Lavandier, 1982; Madsen et al., 1973, 1977). Les échantillonnages simultanés des adultes et des masses d'œufs au sein des mêmes populations ont permis de démontrer l'effet de notre choix de méthode sur les résultats. Tandis que la distribution des masses d'œufs marquées était très fortement biaisée vers l'amont (les lieux de ponte correspondant à la destination finale de la dispersion des femelles des éphémères), ce patron était beaucoup moins marqué pour les adultes marqués, dont la distribution était très centrée autour de la zone de marquage. Ça laisse penser que les distances de dispersion quantifiées avec la capture des stades adultes pendant leur vol peuvent potentiellement être sous-estimées par rapport aux distances finales réalisées par les femelles pour la ponte. Ceci concerne surtout la distribution des données et donc les moyennes et les écartypes des distances de dispersion qui pourraient être estimés (et que nous n'avons pas fait à cause des déséquilibres en nombre d'échantillons par site). Cependant les estimations des distances maximales de dispersion coïncident pour les deux stades de vie considérés dans cette étude.

Il est toutefois important d'être bien conscients des limites de cette étude qui s'est centré sur un seul cas d'étude, Le Buizin, pendant une seule saison de vol. Ainsi la nature de cours d'eau, notamment en termes

de sa ripisylve et du degré d'impact humaine sur ces milieux (par exemple l'urbanisation, usages agricoles), la structure du réseau hydrographique (la présence et la localisation des affluents), la distribution des habitats larvaires et les habitats de ponte ainsi que les conditions météorologiques lors de la saison de vol suivie, pourraient fortement influencer les patrons de dispersion des imagines (Smith et al 2015 ; Vebrová et al 2019 ; Gerber et al 2023). Même au sein de la zone d'étude sur le Buizin, nous avons constaté des fortes différences morphologiques entre les sites, avec certaines zones en amont présentant des concrétions de calcaire qui ont clairement diminué localement la disponibilité des substrats adaptés à la ponte des insectes. Ces « déserts » locales pourraient être moteurs pour des dispersions à plus longue distance en comparaison avec des zones où beaucoup d'habitat est disponible.

En conclusion, pour produire des estimations des capacités de dispersion plus robustes et adaptables à différentes situations, il conviendrait de comparer les distances de la dispersion effective entre les contextes paysagers différentes et répétés sur plusieurs saisons. Combiner ces estimations avec une cartographie des habitats sur chaque zone étudiée permettrait de mieux comprendre les mécanismes derrière le comportement de dispersion des adultes des insectes aquatiques.

4.2 Mieux connaître les masses d'œufs d'insectes aquatiques

Un acquis important du projet DispEff a été le gain en connaissances sur la taxonomie des masses d'œufs, un stade de vie largement sous-étudié pour les insectes aquatiques. Aucune clef de détermination n'existe actuellement pour les pontes des insectes aquatiques ni en France ni en Europe. Les éléments existants dans la littérature scientifique sur les comportements de ponte et la morphologie des masses d'œufs sont éparpillés entre les publications concernant des groupes taxonomiques particuliers (par ex. Hoffmann & Resh 2003 ; Lancaster et al 2010 ; Peckarsky 2000 ; Encalada & Peckarsky 2007 ; Alp et al 2) et des très rares publications de synthèse concernant les insectes aquatiques des zones géographiques très lointaines comme la Nouvelle Zelande (Smith and Storey 2018). La génétique a pour le moment été très peu mise à service de l'amélioration de nos connaissances de ce stade de vie.

La diversité des masses d'œufs attachés aux substrats fixes retrouvée sur un seul petit cours d'eau pendant une seule saison de vol donne un premier aperçu sur les connaissances qu'on pourrait gagner grâce au barcoding génétique sur ces stades de vie. Avec toutes les limites de cette étude pilote (focus sur une zone restreinte d'un seul bassin versant, nombre d'échantillons très limité pour certains taxons), elle illustre bien tout le potentiel qu'existe pour une ultérieure exploration de ces stades de vie dans le RMC et leur utilisation comme indicateurs. Faciles à échantillonner et à identifier à l'échelle des grandes groupes taxonomiques (ordre et famille), les pontes fixées sur les substrats pourraient fournir de très bons indicateurs pour évaluer la fonctionnalité des milieux pour une colonisation aérienne et leur capacité d'accueil pour les très jeunes stades de vie. Une étude systématique pour créer une typologie des masses d'œufs, décrire la phénologie des pontes et les caractéristiques des substrats utilisés pour oviposition sur les cours d'eau RMC mériterait avoir lieu. Une combinaison des descriptions morphologiques, de la photographie, des mesures morphométriques et des analyses génétiques permettrait à aboutir à un vraie « catalogue » des masses d'œufs qui pourrait puis servir de base pour le développement des nouveaux indicateurs de qualité et de la fonctionnalité de milieux.

4.3 Perspectives opérationnelles

Des moyens importants sont investis par les gestionnaires des cours d'eau dans la restauration des milieux aquatiques. De plus en plus de retours d'expérience et d'études scientifiques montrent que les processus de dispersion sont cruciaux à prendre en compte pour assurer une recolonisation des sites restaurés (Sundermann et al 2011 ; Hughes et al 2007). La capacité et la direction de dispersion, les particularités de cycle de vie peuvent jouer un rôle important pour assurer la connectivité entre les populations dans un bassin versant (Hughes et al 2007). Nous avons besoin des connaissances sur ces

aspects pour élaborer des scénarii de restauration prenant en compte la structure des réseaux hydrographiques, la distribution des potentiels sources de colonisation (par ex. des réservoirs biologiques) ainsi que des barrières à la dispersion ou à la colonisation (par exemple manque des substrats de ponte) non seulement pour les stades aquatiques mais aussi pour les stades de vie terrestres des organismes des cours d'eau. Cette étude ajoute une brique à notre base des connaissances scientifiques nécessaires pour accompagner la gestion et la restauration des cours d'eau et notamment aider à la formulation des objectifs et des scénarios, aux choix des mesures et des indicateurs à mesurer et à la priorisation des sites de restauration.

La prise en compte des très jeunes stades de vie (œufs) dans les diagnostics écologiques, aiderait de lever un certain nombre d'incertitudes relatives aux outils de bio-évaluation actuels basés uniquement sur les listes de taxons et les stades de vie larvaires. Ça permettrait notamment une évaluation des milieux par rapport à leur fonctionnalité pour la reproduction des nombreuses espèces d'invertébrés, qui peut être limitée par exemple par la présence des substrats de ponte adaptés (Storey et al 2017 ; Jord & Taylor 2021).

5. Remerciements

Nous remercions cordialement Lara Konecny pour son précieux soutien aux analyses génétiques réalisés et les membres de l'équipe EcoFlowS pour l'aide sur le terrain et au laboratoire. Nous remercions l'équipe Ecotox (RiverLy, INRAE) pour la mise à disposition de son équipement pour la pesée des échantillons isotopiques.

Nous remercions l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse et la Zone Atelier Bassin du Rhône pour le soutien financier de ce projet.

6. Bibliographie

- Alp, M., Indermaur, L., & Robinson, C. T. (2013). Environmental constraints on oviposition of aquatic invertebrates with contrasting life cycles in two human-modified streams. *Freshwater Biology*, 58(9), 1932-1945.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Bauernfeind, E., & Soldan, T. (2013). *The Mayflies of Europe (Ephemeroptera)*. BRILL.
- Bird, G. A., & Hynes, H. B. N. (1981). Movements of adult aquatic insects near streams in Southern Ontario. *Hydrobiologia*, 77(1), 65–69.
- Briers, R. A., Gee, J. H., Cariss, H. M., & Geoghegan, R. (2004). Inter-population dispersal by adult stoneflies detected by stable isotope enrichment. *Freshwater Biology*, 49(4), 425-431.
- Brittain, J. E. (1982). Biology of mayflies. *Annual review of entomology*, 27(1), 119-147
- Carpenter, S. R., Stanley, E. H., & Vander Zanden, M. J. (2011). State of the world's freshwater ecosystems: physical, chemical, and biological changes. *Annual review of Environment and Resources*, 36, 75-99.
- Caudill, C. C. (2003). Measuring dispersal in a metapopulation using stable isotope enrichment: high rates of sex-biased dispersal between patches in a mayfly metapopulation. *Oikos*, 101(3), 624-630.
- Crabot, J. (2019) Continuité écologique, fragmentation et dynamique spatio-temporelle des communautés en rivières intermittentes. Thèse doctorale, Université Claude Bernard Lyon I.
- Cummins, K. W. (1973). Trophic relations of aquatic insects. *Annual Review of Entomology*, 18(1), 183-206.
- Diebel, M. W., & Zanden, M. J. V. (2009). Nitrogen stable isotopes in streams: effects of agricultural sources and transformations. *Ecological Applications*, 19(5), 1127-1134.
- Eaton, A. E. (1888). *A Revisional Monograph of Recent Ephemeridae Or Mayflies*. Taylor & Francis.
- Elliott, J. M. (1972). Effect of temperature on the time of hatching in *Baetis rhodani* (Ephemeroptera: Baetidae). *Oecologia*, 9, 47-51.
- Elliott, J. M. (2003). A comparative study of the dispersal of 10 species of stream invertebrates. *Freshwater Biology*, 48 (9), 1652–1668.
- Elliott, J. M., & Humpesch, U. H. (1980). Eggs of Ephemeroptera. 7.
- Encalada, A. C., & Peckarsky, B. L. (2007). A comparative study of the costs of alternative mayfly oviposition behaviors. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(9), 1437–1448.
- Flecker, A. S., & Allan, J. D. (1988). Flight direction in some rocky mountain mayflies (Ephemeroptera), with observations of parasitism. *Aquatic Insects*, 10(1), 33–42.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Fureder, L., & Reynolds, J. D. (2003). Is *Austropotamobius pallipes* a good bioindicator? *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 370, 157-163.
- Gerber, R., Piscart, C., Roussel, J. M., Georges, R., Houet, T., Royer, J., & Bergerot, B. (2023). Landscape models can predict the distribution of aquatic insects across agricultural areas. *Landscape Ecology*, 38(11), 2917-2929.

- Heino, J., Alahuhta, J., Ala-Hulkko, T., Antikainen, H., Bini, L. M., Bonada, N., ... & Melo, A. S. (2017). Integrating dispersal proxies in ecological and environmental research in the freshwater realm. *Environmental Reviews*, 25(3), 334-349.
- Hershey, A. E., Pastor, J., Peterson, B. J., & Kling, G. W. (1993). Stable isotopes resolve the drift paradox for *Baetis* mayflies in an Arctic River. *Ecology*, 74(8), 2315–2325.
- Hinton, H. E. (1981). *Biology of insect eggs* (1st ed). Pergamon Press
- Hughes, J. M. (2007). Constraints on recovery: using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams. *Freshwater Biology*, 52(4), 616-631.
- Hughes, J. M., Mather, P. B., Hillyer, M.J., Cleary, C., & Peckarsky, B. (2003). Genetic structure in a montane mayfly *Baetis bicaudatus* (Ephemeroptera: Baetidae), from the Rocky Mountains, Colorado. *Freshwater Biology*, 48(12), 2149–2162.
- Jordt, S., & Taylor, B. W. (2021). A rolling stone gathers no eggs: the importance of stream insect egg laying natural history for stream restoration. *Ecology*, 102(7).
- Kendall, C. (1998). Chapter 16. Tracing Nitrogen Sources and Cycling in Catchments. In C. Kendall & J. J. McDONNELL (Eds.), *Isotope Tracers in Catchment Hydrology* (pp. 519–576). Elsevier.
- Lancaster, J., Downes, B. J., & Arnold, A. (2010a). Environmental constraints on oviposition limit egg supply of a stream insect at multiple scales. *Oecologia*, 163(2), 373-384.
- Lancaster, J., Downes, B. J., & Arnold, A. (2010b). Oviposition site selectivity of some stream-dwelling caddisflies. *Hydrobiologia*, 652(1), 165–178.
- Lancaster, J., & Downes, B. J. (2017). Dispersal traits may reflect dispersal distances, but dispersers may not connect populations demographically. *Oecologia*, 184(1), 171-182.
- Lavandier, P. (1982). Evidence of upstream migration by female adults of *Baetis alpinus* pict. (Ephemeroptera) at high altitude in the Pyrenees. *Annales de Limnologie*, 18(1), 55–59.
- LEMA (2006). Loi n° 2006-1772 du 30 décembre 2006 sur l'eau et les milieux aquatiques
- Lieutier, F., Ham, R., Ham, M. C., & Garcia, J. (1986). Une méthode de marquage individuel des coléoptères scolytides pour les études de laboratoire. *Agronomie*, 6(8), 773-776.
- López-Rodríguez, M. J., Figueroa, J., & Alba-Tercedor, J. (2008). Life history and larval feeding of some species of Ephemeroptera and Plecoptera (Insecta) in the Sierra Nevada (Southern Iberian Peninsula). *Hydrobiologia*, 610, 277–295.
- Macneale, K. H., Peckarsky, B. L., & Likens, G. E. (2004). Contradictory results from different methods for measuring direction of insect flight. *Freshwater Biology*, 49(10), 1260-1268.
- Macneale, K. H., Peckarsky, B. L., & Likens, G. E. (2005). Stable isotopes identify dispersal patterns of stonefly populations living along stream corridors. *Freshwater Biology*, 50(7), 1117-1130.
- Madsen, B., Bengtsson, J., & Butz, I. (1977). Upstream movement by some Ephemeroptera species. 81(1), 119–127.
- Madsen, B. L., Bengtson, J., & Butz, I. (1973). Observations on upstream migration by imagines of some 31 Plecoptera and Ephemeroptera. *Limnology and Oceanography*, 18(4), 678–681.
- Malaise, R. (1937) A new insect trap. *Entomologisk Tidskrift*, 58, 148–160.
- Masters, Z., Peteresen, I., Hildrew, A. G., & Ormerod, S. J. (2007). Insect dispersal does not limit the biological recovery of streams from acidification. *Aquatic conservation: Marine and Freshwater ecosystems*, 17(4), 375-383.

- Pastor, A., Peipoch, M., Cañas, L., Chappuis, E., Ribot, M., Gacia, E., ... & Sabater, F. (2013). Nitrogen stable isotopes in primary uptake compartments across streams differing in nutrient availability. *Environmental science & technology*, 47(18), 10155-10162.
- Pearson, W.R. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Curr. Protoc. Bioinforma.* Ed. Board Andreas Baxeavanis Al 0 3, 10.1002/0471250953.bi0301s42. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>
- Peckarsky, B. L., Taylor, B. W., & Caudill, C. C. (2000). Hydrologic and behavioral constraints on oviposition of stream insects: implications for adult dispersal. *Oecologia*, 125(2), 186-200.
- Pertsemlidis, A., and Fondon, J.W. (2001). Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). *Genome Biol.* 2, REVIEWS2002. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-10-reviews2002>.
- Peterson, B., Fry, B., Deegan, L., & Hershey, A. (1993). The trophic significance of epilithic algal production in a fertilized tundra river ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 38(4), 872-878.
- Radinger, J., Essl, F., Hölker, F., Horký, P., Slavík, O., & Wolter, C. (2017). The future distribution of river fish: The complex interplay of climate and land use changes, species dispersal and movement barriers. *Global Change Biology*, 23(11), 4970-4986.
- Sarremejane, R., Cid, N., Stubbington, R., Datry, T., Alp, M., Cañedo-Argüelles, M., ... & Bonada, N. (2020). DISPERSE, a trait database to assess the dispersal potential of European aquatic macroinvertebrates. *Scientific Data*, 7(1), 386.
- Schmidt, S. K., Hughes, J. M., & Bunn, S.E. (1995). Gene flow among conspecific populations of *Baetis* sp. (Ephemeroptera): Adult flight and larval drift. *Journal of the North American Benthological Society*, 14(1), 147–157.
- Smith, R. F., Venugopal, P. D., Baker, M. E., & Lamp, W. O. (2015). Habitat filtering and adult dispersal determine the taxonomic composition of stream insects in an urbanizing landscape. *Freshwater Biology*, 60(9), 1740-1754.
- Smith, B. J., & Storey, R. G. (2018). Egg characteristics and oviposition behaviour of the aquatic insect orders Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera in New Zealand: a review. *New Zealand Journal of Zoology*, 45(4), 287-325.
- Storey, R. G., Reid, D. R., & Smith, B. J. (2017). Oviposition site selectivity of some New Zealand aquatic macroinvertebrate taxa and implications for stream restoration. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 51(1), 165-181.
- Studemann, D., Landolt, P., Sartori, M., Hefti, D., Tomka, I., (1992). Ephemeroptera. *Insecta Helvetica Fauna* 9. Neuchâtel. 175.
- Sundermann, A., Stoll, S., & Haase, P. (2011). River restoration success depends on the species pool of the immediate surroundings. *Ecological Applications*, 21(6), 1962-1971.
- Tonkin, J. D., Stoll, S., Sundermann, A., & Haase, P. (2014). Dispersal distance and the pool of taxa, but not barriers, determine the colonisation of restored river reaches by benthic invertebrates. *Freshwater Biology*, 59(9), 1843-1855.
- Vebrová, L., van Nieuwenhuijzen, A., Kolář, V., & Boukal, D. S. (2018). Seasonality and weather conditions jointly drive flight activity patterns of aquatic and terrestrial chironomids. *BMC ecology*, 18, 1-13.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., and Ansorge, W. (1988). Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett.* 233, 432–436. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80477-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80477-0).

7. Communications sur les résultats du projet

Présentations lors des conférences

Alp, M., Jaulin, E., Simon, L., Datry, T., Dolédec, S., Forcellini, M., Launay, B., Flourey M. (2022) How far do stream insects travel as adults? Tracing different life stages in an isotope enrichment experiment. INTECOL, Genève.

Alp, M., Jaulin, E., Datry, T., Disdier, U., Dolédec, S., Forcellini, M., Launay, B., Simon, L., Flourey M. How far do adults of stream insects travel in terrestrial environments? Tracing different life stages using stable isotopes and DNA barcoding. (2023) SEFS23, Newcastle, Grande-Bretagne (CO).

Etudiants encadrés

Jaulin, Emmanuel 2021 (Université de Rennes I) From emergence to oviposition of mayflies: Description of the oviposition behaviour and assessment of dispersal distances. Stage Master 2 avec un rapport final (Annexe 1).

Disdier, Uma (2022) Estimation des distances de dispersion effective des insectes en cours d'eau par l'analyse moléculaire et isotopique. Estbb, Université Catholique de Lyon. Stage Licence avec un rapport final (Annexe 2).

Sandquist, Helena (2023) Mesures de la morphométrie des ailes. Stage volontaire sans rapport final.

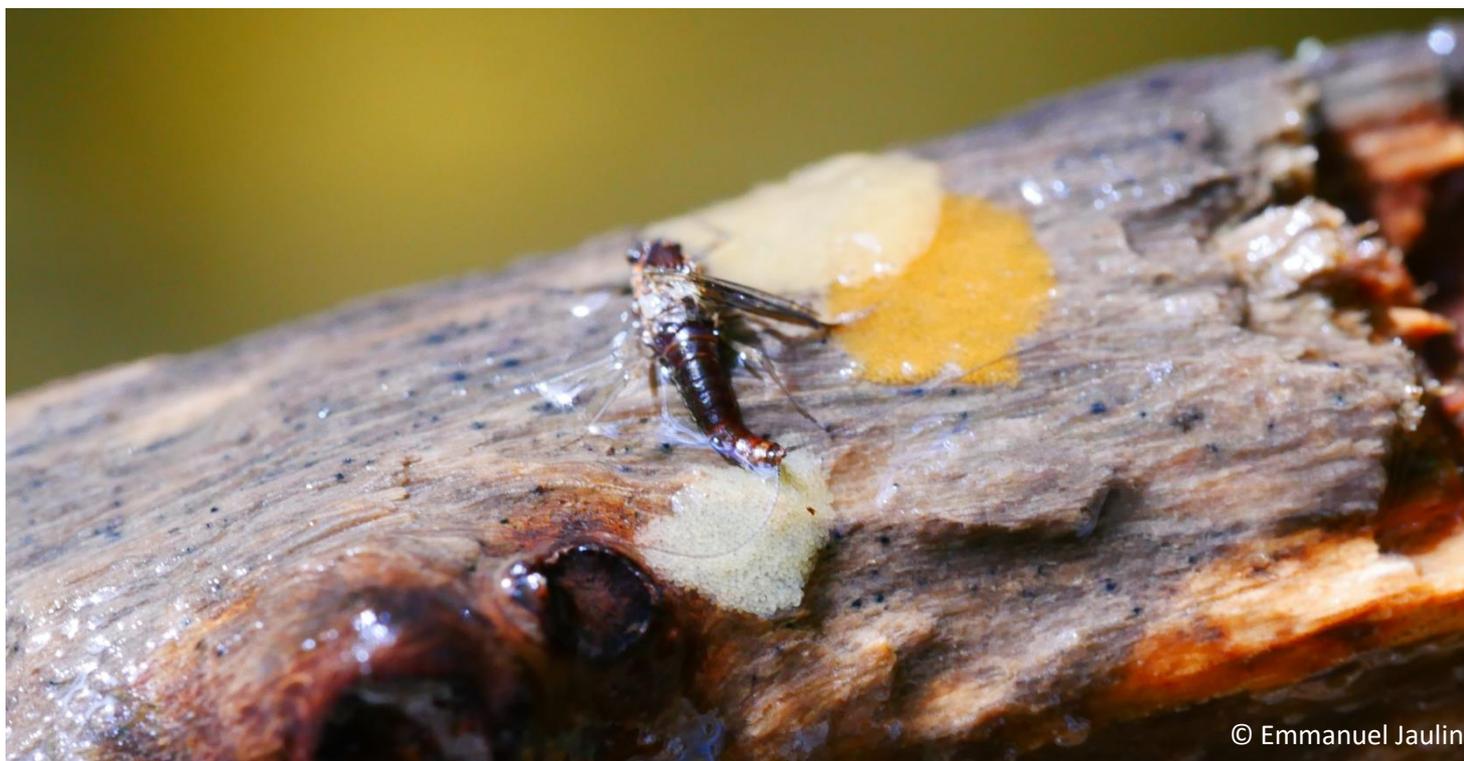
Annexes

MASTER THESIS

Ecosystems,
Behavioral and
Evolutionary
Ecology

From emergence to oviposition of mayflies: Description of the oviposition behaviour and assessment of dispersal distances

Master THESIS by Emmanuel JAULIN



© Emmanuel Jaulin



Year 2020-2021
MSc Biodiversity Ecology and Evolution

Laboratories:

INRAE, Centre Lyon-Grenoble Auvergne-Rhône-Alpes
5 rue de la Doua – CS 20244 69625 Villeurbanne Cedex

CNRS, UMR 5023 - LEHNA (Laboratoire d'Ecologie des
Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés)
Université Claude Bernard - Lyon 1, 3-6, rue Raphaël Dubois - Darwin C & Forel
buildings, 69622 Villeurbanne Cedex

Supervisors:

Maria ALP (INRAE)

Mathieu FLOURY (LEHNA)

DispEff project financed by the ZABR-Agence de l'Eau RMC framework agreement

Acknowledgments

I would like to warmly thank my two supervisors Maria Alp and Mathieu Flourey for everything they brought me during this internship from a professional and personal point of view. Thank you to them for their guidance, their expertise, the many discussions we had together and the good moments spent together in the lab or field.

I would like to thank all the following people for their contributions at different crucial step of the project, for the discussions I had with you and your very enriching advices. Thank you very much to all of you: Laurent Simon, Sylvain Dolédec, Maxence Forcellini, Lara Konecny, Julien Barnasson, Maïlys Gauthier, Guillaume LeGoff and Bertrand Launay.

I would like to thank my two office mates, Nans and Nils. And yes, even after 5 months together I still manage to call you by the wrong name. Thank you for this good and stimulating atmosphere and for your good advices. It was very pleasant to work with you.

I thank Clarisse, Charlotte, Nans, Nils, Romain, Teresa, Jake, and all the EcoFlowS team for all these moments spent in the lab where a very good atmosphere reigned, which makes I want to stay with you!

Dedication to Clacla, Carloti and Ro for these moments outside the lab very pleasant.

I would like to thank my masters friends for all these moments spent with you during these 2 years. Strong moments in emotions and I hope full of others which remains to come. I believe in you, you will reach your professional goals. *Bisouuuus* Aubin, Lilian, Margot, Oriane, Romane (and never forget: you are here because you deserve it).

I would like to thank my parents and my sister for allowing me to put myself in the best conditions to get here.

Be at peace with yourself,

Manu

Contents

I- Introduction.....	1
II- Materials and methods	5
2.1 Study system.....	5
2.2 Isotope enrichment experiment	7
2.3 Study species	8
2.4 Field sampling of <i>Baetis</i> adults and egg masses	9
2.4.1 Adult insect sampling	9
2.4.2 <i>Baetis</i> egg masses sampling and morphometric analyses.....	10
2.5 Data analysis.....	12
2.5.1 Taxonomic identification of <i>Baetis</i> adult females and egg masses	12
2.5.2 Statistical analyses on oviposition behaviour and egg mass morphology.....	13
2.5.3 Isotopic analysis	13
a) Analysis of isotopic data and assessment of dispersal distances	14
b) Statistical analyses on dispersal distances of <i>Baetis spp.</i>	16
III- Results.....	17
3.1 Oviposition behaviour of <i>Baetis spp.</i> females.....	17
3.2 Substrate characteristics explaining <i>Baetis rhodani</i> and <i>Baetis alpinus</i> egg mass presence.....	19
3.3 Egg mass morphology of <i>Baetis rhodani</i> and <i>Baetis alpinus</i>	20
3.4 Dispersal distances of <i>Baetis spp.</i>	21
3.4.1 Dispersal distances and pattern based on egg masses samples: “effective” dispersal distance.....	21
3.4.2 Dispersal distances and pattern based on adult females samples: “snapshot” dispersal distance.....	22
IV-Discussion	23
4.1 Oviposition behaviour and egg masses morphology of <i>Baetis spp.</i> females	23
4.2 Dispersal distances of <i>Baetis</i>	24
References	27
Appendices	34

I- Introduction

Dispersal corresponds to any movement of individuals or propagules, with potential consequences for gene flow across space (Ronce, 2007). Female dispersal ending in oviposition is an effective dispersal, since it ends up in the local establishment of the propagules that have been transported from elsewhere and through this new genes can be brought into the local pool.

Dispersal is a spatial ecological process, known to have significant effects on the dynamics of genes, individuals, (meta)populations, (meta)communities (Bowler & Benton, 2005; Broquet & Petit, 2009; Leibold & Miller, 2004; Ronce, 2007) and on the functioning of meta-ecosystems (Loreau & Holt, 2004; Massol *et al.*, 2017). At the metapopulation scale, dispersal (via emigration and immigration) connects populations to each other (Levins, 1969) and allows the colonization of empty suitable patches (e.g. Schooley & Cosentino, 2018). Dispersal regulates the population size (e.g. Clobert *et al.*, 2001) and allows the persistence of the metapopulation system (Clobert *et al.*, 2001; Elmhagen & Angerbjörn, 2001; Schooley & Cosentino, 2018). Moreover, contributing to the gene flow (transfer of genes), dispersal can lead to genetic homogenization among populations (Slatkin, 1987), and impede (Lenormand, 2002) or enhance (Gandon *et al.*, 1996) the emergence of local adaptations. At the metacommunity scale, species dispersal (with potential interspecific interactions) connects local communities to each other's (Gilpin & Hanski, 1991; Leibold *et al.*, 2004; Wilson, 1992) and influences the structure and dynamics of the communities (Leibold *et al.*, 2004). Despite the recognition of the importance of dispersal for a row of key ecological and evolutionary processes, important knowledge gaps in our understanding of dispersal processes and notably of dispersal distances persist for some groups, such as stream insects (Petersen *et al.*, 2004).

Stream insects inhabiting riverine systems display a complex life cycle with several life stages (egg, larva, subimago, imago) (Fig. 1) inhabiting either aquatic or terrestrial environments (Smith *et al.*, 2009), and using active and passive modes of dispersal in different media (air, ground, water). The subimago is a still stage, morphologically different from the imago, flying to riverine vegetation and waiting for the final moult to become an imago (Sartori & Brittain, 2015). The adult stage (imago) is often terrestrial (with the exception of some taxa such as Coleoptera; Elliott, 2008) and short-living (Merritt *et al.*, 1996). During this life stage, insects mate with congeners, disperse by flight and (females only) oviposit. Some species feed extensively as adults (e.g. Odonata; d'Aguilar & Dommaget, 1998) but for many (notably mayflies) feeding is limited or impossible, which restricts the duration of this life stage.

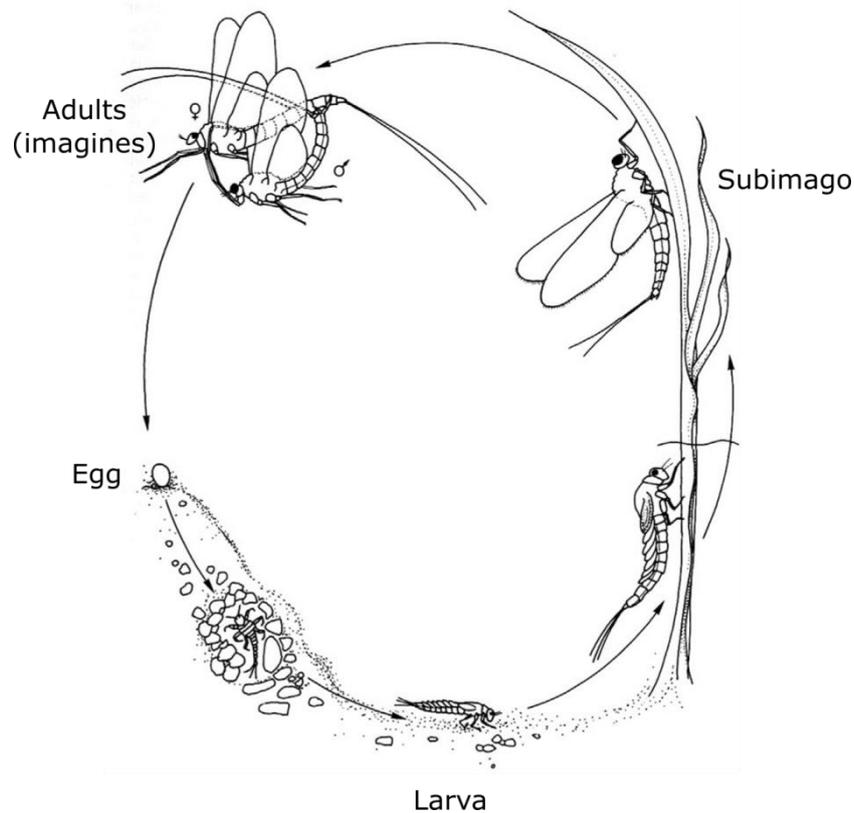


Fig. 1 Mayflies life cycle. From Studemann *et al.*, 1992.

Flying adults have been observed to disperse predominantly along stream corridors (Petersen *et al.*, 2004) and often towards upstream (e.g. Macneale *et al.*, 2005). The colonization cycle hypothesis was suggested by Müller (1982) to explain flight directionality by a compensation to the larval downstream drift. Flight (aerial) dispersal distances are higher than aquatic dispersal distances by larvae (Graham *et al.*, 2017). Thus, adult flight constitutes an important dispersal mode of stream insects (Bunn & Hughes, 1997), allowing for the connection of populations in the same or neighbouring catchment(s) (Hughes, 2007). Dispersal by flight is constrained by internal and external factors linked to each other. Internal factors refer to the morphology, behaviour and life history of dispersers. Morphological parameters such as wing size, wing loading, body mass and thorax size can determine dispersal capacity by flight (Hoffsten, 2004; Malmqvist, 2000). In females, distance and the direction of flight could also be driven by the behaviour of oviposition site selectivity (Peckarsky *et al.*, 2000). Finally, opportunities to disperse over time are also determined by the adult life span (Sarremejane *et al.*, 2017). These internal factors interact with external factors, which can further constrain or facilitate flight dispersal. Thus, connectivity among populations, i.e. extent to which the landscape favours or disturbs organism movement between patches (Taylor *et al.*, 1993), is driven by the species-specific life-history and dispersal traits in interaction with the dendritic network structure, the position of populations within it, the distances among them (Hughes *et al.*, 2009) and the patterns

of habitat availability (Peckarsky *et al.*, 2000). As for other organisms, numerous studies have shown that in insects too, dispersal constraints may induce consequences on population demography (e.g. Blakely *et al.*, 2006; Hughes, 2007) and population genetic structure (e.g. Alp *et al.*, 2012; Chaput-Bardy *et al.*, 2008; Morrissey & de Kerckhove, 2009) as well as on community assemblages (e.g. Kitto *et al.*, 2015; Sarremejane *et al.*, 2017).

Several methods are available for assessing the dispersal distances of insects. Indirect methods consist in using molecular markers to infer the gene flow between populations (e.g. Alp *et al.*, 2012). Direct methods consist in marking (e.g. dyes, laundry marker) and recapturing individuals to assess the direct dispersal distance, pattern and rate of dispersal (e.g. Conrad *et al.*, 1999). However, direct assessment of dispersal distance by flight insects is challenging due to the fragility, small size and short-duration of the adult life stage. To overcome these difficulties, stable isotope enrichment, an expensive and laborious marking method (Baumgartner & Robinson, 2017), can be used. It consists in using a stable isotope to label stream insects through their food basis at the larval stage and then capturing them at the adult stage and recording distances from the labelled reach (Briers *et al.*, 2004; Caudill, 2003; Macneale *et al.*, 2004, 2005). Dispersal distance assessed is the distance from the labelled reach to the location of capture, corresponding to the distance from the emergence site to a random location during the flight (transience step), i.e. “snapshot” dispersal distance. Dispersal distances assessed with this approach may be both over- and under-estimated since adult females could have continued their flight in any direction (go back, go further) along the stream corridor to oviposit on a substrate (settlement step). For females, the oviposition process constitutes the final purpose of their dispersal (and life cycle): they lay their eggs in a selected habitat and die (e.g. mayflies; Eaton, 1888). Several stream insects (notably many caddisflies, dipterans and certain mayflies) lay their eggs on in-stream stable substrates (e.g. rocks, logs) (e.g. Lancaster *et al.*, 2010). This makes it possible to sample egg masses and used this life stage in dispersal studies. Thus, to get a more accurate assessment of dispersal distance, we need to take into account oviposition behaviour and oviposition substrate to assess dispersal distance from the emergence site to the oviposition site, i.e. “effective” dispersal distance: the distance travelled by the female from its place of emergence to the site of oviposition.

The egg stage has yet been little studied in stream insects. The main knowledge comes from certain taxa laying egg masses on a stable substrates, such as rocks, wood or riparian vegetation (e.g. baetid mayflies; Encalada & Peckarsky, 2006; Peckarsky *et al.*, 2000), or hydrobiosid caddisflies; Lancaster & Glaister, 2019). However, even for these taxa the egg masses have rarely been systematically described and only in very few cases have molecular tools been used to identify them at the species level. Moreover, none of the few existing stable-isotope based insect dispersal studies conducted in the field conditions, have included the egg stage. Importantly, a recent study used stable isotope enrichment of plants to label adult terrestrial hemipteran (*Lycorma delicatula*), and showed that the pre-oviposition eggs were labelled too

(Porras *et al.*, 2020). These results suggested that if labelling of later larval and adult stages in stream insects were successful, there is a high potential that the eggs carried by the adult females would be labelled too.

This study was a part of a large isotopic marking experiment that labelled the whole food web in a stream reach with several stream insect species. We chose widespread taxa, *Baetis* mayflies, a scraper/grazer as larvae, with easily detectable egg masses, as the main study organism. The first aim was to test whether co-occurring *Baetis* species differ in their oviposition behaviour and egg mass morphology. The second aim was to test, whether it was possible to label stream insect egg masses using a food web based isotopic enrichment approach and subsequently estimate female dispersal distances based on this life stage. The third aim was to test, whether dispersal distances based on labelled adult females (“snapshot” dispersal distance) and egg masses (“effective” dispersal distance) differ.

H1. We hypothesize that selection of habitat (e.g. type of oviposition substrate used) could potentially differ between *Baetis* species (a flexible behavioural trait, which could allow avoiding interspecific competition between young stages).

H2. We hypothesize that two closely related *Baetis* species would not show a very strong difference in egg mass morphology.

H3. We hypothesize a preferential upstream dispersal by flight in line with the colonisation cycle hypothesis (Müller, 1982).

H4. We hypothesize that the “snapshot” dispersal distances and “effective” dispersal distances will differ, since the dispersal distances estimated based on adult samples caught adult females during their flight (“snapshot” dispersal distance), while the females could have continued their flight to oviposit (“effective” dispersal distance).

II- Materials and methods

2.1 Study system

This study was carried out on the Buizin river (45°56'56.0"N 5°19'49.8"E), a first-order tributary of the Albarine river in the Rhône river catchment, east of France (Fig. 2). The Buizin flows over a length of 12 km from its source in Souclin (740 m AMSL) to its confluence with the Albarine river (243 m AMSL), draining a watershed of about 13.3 km². Located on the middle Jurassic limestone formation (Enay, 1982), it has an intermittent section of ca. 2.3 km in its upstream part followed by a perennial downstream section extending down to the confluence with the Albarine river. The Buizin is listed as a biological refuge (sensu Article R214-108 CE) and ZNIEFF type I zone (i.e. Natural zone of ecological interest, fauna and flora) due to the presence of brown trout (*Salmo trutta fario*), and the endangered white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) (Füreder *et al.*, 2010) considered as a potential bioindicator of good water quality (Füreder & Reynolds, 2003).

A ca. 1.6 km-long section of the perennial part of the stream was selected as the main study area (Fig. 2). Nested in an incised valley without any major tributaries, the study area displays a flat streambed with an average width of 3.2 m characterized by a succession of pools and riffles. It is situated 3 km upstream of the closest settlement (Vaux-en-Bugey). No gauging station is present in the study area but discharge levels of 10-90 L/s have been measured at low flow. The study area has a diversity of hydraulic habitats with distinct flow velocities and riverbed forms. In its downstream part, a mixture of gravels and pebbles dominates the streambed, whereas boulders are present as a co-dominant substrate in its upstream part (based on Unified Soil Classification System: USCS - ASTM). The riparian vegetation is dominated by broadleaf trees, with woody debris and living trees across the stream and mosses cladding the emergent boulders and riparian vegetation (mostly upstream).

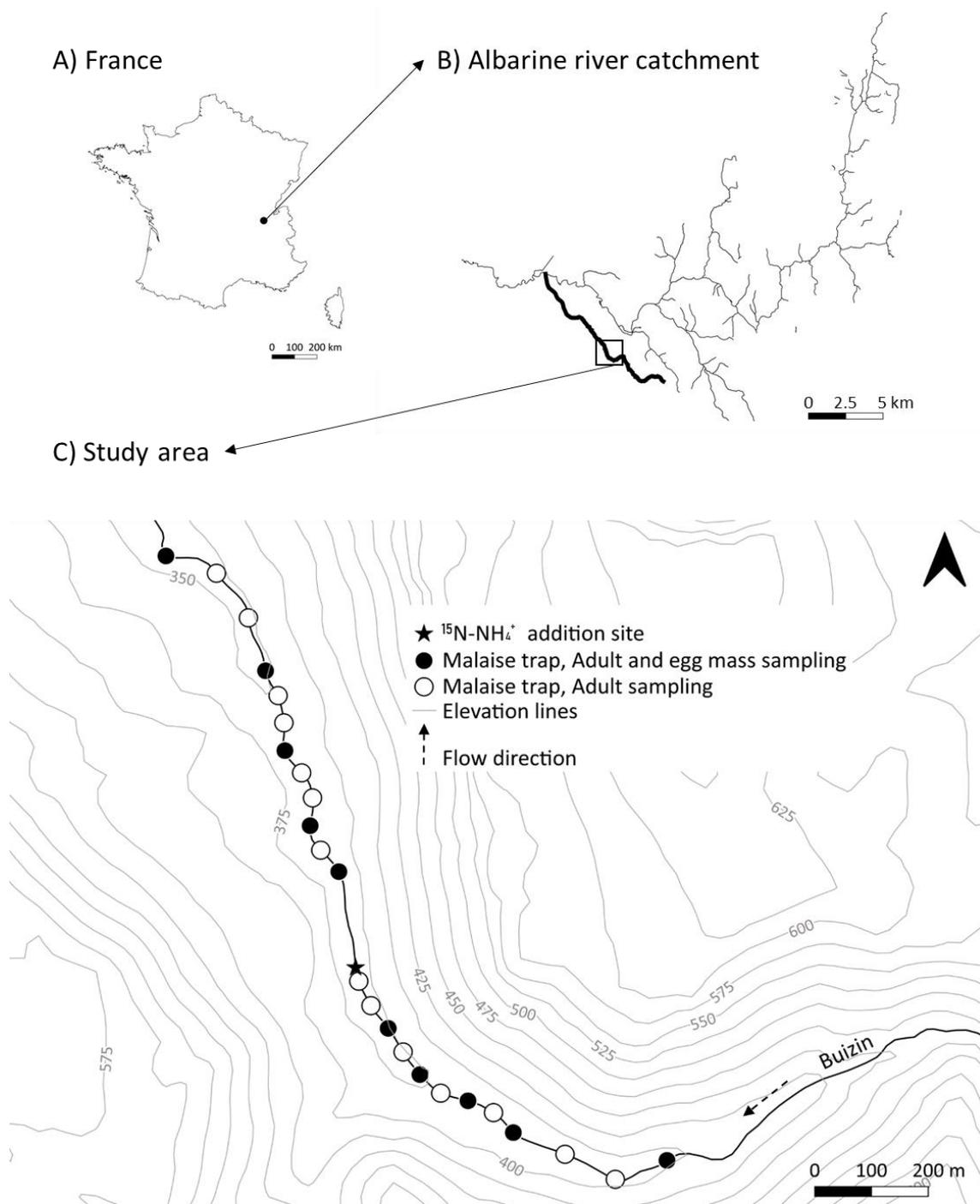


Fig. 2 The location of the Buizin stream in France A), in the Albarine River catchment B), and the study area C) with the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site, the sites with adult traps (empty circle) and egg masses sampling sites (filled circle).

2.2 Isotope enrichment experiment

To identify the origin of adult females and eggs, we performed a ^{15}N addition in the study area. The purpose was a ^{15}N enrichment of primary producers (biofilm, algae) (Peterson *et al.*, 1993), to obtain a ^{15}N artificial enrichment of invertebrates larvae, adult females and eggs. We expected a ^{15}N enrichment in larvae and maintenance of this distinct isotopic signature compared to natural signature in adult females and eggs.

For this purpose, the study area was dosed with a solution of 99 atom% ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$ ammonium sulfate (Eurisotop) released into the stream water (ca. 0.7 g per day) with a plastic can connected to an electronically actuated valve (Fig. 3). Stable isotope solution was dissolved in approximately 10 L of purified water and was dripped at a constant rate regardless of stream discharge, for almost 7 weeks between March 19 and May 11, 2021, when a decennial flood interrupted the experiment. A slight increase in N-NH_4^+ concentration in the stream water (upstream of $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site: $5.64 \pm 3.4 \mu\text{g/L}$, downstream of the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site: $13.5 \pm 5.75 \mu\text{g/L}$, mean \pm SE) was detected from water samples collected upstream and downstream of the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site 4 days before and every two weeks starting from the beginning of the isotope enrichment.

To monitor the efficiency of the isotopic enrichment of the food web, larvae of heptageniid mayflies (scrapers; e.g. Bouchard, 2004) were sampled weekly from the beginning of the experiment till the moment when a significant change of their isotopic signature was detected after the beginning of the experiment (10 days). These samplings were made at 3 locations: one upstream (-25 m, reference sample) and two downstream at ca. 10 and 60 m of the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site.

Once ^{15}N -labelled larvae were detected, the extension of the labelled reach was determined by regular sampling of the biofilm (epilithon) over a distance of 300 m downstream of the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site, 25 days (13/04/2021) and 42 days (30/04/2021) after the beginning of the isotopic enrichment. The sampling was conducted at 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 m downstream, and as well as at one site upstream (-25 m, reference sample) of the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site. At the same sampling sites, larvae of the study species were sampled to detect their artificial isotopic enrichment, 25 days (13/04/2021) after the beginning of the isotopic enrichment.

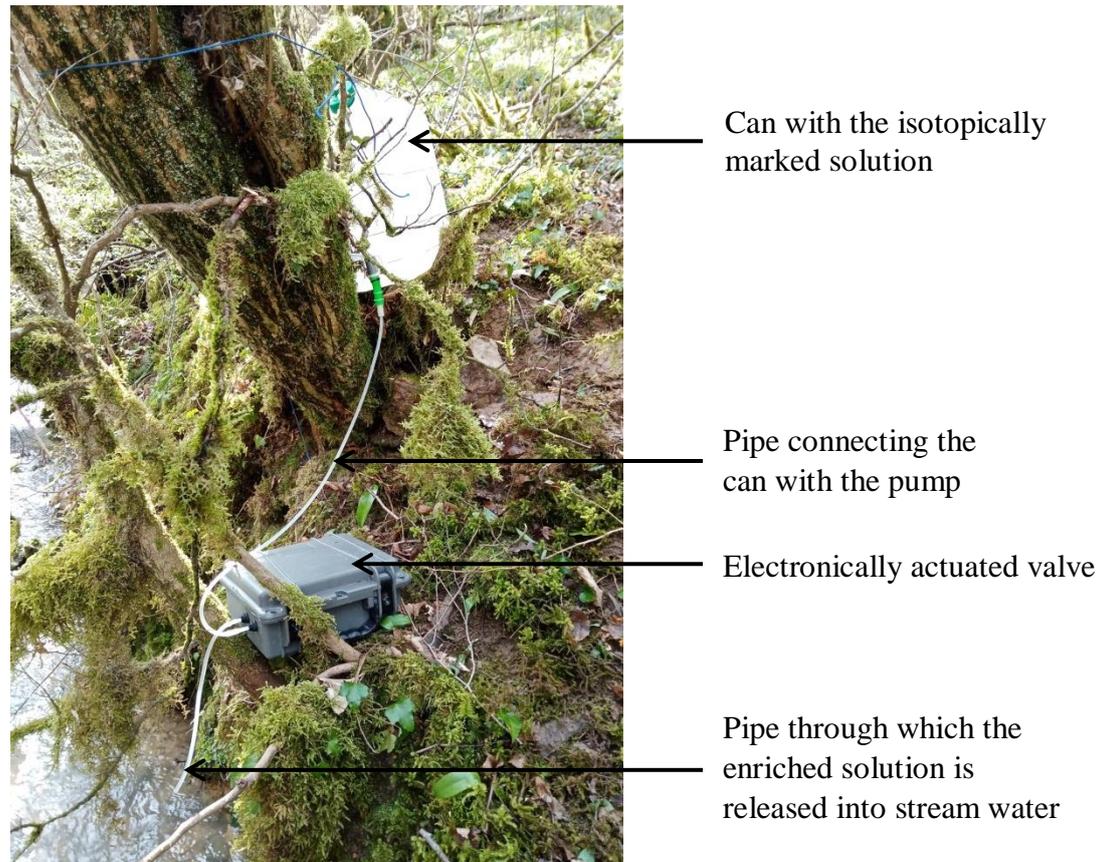


Fig. 3 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ addition to stream water using a can connected to an electronically actuated valve.

2.3 Study species

This study focused on the freshwater insect *Baetis* (Ephemeroptera), a mayfly observed at the adult, subimago, larval and egg masses stages in the Buizin. *Baetis* has a long-living aquatic larval stage (grazer, scraper, collector, gatherer (e.g. Buffagni & Comin, 2000; Kjærstad *et al.*, 2018; López-Rodríguez *et al.*, 2008), a very short-living subimago stage and a short-living terrestrial adult (imago) stage (Sartori & Brittain, 2015). Due to vestigial mouthparts, the adult stage of *Baetis* is incapable of feeding (Bauernfeind & Soldan, 2013), the short duration of this life stage (1-2 days) is dedicated to reproduction and dispersal. Thus, adult female enter into a males swarm, mates with one male and leaves the swarm to disperse by flight (males fly until exhaustion) (Brittain, 1982; Sartori & Brittain, 2015). *Baetis* female has been observed to disperses predominantly towards upstream (Bird & Hynes, 1981; Flecker & Allan, 1988; Hershey *et al.*, 1993; Lavandier, 1982; Madsen *et al.*, 1973, 1977), and flight constitutes its main mode of long-distance dispersal (e.g. Hershey *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 2003; Masters *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 1995). Following dispersal by flight, *Baetis* female oviposits on in-stream substrate (settlement step) following a highly selective oviposition behaviour, not observed in other Ephemeroptera genera (Elliott &

Humpesch, 1980). Gravid female was reported to lands on emergent stone in fast-flowing water (Benech, 1972; Elliott, 1972), crawls underwater and lays one tombstone-shaped eggs mass on the underside of a stone (Benech, 1972; Brittain, 1982; Eaton, 1888; Edmunds *et al.*, 1976; Elliott, 1972; Encalada & Peckarsky, 2007; Murphy, 1922; Peckarsky *et al.*, 2000) or a log (Bauernfeind & Soldan, 2013). More rarely, female may oviposits on a fully submerged stone imbricated with an emergent stone (Lancaster *et al.*, 2010). After oviposition, the female either dies on spot (Eaton, 1888), is carried away by the water (Elliott, 1972; Murphy, 1922), or leaves the water (Morgan, 1911; Murphy, 1922) and flies away (Eaton, 1888; Elliott, 1972).

2.4 Field sampling of *Baetis* adults and egg masses

2.4.1 Adult insect sampling

About 3 weeks after the beginning of the isotope enrichment, 24 Malaise traps (Malaise, 1937) were set up along the study area to capture insects flying along the stream corridor. The traps were left on site between April 6 and May 11 (5 weeks in total) when they had to be removed due to the decennial flood. The 24 traps have been distributed at 24 sites spaced at 50 to 100 meters distance from each other along the study area (Fig. 2). The minimal distances between the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site and trap sites were 25m (upstream) and 175m (downstream) and the maximal distances were 725m (upstream) and 875m (downstream).

At each trap site, one Malaise trap was set up perpendicularly to the stream-edge with the lower part installed in the middle of the river, at 30-35 cm above the water on average, with one opening facing upstream and the other one facing downstream (interception area of one side: 1.275 m²) (Fig. 4). The Malaise traps thus targeted adults flying in either upstream or downstream direction at a height between 0.30 m and 1.20 m above the water. Trapped insects ended up in a collecting jar common to the two openings, and were preserved in 96.5 % ethanol. All traps were emptied twice a week starting from 9 April 2021.



Fig. 4 Example of trap site with a Malaise trap.

2.4.2 *Baetis* egg masses sampling and morphometric analyses

Starting from 4 weeks after the beginning of the isotopic enrichment, a weekly sampling of *Baetis* egg masses was conducted (April 14 - May 4). For this, 10 trap sites were selected according to the diversity of potential oviposition substrates available within the streambed and at the stream edges and the distance from the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site (Fig. 2), whereby a regular distribution of sites in the up- and downstream direction was aimed. At each selected site, a core sampling area with a radius of 5 m and an extended egg mass sampling area with a radius of 10 m were defined around the trap position (Fig. 5). All abiotic (gravel, pebble, boulder) and biotic (woody debris) oviposition substrates were searched for *Baetis* egg masses during 12 min within the core and (if the number of egg detections was low) eventually within the extended sampling area.

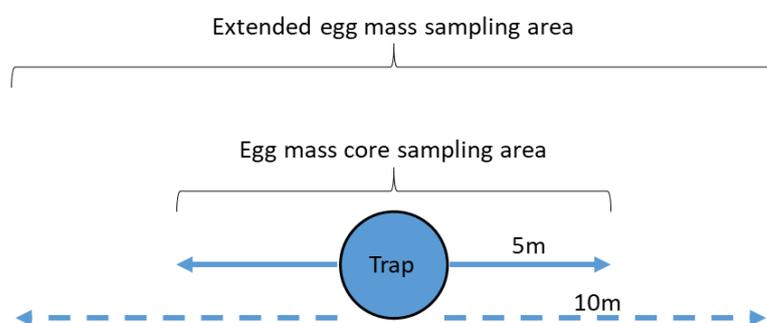


Fig. 5 Synthetic representation of egg masses sampling

Each discovered *Baetis* egg mass and the substrate it was detected on were described for a set of criteria pre-identified in the literature (Table 1). Flow velocity was coarsely estimated by eye and texture was determined by carefully touching the substrate. To avoid potential measure biases, the same operator measured the criteria during the experiment. If several egg masses were present on the same substrate, their number was recorded. Egg masses accompanied by a size reference were photographed outside of the water with Panasonic Lumix DMC-GX80K for picture-based measurements in the laboratory. The egg masses were sampled with a scalpel (thoroughly cleaned with ethanol after each sample) and conserved in individually labelled Eppendorf Tubes® with 96.5 % ethanol. They were then stored in a climate chamber at 4°C.

Based on the photographs, the morphotype, the length, the width and the area were determined for 51 *Baetis* sp. egg masses with the software Image J 1.8.0 (Rasband 1997-2018). The length corresponded to the longest axis of the egg mass, and width to the axis perpendicular to the latter.

Table 1 Variables assessed for characterizing the *Baetis* egg masses.

Variables	Modality 1	Modality 2	Modality 3	Modality 4	Modality 5	Variable source
1. Study area						
Position of the oviposition substrate in relation to the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site	Downstream	Upstream				
2. Oviposition substrate						
Type of substrate	Abiotic	Biotic				Hoffmann & Resh, 2003
Position in the streambed	Edge	Middle	Between edge-middle	All the width of streambed		Peckarsky <i>et al.</i> , 2000
Position respectively to the waterline	Emergent	Submerged				Reich, 2004
Embeddness in the sediment (presence or absence of interstitial space on the underside)	Yes	No				Hoffmann & Resh, 2003; Peckarsky <i>et al.</i> , 2000
Flow velocity (upstream of the substrate)	None	Low	Medium	High	Very high	Reich & Downes, 2003
Longest axis (cm) (only for biotic substrate)						Reich & Downes, 2003
Particle size (cm)* (only for abiotic substrate)	Gravel [0.5-8[Pebble [8-26[Boulder ≥ 26			Reich, 2004
Texture	Smooth	Rough	Granular			Hoffmann & Resh, 2003
3. Egg mass						
Position on the substrate	Downstream	Upstream	On top	On the downside	On the side	Reich & Downes, 2003
Immediate environment surrounding the egg mass	Water	Air	Sediment			Alp <i>et al.</i> , 2013
Coating of gelatinous material	Yes	No	Inconspicuous			Reich, 2004

*Approximated from Unified Soil Classification System (USCS - ASTM) (Schoeneberger *et al.*, 2002)

2.5 Data analysis

Among the 693 *Baetis* egg masses sampled, a sub-sample of 236 egg masses were selected for taxonomic identification using molecular analysis (part 2.5.1). The sub-sample was composed of the egg masses sampled at different distances from $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site, and covering all modalities for each variable characterizing egg masses (Table 1). The isotopic analysis was then performed on a part of the sub-sample (N=168) (part 2.5.3).

After morphological identification at the genus level, *Baetis* adults were sexed and kept in an individually labelled Eppendorf Tube® with 96.5 % ethanol for molecular (part 2.5.1) and isotopic analyses (part 2.5.3).

2.5.1 Taxonomic identification of *Baetis* adult females and egg masses

The taxonomic identity (species level) of *Baetis* adult females and egg masses was established by DNA barcoding. For DNA extraction from adult females, one or two leg(s) of *Baetis* individuals were detached from the thorax with dissection forceps (systematically cleaned in 96.5% ethanol, and flame-sterilised between samples) under a microscope. For DNA extraction from egg masses, a subsample of about 10 eggs was separated from each egg mass with dissection forceps (systematically cleaned in 96.5% ethanol, and flame-sterilised between samples) under microscope. Material for DNA extraction was then transferred into a 0.2 mL PCR tube and stored at -18°C .

For the DNA extraction, 150 μL of 7% Chelex solution 100® (Walsh *et al.*, 1991) were added into previously prepared 0.2 mL PCR tubes containing the legs or egg samples. Cellular lysis of the material was performed by the addition of 10 μL of Proteinase K (15 mg/mL) into the PCR tube and followed by incubation in a thermocycler: 56°C for 2 hours, 90°C for 15 min, 15°C for 5 minutes. The PCR tube was spun down in a centrifuge to separate the non-purified DNA (supernatant) from the Chelex (bottom).

The target genetic marker was amplified using Polymerase Chain Reaction (PCR). We used the forward primer LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and the reverse primer HC02198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') to amplify a 710 base pair fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (COI) (Folmer *et al.*, 1994). PCR reaction consisted of 1X buffer (including 3 mM MgCl_2), 0.4 μM of each primer, 0.2 mg/ml of BSA (New England BioLabs), 0.8 mM of each dNTP (Eurogentec), 0.05 U/ μl of EurobioTaq DNA polymerase (Eurobio), 2 μl of non-purified DNA filled up with purified water to a total volume of 50 μL . An initial denaturation step of 3 min at 95°C was followed by 40 cycles of 95°C for 20 s, 51°C for 30 s, 72°C for 45 s and a final elongation step of 5 min at 72°C . To check the amplification quality of the PCR products, 5 μl of each PCR product (+ 1 μl of the mix: GelRed 6X, Glycerol, Bromophenol blue) were analyzed by agarose gel electrophoresis. The gel was examined under a UV transilluminator and photographed. Amplified non-purified DNA was sequenced uni-directionally (forward sequencing) with PCR primer using standard Sanger sequencing (Sanger *et al.*, 1977; Sanger & Coulson, 1975). Sequences were checked manually to remove all tails with bad peaks and checked each nucleobase within the chromatogram with CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). All sequences were identified using BLAST (Altschul *et al.*, 1990) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> at the NCBI GenBank.

2.5.2 Statistical analyses on oviposition behaviour and egg mass morphology

All statistical analyses were performed with R version 4.0.4 (2021-02-15). The packages `plotrix` was used for the non-parametrical test. The packages `ade4`, `RVAideMemoire` and `RColorBrewer` were used to the Multiple Correspondence Analysis (MCA).

a) *Baetis spp.*

A non-parametrical test (Mann–Whitney U test) was used to test the differences in number of egg masses between modalities of particle size, position of the substrate respectively to the waterline and flow velocity.

b) *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus*

To give equal statistical weight for each modality of environmental variables characterizing egg masses, in the cases when several egg masses were sampled from the same substrate, one egg mass per substrate was selected randomly and retained for the analysis (N=104). Multiple Correspondence Analysis (MCA) (Greenacre & Blasius, 2006; Roux & Rouanet, 2005) followed by a Between-Class Analysis (with Monte Carlo method) were performed due to qualitative explanatory environmental variables, to assess potential differences of oviposition behaviour between *Baetis rhodani* (N=93) and *Baetis alpinus* (N=11). Environmental variables used in the MCA were: (1) position of the substrate in the streambed, (2) position of the substrate respectively to the waterline, (3) particle size, (4) texture of the substrate and (5) flow velocity (Table 2). No statistical difference was found in oviposition behaviour between *Baetis alpinus* and *Baetis rhodani* ($p=0.154$). Thus, none analysis on MCA outputs was performed.

A non-parametrical test (Mann–Whitney U test) was used to compare egg mass length, width and area between *Baetis rhodani* (N=39) and *Baetis alpinus* (N=12) and the Chi-square test of homogeneity was used to compare their shape.

Table 2 Environmental variables used for Multiple Correspondence Analysis.

Variables	Modality 1	Modality 2	Modality 3	Modality 4
Position of the substrate in the streambed	Edge	Middle	Edge-middle	
Position of the substrate respectively to the waterline	Emergent	Submerged		
Particle size	Gravel	Pebble	Boulder	
Texture of the substrate	Smooth	Rough	Granular	Smooth-Rough
Flow velocity	Low	Medium	High	

2.5.3 Isotopic analysis

Baetis egg mass and adult female samples were washed with purified water to remove ethanol, using several rounds of centrifugation (14 000 g, 2 min) and manual shaking. Washed egg masses and adult female were then conserved in the freezer at -18 °C for at least 24 h and were subsequently freeze-dried (Christ Alpha 1-4 LDplus). Other types of samples (biofilm, larvae) were oven-dried at 65°C for 48 h. All samples were crushed and 500-600 µg from each sample were weighed, packed in tin capsules and analyzed using an isotope ratio mass spectrometer (Isoprime 100, Elementar) coupled in continuous flow with an elemental analyser (Vario PYRO Cube®, Elementar) to determine their $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios. Measurements were calibrated with international reference materials IAEA-N1, IAEA-N2 and IAEA 305B,

and the results were expressed as $\delta^{15}\text{N}$. In-house standards of aspartate were analysed each 10 samples and the $\delta^{15}\text{N}$ repeatability was lower than $\pm 0.62\text{‰}$ (\pm standard deviation).

a) Analysis of isotopic data and assessment of dispersal distances

Detection of the isotopic enrichment on the food web

According to the natural range of $\delta^{15}\text{N}$ (i.e. $[-5;10\text{‰}]$) proposed by Kendall (1998), the heptageniid larvae were found artificially enriched 10 days (29/03/2021) after the beginning of the experiment, with mean $\delta^{15}\text{N}$ values higher than 70 ‰ downstream of the $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ addition site (Fig. 6).

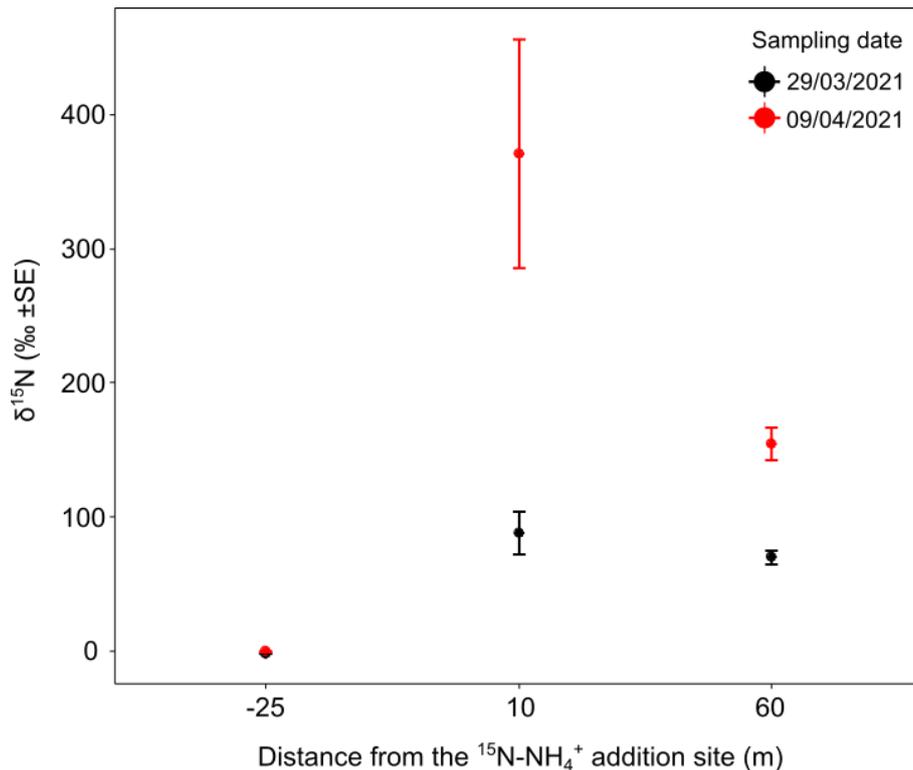


Fig. 6 Mean (\pm SE) $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) of heptageniid larvae in upstream (-25m) and downstream (10m, 60m) of the $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ addition site for two sampling dates.

Distance of the labelled reach and assessment of the dispersal distances

The samples of biofilm downstream of the $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ addition site were found artificially enriched, with $\delta^{15}\text{N}$ values superior to 28 ‰, and $\delta^{15}\text{N}$ values increased between the two sampling dates. For the latest sampling date, the downstream biofilm showed $\delta^{15}\text{N}$ values superior or equal to 80 ‰ over 300m, meaning that isotopic enrichment occurred over a distance greater than 300m (Fig. 7). Therefore, we considered the stream reach of 0-200 m with $\delta^{15}\text{N}$ values superior to 90 ‰ as labelled reach, and adults and egg masses with $\delta^{15}\text{N}$ values superior to 90 ‰ were considered originating from this labelled reach. As a result, the trap site located at 175 m downstream from the $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ addition site appeared to be situated within the labelled reach and was removed for the analysis of dispersal distances. To assess the dispersal distances based on labelled adult females and egg masses, $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ addition site was considered as the point zero for the upstream samples, and the downstream limit of the labelled reach (200 m) was considered as the point zero for the downstream samples.

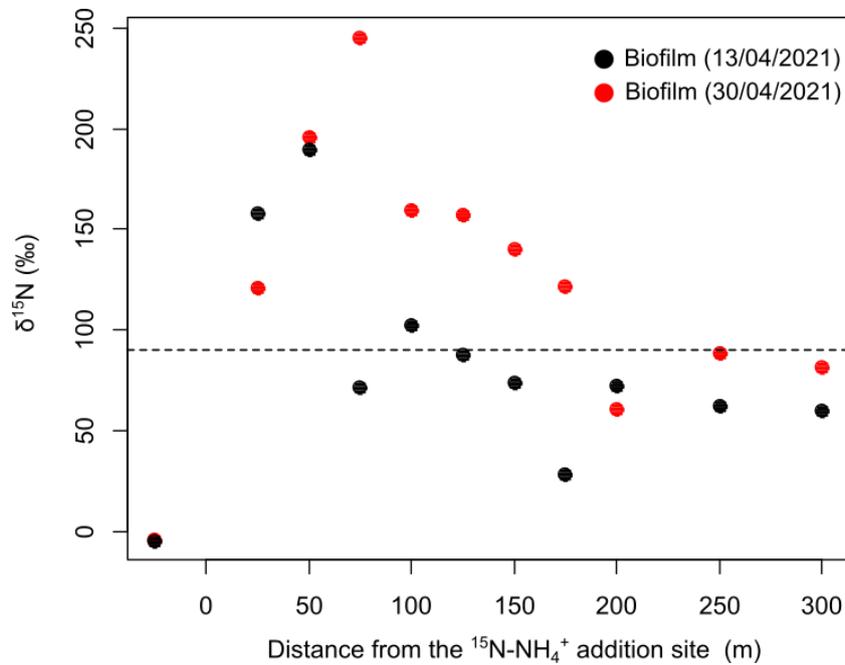


Fig. 7 $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) of biofilm from 25 m upstream to 300 m downstream of the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site (0 m) for two sampling dates. Egg masses and adult females with $\delta^{15}\text{N}$ values superior to 90 ‰ (horizontal dashed line) were considered originating from the labelled reach (0-200 m).

Detection of the isotopic enrichment on Baetis larvae

The samples of *Baetis* larvae downstream of the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site were found artificially enriched 25 days (13/04/2021) after the beginning of the isotopic enrichment, with mean $\delta^{15}\text{N}$ values superior to 142 ‰ (Fig. 8).

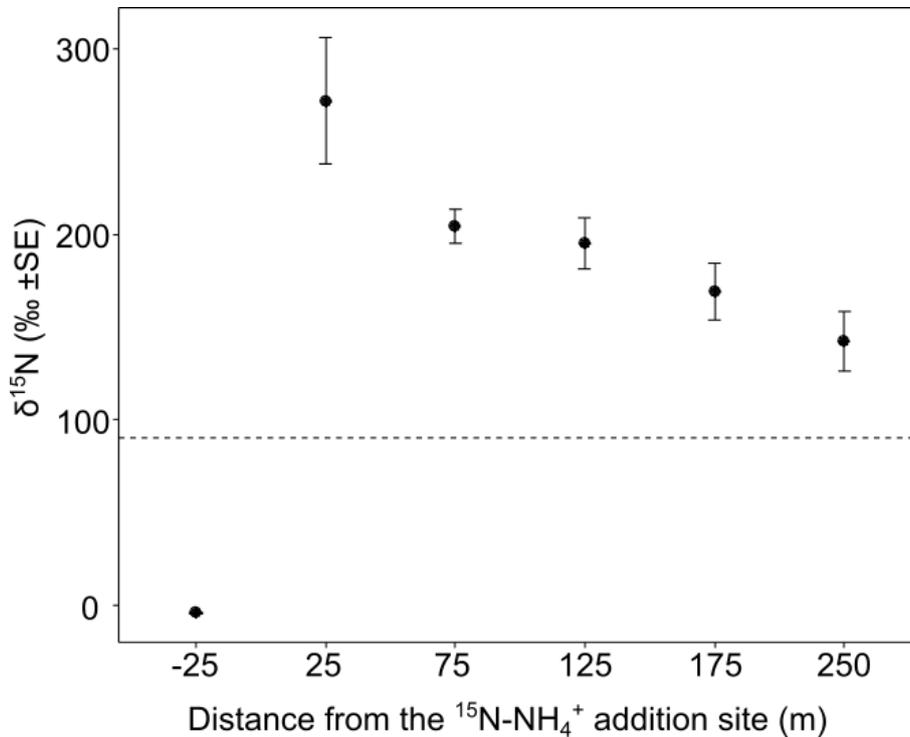


Fig. 8 Mean ($\pm\text{SE}$) $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) of *Baetis* larvae from 25 m upstream to 250 m downstream of the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site. Egg masses and adult females with $\delta^{15}\text{N}$ values superior to 90 ‰ (horizontal dashed line) were considered originating from the labelled reach (0-200 m).

b) Statistical analyses on dispersal distances of *Baetis spp.*

Due to the low number of labelled adult female (N=7) and egg mass (N=10) detections, no statistical analysis could be performed for the dispersal distances based on these two sample types.

III- Results

3.1 Oviposition behaviour of *Baetis spp.* females

Baetis spp. egg masses were found in the Buizin during the whole period of the experiment (April-May 2021) with 4 to 124 egg masses observed at each trap site and sampling date. Most of them were tombstone-shaped (with a small part having a rather round or square shape), with their longest axis between 4.4 and 12.3 mm (Fig. 9). The egg color varied between beige (recently laid egg mass) and dark orange (egg mass laid over a week ago), and no gelatinous protection was observed (Fig. 9). A high diversity of oviposition substrate characteristics was observed for all the parameters assessed. *Baetis spp.* egg masses were found in different areas of the streambed (from stream margins to the middle part of the channel) on the downside of both abiotic (gravels, pebbles, boulders) and biotic substrates (woody debris), either partly emergent or fully submerged. Oviposition substrates were never embedded in the sediment, founded mainly in medium velocity and most abiotic substrates had rough texture. Most small substrates had either one or few (up to 5) egg masses, while groups of up to 31 egg masses were observed on some larger substrates (Fig. 10) with the older and freshly-laid egg masses sometimes superimposed (Fig. 9).

Two species of *Baetis* were identified by DNA barcoding: *Baetis rhodani* (N=166) and *Baetis alpinus* (N=25). Both species exhibited a high diversity of oviposition substrate characteristics as observed for *Baetis spp.*, and were mostly sampled on trap sites between 225 m upstream and 425 m downstream from the $^{15}\text{N-NH}_4^+$ addition site.

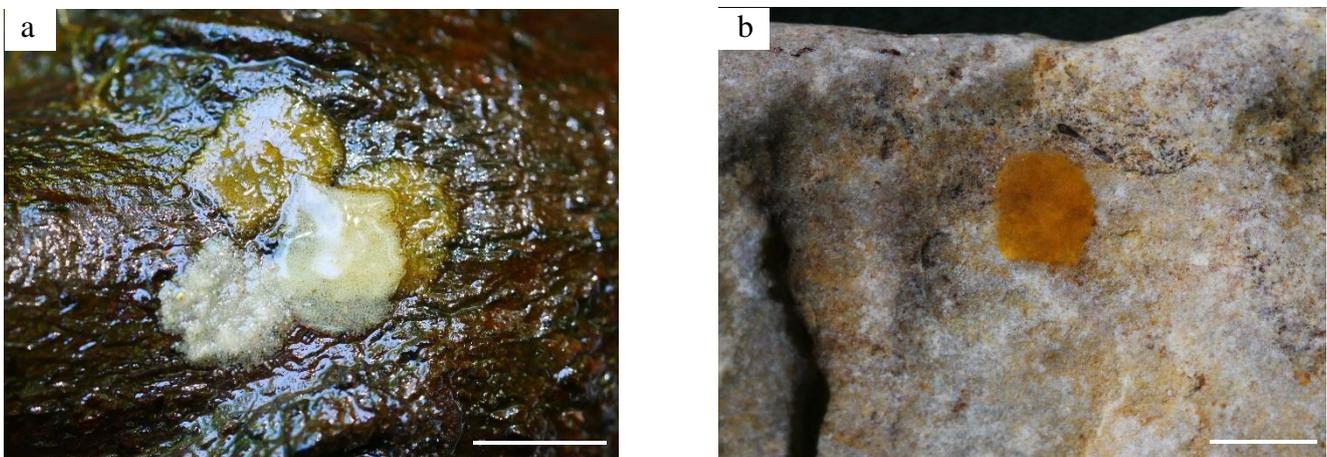


Fig. 9 *Baetis spp.* egg masse(s) on woody debris (a) and a pebble (b). Picture (a): Older egg masses (orange) were superposed with freshly-laid ones (beige). Scale bar: 5 mm.

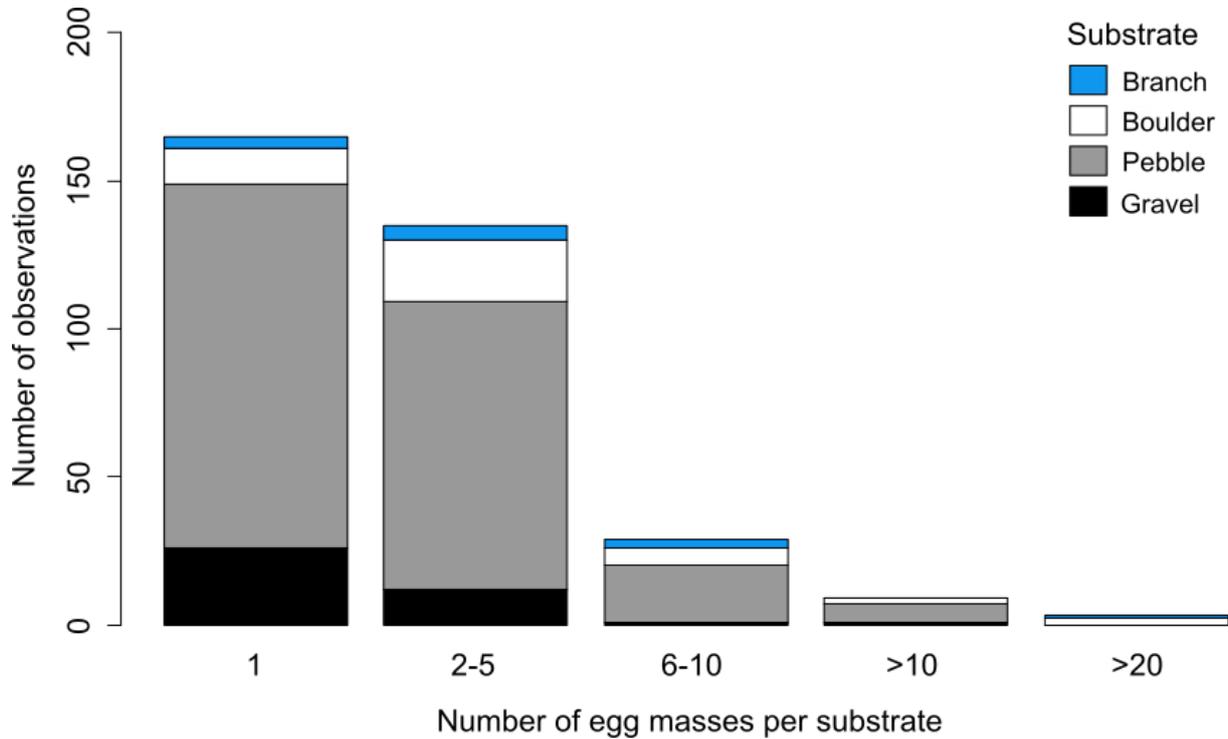


Fig. 10 Number of *Baetis* egg masses observed per substrate, according to the substrate type.

Between the different particle size, boulders had a significantly higher number of egg masses than either pebbles ($W=6854.5$, $p<0.001$) or gravels ($W=1239$, $p<0.001$), which did not differ significantly between them ($W=5663.5$, $p=0.086$) (Fig. 11). Emergent substrate had more egg masses than the submerged substrate ($W=15618$, $p<0.01$). The number of egg masses was higher on the substrate exposed to high flow velocity than medium ($W=12480$, $p<0.01$) and low flow velocity ($W=1261$, $p<0.01$) which did not differ significantly between them ($W=2908.5$, $p=0.138$) (Fig. 12).

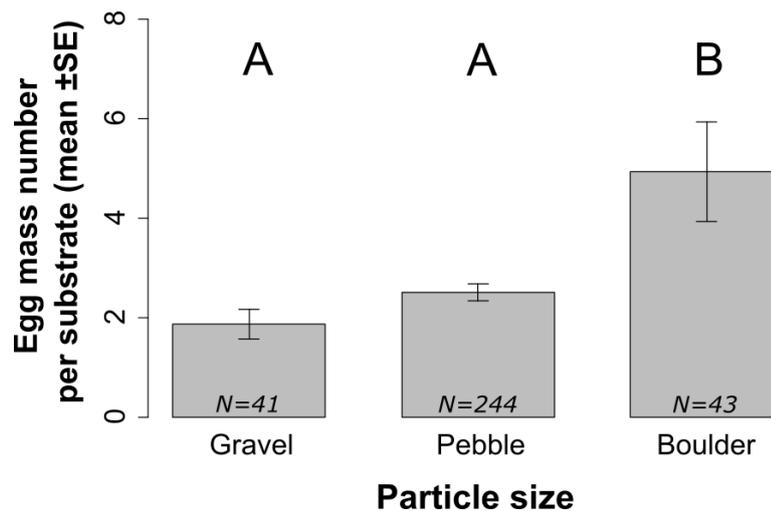


Fig. 11 Number of *Baetis* spp. egg masses on different particle size. Different letters indicate a significant difference between particle size according to a Mann–Whitney U test ($p<0.001$).

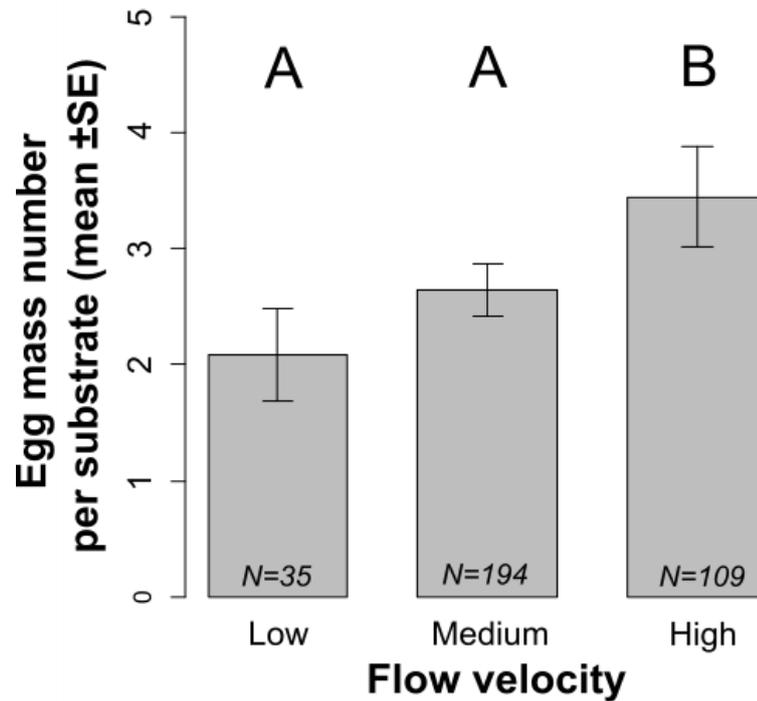


Fig. 12 Number of *Baetis spp.* egg masses on the substrate in different flow velocities. Different letters indicate a significant difference between flow velocities according to a Mann–Whitney U test ($p < 0.01$).

3.2 Substrate characteristics explaining *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus* egg mass presence

The first two axes of Multiple Correspondence Analysis (MCA) explained 32 and 26 % of the total variation, respectively. The particle size, the texture of the substrate were the most important variables on axis 1 (MCA 1), and the flow velocity was the most important variable on axis 2 (MCA 2) (Appendix 1). No significant difference in oviposition substrate characteristics were found between *Baetis rhodani* (N=93) and *Baetis alpinus* (N=11) ($p=0.154$) (Fig. 13).

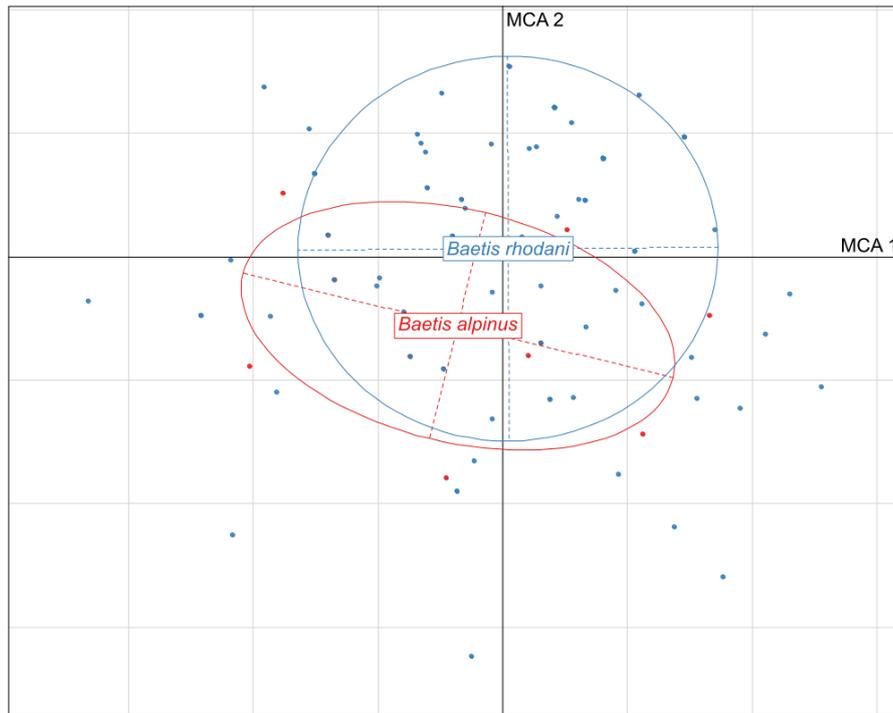


Fig. 13 Multiple Correspondence Analysis (MCA) on *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus* egg masses and environmental variables. Egg masses samples were clustering according to the *Baetis* species.

3.3 Egg mass morphology of *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus*

The image analysis of egg masses attributed by barcoding to *B. rhodani* (N=39) and *B. alpinus* (N=12) showed no significant difference between the two species in egg mass shape species ($X^2=0.171$, $df=1$, $p=0.680$) with tombstone-shaped egg mass predominant (83-92 %) in both species (Fig. 14), and round or square shapes occurring in both species (7-16%). Nonetheless, the length, width and area of *Baetis rhodani* egg masses were significantly higher than *Baetis alpinus* egg masses (Fig. 14, Table 3).



Fig. 14 *Baetis alpinus* (left) and *Baetis rhodani* (right) egg masses on woody debris. Scale: 4 mm.

Table 3 Statistical tests on morphology traits between *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus* egg masses

	<i>Baetis alpinus</i>		<i>Baetis rhodani</i>		<i>p</i>	W
	Mean	Standard error	Mean	Standard error		
Length (mm)	5.9	0.4	8	0.3	0.001	91.5
Width (mm)	4.6	0.2	5.7	0.2	0.002	95.5
Area (mm ²)	23.8	2.2	38.5	2.5	<0.001	81

3.4 Dispersal distances of *Baetis spp.*

In this section, the distance 0 m on the figures corresponded to the stream reach 0-200 m, i.e. labelled reach.

3.4.1 Dispersal distances and pattern based on egg masses samples: “effective” dispersal distance

The majority of isotopically labelled egg masses were found upstream of the labelled reach (Fig. 15): 6 *Baetis rhodani*, 2 *Baetis alpinus* and 1 *Baetis sp.* egg masses (N=9) were detected upstream, while one labelled *Baetis rhodani* egg mass was found downstream. The maximal estimated dispersal distances of *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus* were 725 m and 325 m toward upstream, respectively (Fig. 15).

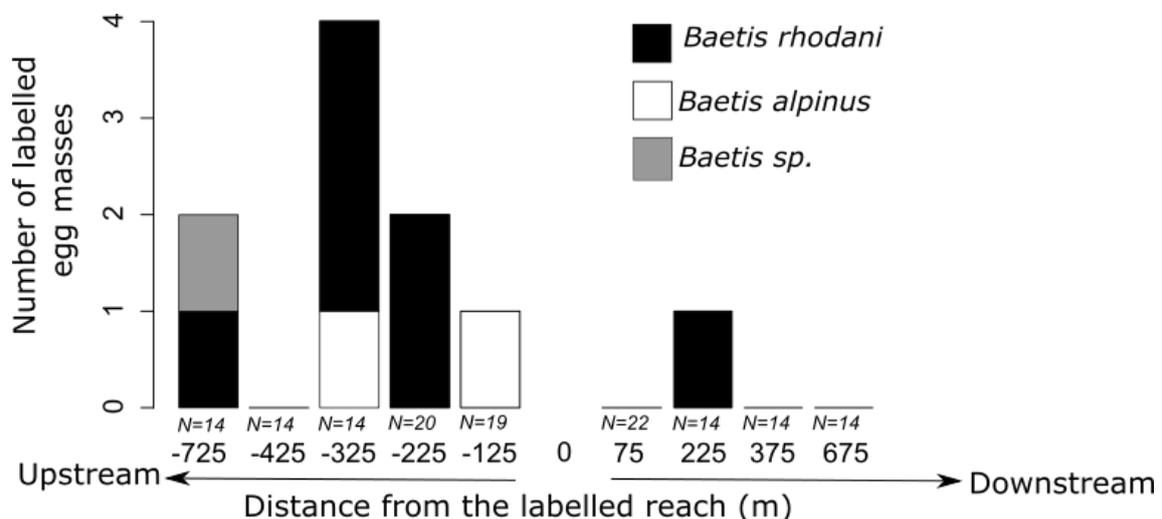


Fig. 15 Number of labelled *Baetis spp.* (*Baetis rhodani*, *Baetis alpinus*, *Baetis sp.*) egg masses with the distance from the labelled reach (0 m). N=x indicates the total number of *Baetis spp.* egg masses analysed for each distance.

3.4.2 Dispersal distances and pattern based on adult females samples: “snapshot” dispersal distance

Similarly to the labelled egg masses, labelled *Baetis spp.* adult females were predominantly found upstream of the labelled reach (N=5), however, the longest detected distance from the labelled site was in the downstream direction. *Baetis rhodani* (N=2) and *Baetis alpinus* adult females (N=4) were found both upstream and downstream of labelled reach (Fig. 16). The maximal estimated dispersal distances of *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus* were 375 m toward downstream and 225 m toward upstream, respectively (Fig. 16).

Moreover, 25 m and 75 m downstream of the labelled reach, 2 and 7 labelled subimagos were found, respectively. Subimagos were not taking into account on the assessment of dispersal distances.

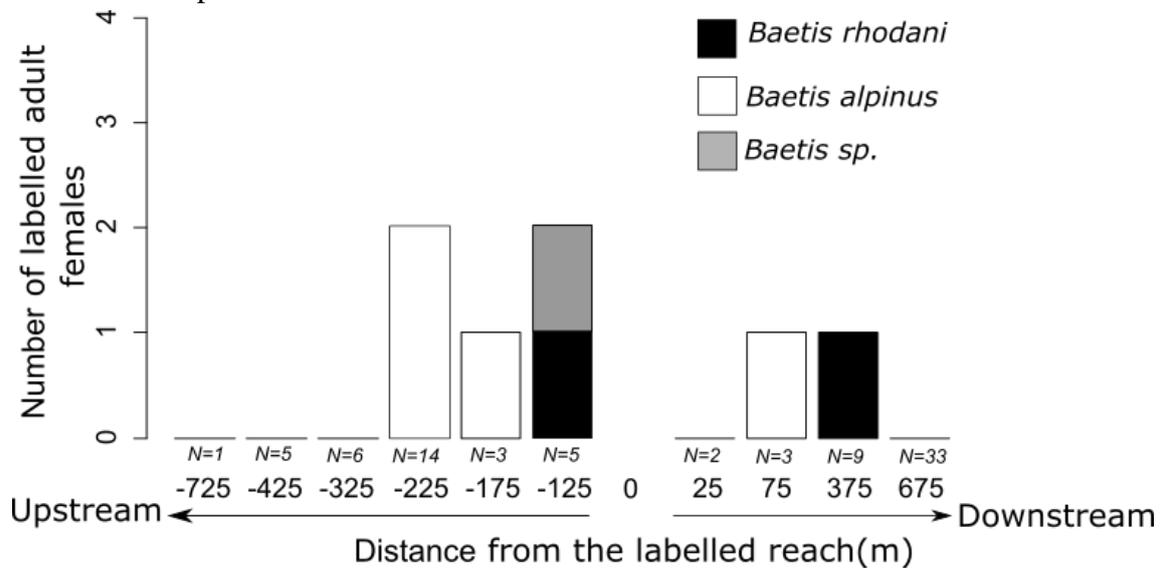


Fig. 16 Number of labelled *Baetis spp.* (*Baetis rhodani*, *Baetis alpinus*, *Baetis sp.*) adult females with the distance from the labelled reach (0 m). N=x indicates the total number of *Baetis spp.* adult females analysed for each distance.

IV-Discussion

4.1 Oviposition behaviour and egg masses morphology of *Baetis spp.* females

Our results showed the highest numbers of egg masses on emergent boulders located in high velocity areas of the streambed. This coincides with the previously reported highly selective oviposition behaviour of *Baetis* females which were observed (in France and in England) to oviposit on emergent boulders in fast-flowing waters (Benech, 1972; Elliott, 1972). Due to this high selectivity, the availability of egg-laying habitat may limit the *Baetis* egg-masses densities locally (Downes *et al.*, in press), and control the larval population size (Encalada & Peckarsky, 2011, 2011; Lancaster *et al.*, 2010).

Our results showed no difference in oviposition behaviour (selected substrates, pattern of egg-laying) between *B. rhodani* and *B. alpinus*, rejecting the *H1* hypothesis that the selection of habitat could potentially differ between these co-occurring *Baetis* species. Moreover, our results showed an intraspecific diversity of oviposition behaviour observed in both *B. rhodani* and *B. alpinus* with the majority of egg masses laid on the downside of emergent boulders, but a significant number of egg masses found on the downside of other substrate types: gravels, pebbles and woody debris. The preferential oviposition on large substrates arises the question on the existence of potential optimal habitat for egg development. We did not measure the survival of the eggs on different substrates, but the boulder seems to be a more suitable habitat for egg development. The stability of boulders decreases the risk that the substrate might roll (e.g. in case of a flood) and the eggs experience mortality by desiccation once in contact with the air (Hoffmann & Resh, 2003). The underneath-boulder micro-habitat was shown to have a lower velocity and siltation, reducing the risk of egg masses dislodgement (Hoffmann & Resh, 2003). In the same way, the hydraulic conditions underneath-boulder may remain the same during the egg development, contrary to a small substrate which could change position (roll) and thus the hydraulic environment. Also, the algal growth and siltation, which negatively affect the egg growth, are reduced on the downside of the boulder (Hoffmann & Resh, 2003). Whether this level of selectivity depends on the availability of different substrate types (context-dependency) is yet unknown. In our study had not recorded the spatial distribution of different available habitat types (within and between sampling site). For time constraints, it was also not possible in the framework of this study to record characteristics of all the substrates checked but not containing egg masses. This strongly limits our capacity of making any conclusions on a potential variation in oviposition substrate selectivity depending on substrate availability.

Our field study allowed us to observe both similarities and differences in egg mass morphology of *B. rhodani* and *B. alpinus*. As a consequence, we cannot fully validate our *H2* hypothesis that two closely related *Baetis* species would not show strong differences in egg mass morphology. First, both species had tombstone-shaped egg masses, a specific shape already observed in other *Baetis* species (e.g. *B. bicaudatus*; Peckarsky *et al.*, 2000). This shape reflects the way by which the females lay their eggs on a substrate, i.e. by a side-to-side movement of its abdomen (Encalada & Peckarsky, 2007). Thus, the pattern of egg-laying

seems to be a conservative behaviour among *Baetis* species. Second, egg masses of *B. rhodani* were bigger than those of *B. alpinus*. This variation in egg mass size has also been recorded for *B. muticus* with egg masses shorter than those of *B. rhodani* (Lancaster *et al.*, 2010). Single egg size (longest axis) of *B. rhodani* and other *Baetis* sp. has been reported to be under 180 μm (Hinton, 1981), and the maximal difference in egg width and length between *Baetis* species to be 32 and 36 μm , respectively (Degrange, 1960). Given this small variation in single egg size, the observed variation in egg mass area suggests, that the number of eggs laid by *B. rhodani* is likely greater than in *B. alpinus*. This conclusion is in agreement with the variation of eggs number already observed within Baetidae with 592-3415 eggs per egg mass (Degrange, 1960; Hinton, 1981). This variation is most probably related to differences in body size of the females reported to be positively correlated with fecundity (Benech, 1972; Brittain, 1982; Elliott & Humpesch, 1980; Peckarsky *et al.*, 1993).

4.2 Dispersal distances of *Baetis*

Overall, our results showed that an isotopic signature distinct from the range of potential natural signatures was maintained through the three life stages (larva, adult, and egg) of *Baetis*. To the best of our knowledge, this study is the first to highlight the successful labelling of stream insect eggs using a stable isotopic enrichment. In the only comparable example we are aware of, Porras *et al.* (2020) managed to label pre-oviposition eggs of terrestrial hemipteran (*Lycorma delicatula*) isotopically, but this study could provide no information on the labelling of egg masses upon oviposition (once separated from the female). In the context of dispersal studies based on isotopic labelling, we are therefore proposing a new method to estimate dispersal distances of stream insects. The limitation of this approach is related to interspecific differences in oviposition behaviour, which impose constraints on our capacity to collect egg masses. It thus appears highly informative for any species fixing their eggs to a stable substrate, which is the case for numerous caddisflies, dipterans, damselflies (Thorp *et al.*, 2016). The eggs of species that release them directly into the water (e.g. stoneflies; DeWalt *et al.*, 2015); or many non-baetid mayflies (Encalada & Peckarsky, 2007) may disperse further upon oviposition and be very difficult to collect in the field.

Our results showed a preferential upstream dispersal of gravid *Baetis* spp. females, in agreement with previous experimental studies on *Baetis* (Flecker & Allan, 1988; Hershey *et al.*, 1993), validating our *H3* hypothesis. For both species (*B. rhodani* and *B. alpinus*), this pattern was less clear due to the low number of labelled samples, but other studies did also highlight a preferential upstream dispersal for *B. rhodani* (Bagge, 1995; Madsen *et al.*, 1973) and *B. alpinus* (Lavandier, 1982). Currently, the preferential upstream dispersal of females is not yet clearly explained in the literature but some potential keys of explanation can be discussed. First, the upstream flight of females may compensate for the downstream drift of larvae (colonisation cycle, Müller, 1982). This concept is the most common theory developed to explain the upstream dispersal and have been demonstrated experimentally for *Baetis* (Hershey *et al.*, 1993). Our study did not evaluate the larvae drift, but we found several labelled subimagos downstream of the labelled reach. Since, the subimagos hardly move, the area where they are captured can be considered as the site of their emergence, suggesting a downstream drift of the larvae to the traps where labelled subimagos were caught. Second, the

hydrological constraints (water level) and the highly selective behaviour of *Baetis* females might constraint them to disperse upstream where suitable egg-laying habitats are more available (Peckarsky *et al.*, 2000). However, as already mentioned above, our study did not evaluate neither the availability of egg-laying habitats on sampling sites neither its temporal variability.

The preferential upstream dispersal of *Baetis* was more evident for estimations based on egg masses than adult females. In addition, the maximal dispersal distances of *B. rhodani* and *B. alpinus* estimated based on egg masses (725m and 325m, respectively) were higher than those estimated based on adult females (375 m and 225m, respectively). As a consequence, we can validate the *H4* hypothesis that the “snapshot” dispersal distance (based on adult females) and “effective” dispersal distance (based on egg masses) differ. Adults trapping seemed to under-estimated the dispersal distances because they might have intercepted female flight impeding them to disperse further. Therefore, the estimation of dispersal distances could be more accurate when based on egg masses than on adult traps. However, this interpretation is limited by the low number of adult females analysed in this work in comparison to egg masses.

The maximal dispersal distances recorded for *B. rhodani* (725m) and *B. alpinus* (325m) were lower than the dispersal distances of 1.6 km-1.9 km (*Baetis spp.*) and 3.7 km (*B. rhodani*) towards upstream recorded in previous study based on stable isotope enrichment/mathematical models (Hershey *et al.*, 1993) and kick netting/adults trapping, respectively (Bagge, 1995). Genetic studies too suggested a potential capacity of *Baetis* to disperse between streams within or between catchments (Alp *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 1995). In our study, the maximal dispersal distance assessed for *B. rhodani* (725m) was higher than for *B. alpinus* (325m), suggesting that *B. rhodani* may potentially be better dispersers than *B. alpinus*, but few numbers of labelled samples of both species limits our interpretation. Also, the comparison of our results to the dispersal distances reported in the literature is limited, because others studies used different approaches, and the specificities of each study system with the specific availability of habitat, wind orientation and speed, vegetation patterns and morphology of valley, most probably have a strong effect on insect dispersal distances. Thus, our conclusions can only be considered as very preliminary.

To avoid an overestimation of the dispersal distances, we chose a conservative approach and considered the up- and downstream boundaries of the labelled reach as the departure points for dispersal in the up- and downstream direction, respectively. However, this may have led to an underestimation of the dispersal distances. For instance, for a female that might have emerged in the downstream end of the labelled site and dispersed in the upstream direction, we would only count the portion of her trajectory starting from the point when she left the labelled reach (a maximum error of 200 m). Also, the labelled subimagos found downstream of the labelled reach suggested a downstream drift of the larvae, implying a bias to the estimated of dispersal distances potentially resulted from a combination of the downstream drift and dispersal by flight. Thus, the potential downstream drift of labelled larvae could lead to an over-estimation of the downstream dispersal distances by the adults, and to a potential under-estimation of the upstream dispersal distances by the adults.

This study highlights the importance of deepening our knowledge in terms of egg mass morphology and the understanding of the oviposition behaviour of stream insect taxa. Gaining further insights in this regard would be relevant both for a better understanding of processes regulating population dynamics, but would also give new perspectives in bioindication, where egg stages have been overlooked till now. Furthermore, our study is the first one to use labelled egg stages to assess the “effective” dispersal distances of stream insects. Importantly, to improve reliability and precision of these first results, we would need to repeat this experiment on several streams over a long-time, and focusing on different species. Finally, our study opens a new perspective of methods to assess the dispersal distances of stream insects.

References

- Alp, M., Indermaur, L., & Robinson, C. T. (2013). Environmental constraints on oviposition of aquatic invertebrates with contrasting life cycles in two human-modified streams. *Freshwater Biology*, 58(9), 1932–1945.
- Alp, M., Keller, I., Westram, A. M., & Robinson, C. T. (2012). How river structure and biological traits influence gene flow: A population genetic study of two stream invertebrates with differing dispersal abilities. *Freshwater Biology*, 57(5), 969–981.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Bagge, P. (1995). Emergence and upstream flight of lotic mayflies and caddisflies (Ephemeroptera and Trichoptera) in a lake outlet, central Finland. *Entomologica Fennica*, 6(2–3), 91–97.
- Bauernfeind, E., & Soldan, T. (2013). *The Mayflies of Europe (Ephemeroptera)*. BRILL.
- Baumgartner, S. D., & Robinson, C. T. (2017). Short-term colonization dynamics of macroinvertebrates in restored channelized streams. *Hydrobiologia*, 784(1), 321–335.
- Benech, V. (1972). La Fecondite de Baetis rhodani Pictet. *Freshwater Biology*, 2(4), 337–354.
- Bird, G. A., & Hynes, H. B. N. (1981). Movements of adult aquatic insects near streams in Southern Ontario. *Hydrobiologia*, 77(1), 65–69.
- Blakely, T. J., Harding, J. S., McIntosh, A. R., & Winterbourn, M. J. (2006). Barriers to the recovery of aquatic insect communities in urban streams. *Freshwater Biology*, 51(9), 1634–1645.
- Bouchard, J. R. W. (2004). *Guide to Aquatic Invertebrates of the Upper Midwest: Identification Manual for Students, Citizen Monitors, and Aquatic Resource Professionals*. University Of Minnesota.
- Bowler, D. E., & Benton, T. G. (2005). Causes and consequences of animal dispersal strategies: Relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biological Reviews*, 80(2), 205–225.
- Briers, R. A., Gee, J. H. R., Cariss, H. M., & Geoghegan, R. (2004). Inter-population dispersal by adult stoneflies detected by stable isotope enrichment. *Freshwater Biology*, 49(4), 425–431.
- Brittain, J. E. (1982). *Biology of Mayflies*. 29.
- Broquet, T., & Petit, E. J. (2009). Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), 193–216.
- Buffagni, A., & Comin, E. (2000). Secondary production of benthic communities at the habitat scale as a tool to assess ecological integrity in mountain streams. *Hydrobiologia*, 422(0), 183–195.
- Bunn, S. E., & Hughes, J. M. (1997). Dispersal and Recruitment in Streams: Evidence from Genetic Studies. *Journal of the North American Benthological Society*, 16(2), 338–346.

- Caudill, C. C. (2003). Measuring dispersal in a metapopulation using stable isotope enrichment: High rates of sex-biased dispersal between patches in a mayfly metapopulation. *Oikos*, 101(3), 624–630.
- Chaput-Bardy, A., Lemaire, C., Picard, D., & Secondi, J. (2008). In-stream and overland dispersal across a river network influences gene flow in a freshwater insect, *Calopteryx splendens*. *Molecular Ecology*, 17(15), 3496–3505.
- Clobert, J., Danchin, E., Dhondt, A., & Nichols, J. (2001). *Dispersal*. Oxford University Press.
- Conrad, K. F., Willson, K. H., Harvey, I. F., Thomas, C. J., & Sherratt, T. N. (1999). Dispersal characteristics of seven odonate species in an agricultural landscape. *Ecography*, 22(5), 524–531.
- d'Aguilar, J., & Dommanget, J. (1998). *Guide des libellules d'Europe et d'Afrique du Nord*. Delachaux & Niestle.
- Degrange, C. (1960). Recherches sur la reproduction des Ephemeropteres. *Trav. Lab. Hydrobiol. Piscic. Univ. Grenoble*, 51, 7–193.
- DeWalt, R. E., Kondratieff, B. C., & Sandberg, J. B. (2015). Order Plecoptera. *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates: Ecology and General Biology: Fourth Edition*, 933–949.
- Downes, B., Peckarsky, B., Lancaster, J., Bovill, W. D., & Alp, M. (in press). *From insects to frogs, egg-juvenile recruitment can have persistent effects on population sizes*. 45.
- Eaton, A. E. (1888). *A Revisional Monograph of Recent Ephemeridae Or Mayflies*. Taylor & Francis.
- Edmunds, G. F., Jensen, S. L., & Berner, L. (1976). *The mayflies of North and Central America*. University of Minnesota Press.
- Elizabeth Graham, S., Storey, R., & Smith, B. (2017). Dispersal distances of aquatic insects: Upstream crawling by benthic EPT larvae and flight of adult Trichoptera along valley floors. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 51(1), 146–164.
- Elliott, J. M. (1972). *Effect of Temperature on the Time of Hatching in Baetis rhodani (Ephemeroptera: Baetidae)*. 5.
- Elliott, J. M. (2008). The Ecology of Riffle Beetles (Coleoptera: Elmidae). *Freshwater Reviews*, 1(2), 189–203.
- Elliott, J. M., & Humpesch, U. H. (1980). *EGGS OF EPHEMEROPTERA*. 7.
- Elmhagen, B., & Angerbjörn, A. (2001). The applicability of metapopulation theory to large mammals. *Oikos*, 94(1), 89–100.
- Encalada, A. C., & Peckarsky, B. L. (2006). Selective oviposition of the mayfly *Baetis bicaudatus*. *Oecologia*, 148(3), 526–537.
- Encalada, A. C., & Peckarsky, B. L. (2007). A comparative study of the costs of alternative mayfly oviposition behaviors. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(9), 1437–1448.
- Encalada, A. C., & Peckarsky, B. L. (2011). The influence of recruitment on within-generation population dynamics of a mayfly. *Ecosphere*, 2(10), art107.

- Flecker, A. S., & Allan, J. D. (1988). Flight direction in some rocky mountain mayflies (Ephemeroptera), with observations of parasitism. *Aquatic Insects*, 10(1), 33–42.
- Folmer, O., Black, M., Wr, H., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Füreder, L., Gherardi, F., Holdich, D., Reynolds, J., Sibley, P., & Souty-Grosset, C. (2010). *Austropotamobius pallipes* [Data set]. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.
- Füreder, L., & Reynolds, J. D. (2003). IS AUSTROPOTAMOBIUS PALLIPES A GOOD BIOINDICATOR?*. *Bulletin Français de La Pêche et de La Pisciculture*, 370–371, 157–163.
- Gandon, S., Capowiez, Y., Dubois, Y., Michalakakis, Y., & Olivieri, I. (1996). Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1373), 1003–1009.
- Gilpin, E. M., & Hanski, I. (1991). *Metapopulation Dynamics: Empirical and Theoretical Investigations*. 325.
- Greenacre, M., & Blasius, J. (2006). *Multiple Correspondence Analysis and Related Methods* (1er édition). Chapman and Hall/CRC.
- Hershey, A. E., Pastor, J., Peterson, B. J., & Kling, G. W. (1993). Stable Isotopes Resolve the Drift Paradox for Baetis Mayflies in an Arctic River. *Ecology*, 74(8), 2315–2325.
- Hinton, H. E. (1981). *Biology of insect eggs* (1st ed). Pergamon Press.
- Hoffmann, A., & Resh, V. H. (2003). Oviposition in three species of limnephiloid caddisflies (Trichoptera): Hierarchical influences on site selection. *Freshwater Biology*, 48(6), 1064–1077.
- Hoffsten, P.-O. (2004). Site-occupancy in relation to flight-morphology in caddisflies. *Freshwater Biology*, 49(6), 810–817.
- Hughes, J. M. (2007). Constraints on recovery: Using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams. *Freshwater Biology*, 52(4), 616–631.
- Hughes, J. M., Mather, P. B., Hillyer, M. J., Cleary, C., & Peckarsky, B. (2003). Genetic structure in a montane mayfly *Baetis bicaudatus* (Ephemeroptera: Baetidae), from the Rocky Mountains, Colorado. *Freshwater Biology*, 48(12), 2149–2162.
- Hughes, J. M., Schmidt, D. J., & Finn, D. S. (2009). Genes in Streams: Using DNA to Understand the Movement of Freshwater Fauna and Their Riverine Habitat. *BioScience*, 59(7), 573–583.
- Kendall, C. (1998). Chapter 16—Tracing Nitrogen Sources and Cycling in Catchments. In C. Kendall & J. J. McDONNELL (Eds.), *Isotope Tracers in Catchment Hydrology* (pp. 519–576). Elsevier.
- Kitto, J. A. J., Gray, D. P., Greig, H. S., Niyogi, D. K., & Harding, J. S.

- (2015). Meta-community theory and stream restoration: Evidence that spatial position constrains stream invertebrate communities in a mine impacted landscape. *Restoration Ecology*, 23(3), 284–291.
- Kjærstad, G., Arnekleiv, J. V., Speed, J. D. M., & Herland, A. K. (2018). Effects of hydropeaking on benthic invertebrate community composition in two central Norwegian rivers. *River Research and Applications*, 34(3), 218–231.
- Lancaster, J., Downes, B. J., & Arnold, A. (2010). Oviposition site selectivity of some stream-dwelling caddisflies. *Hydrobiologia*, 652(1), 165–178.
- Lancaster, J., & Glaister, A. (2019). Egg masses of some stream-dwelling caddisflies (Trichoptera: Hydrobiosidae) from Victoria, Australia. *Austral Entomology*, 58(3), 561–568.
- Lavandier, P. (1982). Evidence of upstream migration by female adults of *Baetis alpinus* pict. (Ephemeroptera) at high altitude in the pyrenees. *Annales de Limnologie*, 18(1), 55–59.
- Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F., Holt, R. D., Shurin, J. B., Law, R., Tilman, D., Loreau, M., & Gonzalez, A. (2004). The metacommunity concept: A framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters*, 7(7), 601–613.
- Leibold, M. A., & Miller, T. E. (2004). 6—From Metapopulations to Metacommunities. In I. Hanski & O. E. Gaggiotti (Eds.), *Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations* (pp. 133–150). Academic Press.
- Lenormand, T. (2002). Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4), 183–189.
- Levins, R. (1969). Some Demographic and Genetic Consequences of Environmental Heterogeneity for Biological Control. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 15(3), 237–240.
- López-Rodríguez, M. J., Figueroa, J., & Alba-Tercedor, J. (2008). Life history and larval feeding of some species of Ephemeroptera and Plecoptera (Insecta) in the Sierra Nevada (Southern Iberian Peninsula). *Hydrobiologia*, 610, 277–295.
- Loreau, M., & Holt, R. D. (2004). Spatial Flows and the Regulation of Ecosystems. *The American Naturalist*, 163(4), 606–615.
- Macneale, K. H., Peckarsky, B. L., & Likens, G. E. (2004). Contradictory results from different methods for measuring direction of insect flight. *Freshwater Biology*, 49(10), 1260–1268.
- Macneale, K. H., Peckarsky, B. L., & Likens, G. E. (2005). Stable isotopes identify dispersal patterns of stonefly populations living along stream corridors. *Freshwater Biology*, 50(7), 1117–1130.
- Madsen, B., Bengtsson, J., & Butz, I. (1977). Upstream movement by some Ephemeroptera species. *81(1)*, 119–127.
- Madsen, B. L., Bengtson, J., & Butz, I. (1973). Observations on upstream migration by imagines of some

- Plecoptera and Ephemeroptera. *Limnology and Oceanography*, 18(4), 678–681.
- Malaise, R. (1937) A new insect trap. *Entomologisk Tidskrift*, 58, 148–160.
- Malmqvist, B. (2000). How does wing length relate to distribution patterns of stoneflies (Plecoptera) and mayflies (Ephemeroptera)? *Biological Conservation - BIOL CONSERV*, 93, 271–276.
- Massol, F., Altermatt, F., Gounand, I., Gravel, D., Leibold, M. A., & Mouquet, N. (2017). How life-history traits affect ecosystem properties: Effects of dispersal in meta-ecosystems. *Oikos*, 126(4), 532–546.
- Masters, Z., Peteresen, I., Hildrew, A. G., & Ormerod, S. J. (2007). Insect dispersal does not limit the biological recovery of streams from acidification. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 17(4), 375–383.
- Merritt, R. W., Cummins, K. W., & Berg, M. B. (Eds.). (1996). *Introduction to Aquatic Insects in North America* (4th edition). Kendall Hunt Publishing Company.
- Morgan, A. H. (1911). May-Flies of Fall Creek. *Annals of the Entomological Society of America*, 4(2), 93–119.
- Morrissey, M. B., & de Kerckhove, D. T. (2009). The Maintenance of Genetic Variation Due to Asymmetric Gene Flow in Dendritic Metapopulations. *The American Naturalist*, 174(6), 875–889.
- Müller, K. (1982). The colonization cycle of freshwater insects. *Oecologia*, 52(2), 202–207.
- Murphy, H. E. (1922). *Notes on the Biology of Some of Our North American Species of May-flies*. Cornell University.
- Peckarsky, B. L., Cowan, C. A., Penton, M. A., & Anderson, C. (1993). Sublethal Consequences of Stream-Dwelling Predatory Stoneflies on Mayfly Growth and Fecundity. *Ecology*, 74(6), 1836–1846.
- Peckarsky, B. L., Taylor, B. W., & Caudill, C. C. (2000). Hydrologic and behavioral constraints on oviposition of stream insects: Implications for adult dispersal. *Oecologia*, 125(2), 186–200.
- Petersen, I., Masters, Z., Hildrew, A. G., & Ormerod, S. J. (2004). Dispersal of adult aquatic insects in catchments of differing land use. *Journal of Applied Ecology*, 41(5), 934–950.
- Peterson, B., Fry, B., Deegan, L., & Hershey, A. (1993). The trophic significance of epilithic algal production in a fertilized tundra river ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 38(4), 872–878.
- Porrás, M. F., López-Londoño, T., Rost, J., Biddinger, D., Calvin, D., & Rajotte, E. G. (2020). A Method for a Long-Term Marking of Spotted Lanternfly (Hemiptera: Fulgoridae) Using a Stable Isotope of Nitrogen. *Environmental Entomology*, 49(4), 993–997.
- Reich, P. (2004). Patterns of composition and abundance in macroinvertebrate egg masses from temperate Australian streams. *Marine and Freshwater Research*, 55(1), 39–56.

- Reich, P., & Downes, B. J. (2003). The distribution of aquatic invertebrate egg masses in relation to physical characteristics of oviposition sites at two Victorian upland streams: *Oviposition strategies of aquatic taxa*. *Freshwater Biology*, 48(9), 1497–1513.
- Ronce, O. (2007). How Does It Feel to Be Like a Rolling Stone? Ten Questions About Dispersal Evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), 231–253.
- Roux, B. L., & Rouanet, H. (2005). *Geometric Data Analysis: From Correspondence Analysis to Structured Data Analysis*. Springer Netherlands.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Sarremejane, R., Mykrä, H., Bonada, N., Aroviita, J., & Muotka, T. (2017). Habitat connectivity and dispersal ability drive the assembly mechanisms of macroinvertebrate communities in river networks. *Freshwater Biology*, 62(6), 1073–1082.
- Sartori, M., & Brittain, J. E. (2015). Chapter 34—Order Ephemeroptera. In J. H. Thorp & D. C. Rogers (Eds.), *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates (Fourth Edition)* (pp. 873–891). Academic Press.
- Schmidt, S. K., Hughes, J. M., & Bunn, S. E. (1995). Gene Flow among Conspecific Populations of *Baetis* sp. (Ephemeroptera): Adult Flight and Larval Drift. *Journal of the North American Benthological Society*, 14(1), 147–157.
- Schoeneberger, P., Wysocki, D., Benham, E., & Broderick, W. (2002). *Field Book for Describing and Sampling Soils, Version 2.0*.
- Schooley, R., & Cosentino, B. (2018). *Metapopulation Dynamics of Wetland Species* (pp. 141–147).
- Slatkin, M. (1987). *Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations*. 236, 7.
- Smith, R. F., Alexander, L. C., & Lamp, W. O. (2009). Dispersal by terrestrial stages of stream insects in urban watersheds: A synthesis of current knowledge. *Journal of the North American Benthological Society*, 28(4), 1022–1037.
- Studemann, D., Landolt, P., Sartori, M., Hefti, D., Tomka, I., (1992). Ephemeroptera. *Insecta Helvetica Fauna* 9. Neuchâtel. 175.
- Taylor, P. D., Fahrig, L., Henein, K., & Merriam, G. (1993). Connectivity Is a Vital Element of Landscape Structure. *Oikos*, 68(3), 571.
- Thorp, J. H., Rogers, D. C., & Covich, A. P. (Eds.). (2016). *Thorp and Covich's Freshwater invertebrates (Fourth edition)*. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for

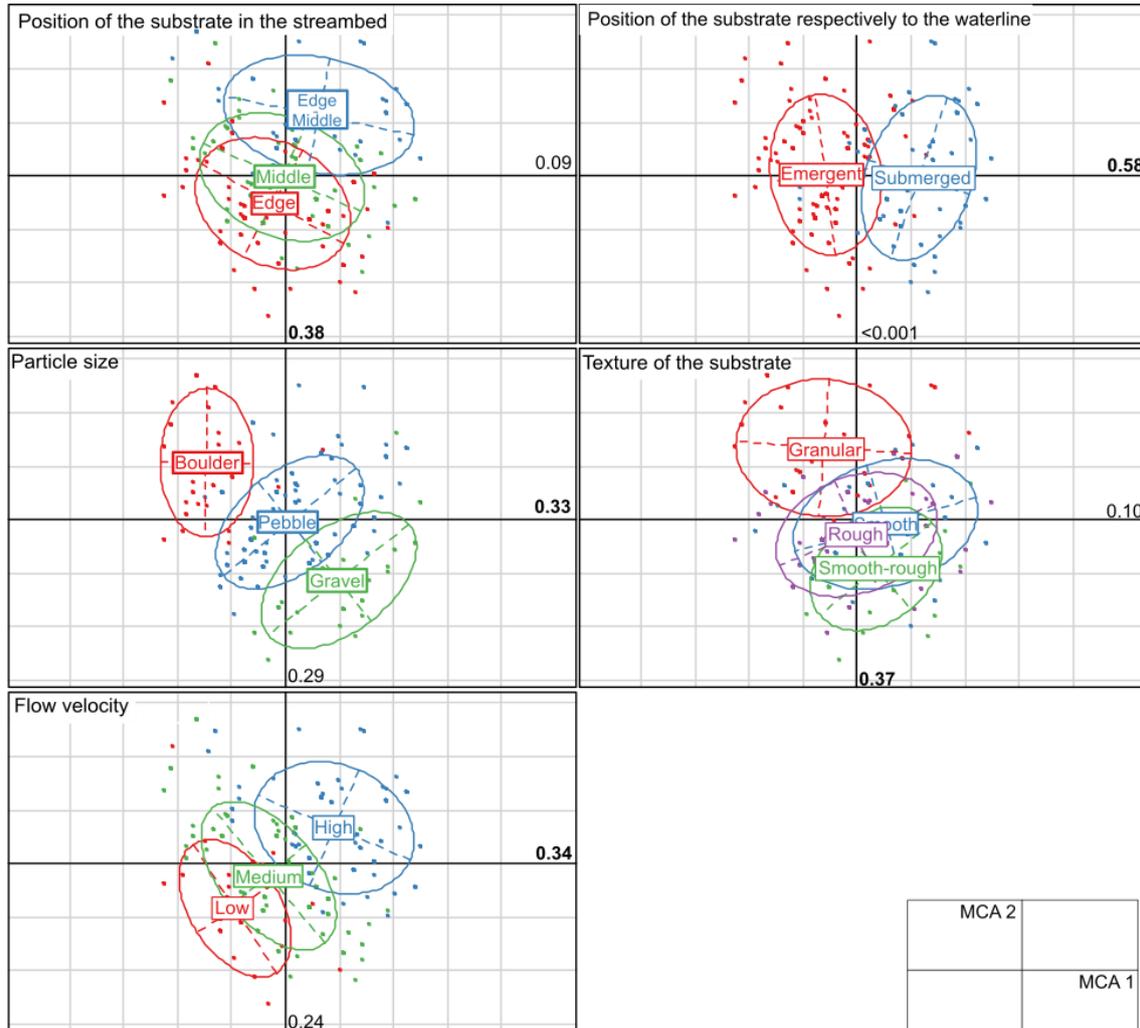
PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10(4), 506–513.

Wilson, D. S. (1992). Complex Interactions in Metacommunities,

with Implications for Biodiversity and Higher Levels of Selection. *Ecology*, 73(6), 1984–2000.

Appendices

Appendix 1 Multiple Correspondence Analysis (MCA) on *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus* egg masses and environmental variables, with each environmental variable in an individual factorial plane. The numbers on the axes indicate the correlation ratios (with values superior or equal to 0.3 in bold).



Appendix 2 R script

```
##### MSc Thesis JAULIN Emmanuel #####
##### DispEff project #####

# Loading the packages

library(plotrix)

library(car)

library(ade4)

library(RVAideMemoire)

library(RColorBrewer)

##### Preparation of the data #####

# Load the data

dispeff=read.table("Data_nettoyé_v20210706.txt", header= T)

# Remove the samples without number

dispeff=dispeff[which(dispeff$Sample_number!="NA"),]

dispeff=dispeff[-which(dispeff$Code_substrat=="Remove"),]

#Select only the Baetis egg masses

dispeff=dispeff[which(dispeff$Nom_masse_oeuf=="Baetis"),]

#### Environmentales variables ####

# Variable: Position of egg masses on substrat --> Remove the term Au (low proportion)

prop.table(table(dispeff$Substrat_position))*100

dispeff[which(dispeff$Substrat_position=="Au"),29]=NA

# Variable: Velocity. Combined the terms « Fort » and « Tres fort ». Removed the term «
Nulle » (low proportion)

prop.table(table(dispeff$Velocity_reduced))*100

dispeff[which(dispeff$Velocity_reduced=="Tres_Fort"),31]="Fort"

dispeff[which(dispeff$Velocity_reduced=="Nulle"),31]=NA

# Variable: Substrate. Removed “Branche” and “Ecorce” due to low proportion

prop.table(table(dispeff$Substrat))*100
```

```

dispeff[which(dispeff$Substrat=="Ecorce"),23]=NA
dispeff[which(dispeff$Substrat=="Branche"),23]=NA

#### Select randomly one egg mass samples per substrat
try=as.data.frame(table(dispeff$Code_substrat))
# Keep the substrat on which one egg mass was founded
cs_1=as.vector(try$Var1[which(try$Freq==1)])
stock_row1=c()
for (i in 1:length(cs_1)){
  stock_row1=c(stock_row1, which(dispeff$Code_substrat==cs_1[i]))
}
# For others substrat, choose randomly on egg masses samples
try$Var1[which(try$Freq>1)]
cs_plus=as.vector(try$Var1[which(try$Freq>1)])
stockrowplus=c()
for(i in 1:length(cs_plus)){
  set.seed(123)
  stockrowplus=c(stockrowplus,sample(which(dispeff$Code_substrat==cs_plus[i]),1))
}
# Gathered under one data egg masses samples (one per substrate)
dispeff_reduct=dispeff[c(stock_row1,stockrowplus),]
##### Preparation of the data for multivariate analysis #####
### A multiple correspondence analysis (MCA) were performed on Baetis rhodani and
Baetis alpinus egg masses
## Data for Baetis rhodani and Baetis alpinus
Baetis_sp=dispeff_reduct[,c(5,47,18,19,23,24,29,31)]
Baetis_sp=Baetis_sp[which(Baetis_sp$Espece=="Baetis_rhodani" |
  Baetis_sp$Espece=="Baetis_alpinus"),]
Baetis_sp[,1:ncol(Baetis_sp)] <- lapply(Baetis_sp[,1:ncol(Baetis_sp)], factor)

```

```

## For each variables, we have to check the proportion of each modalities
# Position of the substrate in the streambed
prop.table(table(Baetis_sp$In_stream_position_egg))*100

# Water position
prop.table(table(Baetis_sp$Water_position))*100

# Substrate
prop.table(table(Baetis_sp$Substrat))*100

# Texture of the substrate
prop.table(table(Baetis_sp$Texture))*100

# Flow velocity
prop.table(table(Baetis_sp$Velocity_reduced))*100

##### MCA on Baetis rhodani and Baetis alpinus egg masses samples with
environmental variables #####
ACM_sp<-dudi.acm(df = Baetis_sp[,c(3,4,5,6,8)], scannf = FALSE, nf = 5)
# Inertia of each axis
barplot(ACM_sp$eig)
# Correlatiove ratios of each MCA axis
round(ACM_sp$cr,2)
# Graphic representation of each environmental variables on individual factorial plane
scatter(ACM_sp, col = brewer.pal(4, "Set1"))
## Determine if both species had different oviposition behaviour
# Position of both species on factorial plane of the MCA
s.class(ACM_sp$li, Baetis_sp$Espece, col = brewer.pal(4, "Set1"),cstar=0)
# Between-class analysis
test_sp=bca(ACM_sp, Baetis_sp$Espece, scan=FALSE, nf=5)
randtest(test_sp)

```

```

plot(randtest(test_sp), las=1)
# p-value= 0.154
# Thus both species not differed on their oviposition behaviour
# We can analyzed the oviposition behaviour with all samples of Baetis spp.

#### Environmental variables according to the number of egg masses on substrate ####
### 1. Substrat ~ number of egg masses per substrat
# We have 3 independent modalities: Gravel / Pebble / Boulder
# Graphic representation to see the mean of each modalities
boxplot(Nombre_total~Substrat, data=dispeff_reduct)
# Test the equality of variances
bartlett.test(Nombre_total~Substrat, data=dispeff_reduct)
# p-value inferior to 0.05, so we haven't an equality of variance between modalities
# We did a Kruskal-wallis test
kruskal.test(Nombre_total~Substrat, data=dispeff_reduct)
# p-value inferior to 0.05. We have significant differences of median among modalities.

# We have to do 3 Mann-Whitney tests.
# A Bonferroni correction was used. we have 3 comparisons, thus the p-value was
0.05/3=0.01666667

# Comparison boulder & gravel
wilcox.test(Nombre_total[which(Substrat=="B" | Substrat=="G")]~
            Substrat[which(Substrat=="B" | Substrat=="G")],
            data=dispeff_reduct, paired=FALSE)
# pvalue =0.000267, inferior to threshold

# Comparison boulder & pebble
wilcox.test(Nombre_total[which(Substrat=="B" | Substrat=="C")]~
            Substrat[which(Substrat=="B" | Substrat=="C")],

```

```

        data=dispeff_reduct, paired=FALSE)
# pvalue =0.0008003, inferior to threshold

# Comparison Gravel & pebble
wilcox.test(Nombre_total[which(Substrat=="G" | Substrat=="C")]~
            Substrat[which(Substrat=="G" | Substrat=="C")],
            data=dispeff_reduct, paired=FALSE)
# pvalue =0.08582, superior to threshold
# Boudler had a higher number of egg masses than pebble and gravel

## Graphic representation
# Mean
Gravel = mean(dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat == "G"),]$Nombre_total)
Pebble = mean(dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat == "C"),]$Nombre_total)
Boulder = mean(dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat == "B"),]$Nombre_total)

# Barplot
bp = barplot(c(Gravel, Pebble, Boulder), ylim = c(0,8),
            names.arg = c("Gravel", "Pebble", "Boulder"),
            xlab="",
            ylab="",
            space = c(0.5,0.5,0.5))

# Error standard
se_Gravel = dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat == "G"),]$Nombre_total
se_Pebble = dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat == "C"),]$Nombre_total
se_Boulder = dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat == "B"),]$Nombre_total

# Added error standard on the barplot
inf = c(Gravel-std.error(se_Gravel), Pebble-std.error(se_Pebble), Boulder-
std.error(se_Boulder))

```

```

sup = c(Gravel+std.error(se_Gravel),      Pebble+std.error(se_Pebble),
        Boulder+std.error(se_Boulder))

arrows(bp,inf,bp,sup, lwd = 1, angle = 90, length = 0.1, code = 3)

### 2. Number of egg masses according to the velocity

boxplot(Nombre_total~Velocity_reduced, data=dispeff_reduct)
bartlett.test(Nombre_total~Velocity_reduced, data=dispeff_reduct)
kruskal.test(Nombre_total~Velocity_reduced, data=dispeff_reduct)
wilcox.test(Nombre_total[which(Velocity_reduced=="Faible" | Velocity_reduced=="Fort")]~
            Velocity_reduced[which(Velocity_reduced=="Faible" | Velocity_reduced=="Fort")],
            data=dispeff_reduct, paired=FALSE)

wilcox.test(Nombre_total[which(Velocity_reduced=="Faible"
Velocity_reduced=="Moyen")]~
            Velocity_reduced[which(Velocity_reduced=="Faible"
Velocity_reduced=="Moyen")],
            data=dispeff_reduct, paired=FALSE)

wilcox.test(Nombre_total[which(Velocity_reduced=="Fort"
Velocity_reduced=="Moyen")]~
            Velocity_reduced[which(Velocity_reduced=="Fort"
Velocity_reduced=="Moyen")],
            data=dispeff_reduct, paired=FALSE)

Faible      =      mean(dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Velocity_reduced
"Faible"),]$Nombre_total)

Moyen      =      mean(dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Velocity_reduced
"Moyen"),]$Nombre_total)

Fort      =      mean(dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Velocity_reduced
"Fort"),]$Nombre_total)

vel = barplot(c(Faible, Moyen, Fort), ylim = c(0,5),
             names.arg = c("Low", "Intermediate", "High"),
             xlab="",
             ylab="",
             space = c(0.5,0.5,0.5))

```

```

se_Faible      =      dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Velocity_reduced      ==
"Faible"),]$Nombre_total

se_Moyen       =      dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Velocity_reduced      ==
"Moyen"),]$Nombre_total

se_Fort = dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Velocity_reduced == "Fort"),]$Nombre_total

inf_vel = c(Faible-std.error(se_Faible),      Moyen-std.error(se_Moyen), Fort-
std.error(se_Fort))

sup_vel = c(Faible+std.error(se_Faible),      Moyen+std.error(se_Moyen),
Fort+std.error(se_Fort))

arrows(vel,inf_vel,vel,sup_vel, lwd = 1, angle = 90, length = 0.1, code = 3)

### 3. Number of egg masses according to the water position
boxplot(Nombre_total~Water_position, data=dispeff_reduct)
Au_en=dispeff_reduct[dispeff_reduct$Water_position=="Au_En",]
qqPlot(Au_en$Nombre_total)
shapiro.test(Au_en$Nombre_total)
En=dispeff_reduct[dispeff_reduct$Water_position=="En",]
qqPlot(En$Nombre_total)
wilcox.test(Nombre_total~Water_position, data=dispeff_reduct, paired=F)
mean(En$Nombre_total, na.rm=T)
mean(Au_en$Nombre_total, na.rm=T)

##### Comparison of the egg masses morphology between Baetis rhodani and Baetis alpinus
#####
# Baetis rhodani and Baetis alpinus
# Comparison of their shape, length, width, area
# Separate the date of each species
babr=dispeff[
c(
which(dispeff[,5]=="Baetis alpinus"),

```

```

    which(dispeff[,5]=="Baetis_rhodani")
  )
.]

ba=babr[which(babr$Espece=="Baetis_alpinus"),]
br=babr[which(babr$Espece=="Baetis_rhodani"),]

### 1. Comparison of their shape
chisq.test(table(babr$Espece,babr$IJ_Shape))
# p-value = 0.09234
# Not difference of shape

### 2. Length
# 2 independent modalities: Baetis alpinus and Baetis rhodani

# Check potential extreme value
dotchart(babr$IJ_Hauteur_max_.mm._OU_Axe_plus_long
         ,pch=16
         ,col='red'
         ,xlab='Length')
# Graphic representation to show the mean
boxplot(babr$IJ_Hauteur_max_.mm._OU_Axe_plus_long~babr$Espece)

## Test the normality of each species
# Baetis alpinus
# Due to the low number of Baetis alpinus egg masses samples (N=12), we don't expect
normality of the data
# Thus, we performed a non-parametrical test

```

```

wilcox.test(babr$IJ_Hauteur_max_.mm._OU_Axe_plus_long~babr$Espece,      paired=F,
na.rm=T)
# p-value = 0.001614

# We have significant differences between both,
# with Baetis rhodani egg masses length superior to Baetis alpinus egg masses length

# Mean
mean(ba$IJ_Hauteur_max_.mm._OU_Axe_plus_long, na.rm=T)
mean(br$IJ_Hauteur_max_.mm._OU_Axe_plus_long, na.rm=T)
# Standard error
std.error(ba$IJ_Hauteur_max_.mm._OU_Axe_plus_long, na.rm=T)
std.error(br$IJ_Hauteur_max_.mm._OU_Axe_plus_long, na.rm=T)

# 3. Width
# Check potential extreme value
dotchart(babr$IJ_Max_largueur_.mm.
        ,pch=16
        ,col='red'
        ,xlab='Width')
# Graphic representation to show the mean
boxplot(babr$IJ_Max_largueur_.mm.~babr$Espece)

# Baetis alpinus
# Due to the low number of Baetis alpinus egg masses samples (N=12), we don't expect
normality of the data
# Thus, we performed a non-parametrical test

# Non parametrical test: Mann withney test
wilcox.test(babr$IJ_Max_largueur_.mm.~babr$Espece, paired=F)

```

```

# p-value = 0.00218
# Significant differences of width between both species

# Mean
mean(ba$IJ_Max_largueur_.mm., na.rm=T)
mean(br$IJ_Max_largueur_.mm., na.rm=T)

# Standard error
std.error(ba$IJ_Max_largueur_.mm., na.rm=T)
std.error(br$IJ_Max_largueur_.mm., na.rm=T)

# 1.3 Area
# Check potential extreme value
dotchart(babr$Area_.mm2.
         ,pch=16
         ,col='red'
         ,xlab='Area')
# Graphic representation to show the mean
boxplot(babr$Area_.mm2.~babr$Espece)

# Baetis alpinus
# Due to the low number of Baetis alpinus egg masses samples (N=12), we don't expect
normality of the data
# Thus, we performed a non-parametrical test

# Mann-withney test
wilcox.test(babr$Area_.mm2.~babr$Espece, paired=F, na.rm=T)
# p-value = 0.0005022
# Significant differences btw species

```

```

# Mean and s.e.
mean(ba$Area_.mm2., na.rm=T)
mean(br$Area_.mm2., na.rm=T)
std.error(ba$Area_.mm2., na.rm=T)
std.error(br$Area_.mm2., na.rm=T)

##### Dispersal distances based on egg masses and adults samples #####

### 1. Biofilm samples
biof=read.table("biofilm.txt", header=T)

# Separate the two sampling date: T4 and T8
biof_T4=biof[which(biof$Nam=="T4"),]
biof_T8=biof[which(biof$Nam=="T8"),]

# Figure: d15 N of biofilm according to the distance from nitrogen release point (sort by
sampling date)
plot(biof_T8$Distance,biof_T8$d15N_normalized, pch=19, cex=1.3)
points(biof_T4$Distance,biof_T4$d15N_normalized, pch=1, cex=1.3)

### 2. Heptageniid larvae
hepta=read.table("Heptageniid.txt",header=T)
library(ggpubr)

# Figure: d15n of Heptageniid larvae according to the distance from the nitrogen release point
ggerrorplot(hepta, x="Distance", y="d15N_normalized",
            desc_stat = "mean_se",
            color = "Date", palette = c("black","red"),
            error.plot = "errorbar",
            add = "mean",
            position = position_dodge(0),
            shape=22,

```

```

size=1)

# 3. Baetis larvae
# Figure: d15n of Baetis larvae according to the distance from the nitrogen release point
Baetis=read.table("Baetis_larves.txt",header=T)
library(ggpubr)
ggerrorplot(Baetis, x="Distance", y="d15N_normalized",
            desc_stat = "mean_se",
            error.plot = "errorbar",
            add = "mean",
            position = position_dodge(0),
            shape=22)

## 4. Eggs masses samples
egg=read.table("oeufs.txt",header=T)
# Identified which samples are labelled
egg_label=cut(egg$d15N_normalized,breaks = c(-1000,84,Inf),
              labels=c("no","labelled"))
egg=cbind(egg,egg_label)
# For downstream sites, we need to adjust the distance
for (i in 1:nrow(egg)){
  if (egg$Distance[i]>0){
    egg$Distance[i]=egg$Distance[i]-200
  }
}

# Figure: Number of labelled eggs masses (sort by species) according to the distance
egg_sp=egg[which(egg$egg_label=="labelled"
                & egg$Espece!="Baetis_spp"),]

```

```

tab_egg_sp=table(egg_sp$Espece,egg_sp$Distance)
barplot(tab_egg_sp)

## 5. Adults samples
adult=read.table("adultes.txt", header=T)

# Identified which samples are labelled
adult_label=cut(adult$d15N_normalized,breaks = c(-1000,84,Inf),
               labels=c("no","labelled"))
adult=cbind(adult,adult_label)

# For downstream sites, we need to adjust the distance
for (i in 1:nrow(adult)){
  if (adult$Distance[i]>0){
    adult$Distance[i]=adult$Distance[i]-200
  }
}

# Remove all subimago samples of the analysis
data_julien=read.table("adulte_julien.txt", header=T)
for (i in 1:nrow(adult)){
  adult$Stage[i]=data_julien$Stade[which(adult$Name[i]==data_julien$Code)]
}
adult=adult[-which(adult$Stage=="Subimago"),]

# Figure: Number of labelled adults (sort by species) according to the distance
adult_sp=adult[
  which(adult$adult_label=="labelled" & adult$Espece!="Baetis_spp"),]
tab_adult_sp=table(adult_sp$Espece,adult_sp$Distance)
barplot(tab_adult_sp)

##### Figure : Number of observations according to the number of egg masses per
substrate #####

```

```

# We have to reload the data, because the branch have to be added on the figures

#### Preparation of the data

# Load the data

dispeff=read.table("Data_nettoye_v20210706.txt", header= T)

# Remove the samples without number

dispeff=dispeff[which(dispeff$Sample_number!="NA"),]

dispeff=dispeff[-which(dispeff$Code_substrat=="Remove"),]

#Select only the Baetis egg masses

dispeff=dispeff[which(dispeff$Nom_masse_oeuf=="Baetis"),]

#### Environmentales variables

# Variable: Number of egg masses per substrate

Nombre_total_qli=cut(dispeff$Nombre_total, breaks = c(0, 1,5, Inf),
                    labels = c("Alone","Intermediate", "Plenty"))

prop.table(table(Nombre_total_qli))*100

dispeff=cbind(dispeff,Nombre_total_qli)

# Variable: Position of egg masses on substrat --> Remove the term Au (low proportion)

prop.table(table(dispeff$Substrat_position))*100

dispeff[which(dispeff$Substrat_position=="Au"),29]=NA

# Variable: Velocity. Combine terme Fort and Tres fort. Remove the term Nulle (low
proportion)

prop.table(table(dispeff$Velocity_reduced))*100

dispeff[which(dispeff$Velocity_reduced=="Tres_Fort"),31]="Fort"

dispeff[which(dispeff$Velocity_reduced=="Nulle"),31]=NA

# Variable: Substrate. Remove Branche and Ecorce due to low proportion

prop.table(table(dispeff$Substrat))*100

dispeff[which(dispeff$Substrat=="Branche"),23]=NA

#### Select randomly one egg mass samples per substrat

try=as.data.frame(table(dispeff$Code_substrat))

# Keep the substrat on which one egg mass was founded

```

```

cs_1=as.vector(try$Var1[which(try$Freq==1)])
stock_row1=c()
for (i in 1:length(cs_1)){
  stock_row1=c(stock_row1, which(dispeff$Code_substrat==cs_1[i]))
}
# For others substrat, choose randomly on egg masses samples
try$Var1[which(try$Freq>1)]
cs_plus=as.vector(try$Var1[which(try$Freq>1)])
stockrowplus=c()
for(i in 1:length(cs_plus)){
  set.seed(123)
  stockrowplus=c(stockrowplus,sample(which(dispeff$Code_substrat==cs_plus[i]),1))
}
# Gathered under one data egg masses samples (one per substrate)
dispeff_reduct=dispeff[c(stock_row1,stockrowplus),]

# Figure: Number of observation according to the number of egg masses per substrate
dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat=="G"),23]="Agravier"
dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat=="C"),23]="Bcaillou"
dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat=="B"),23]="Cbloc"
dispeff_reduct[which(dispeff_reduct$Substrat=="Branche"),23]="DBranche"
dispeff_reduct=dispeff_reduct[-which(dispeff_reduct$Substrat=="NA"),]

barplot(table(dispeff_reduct$Substrat,dispeff_reduct$Nombre_total_qli),col=c("black", "#999
999", "white", "blue"),
  legend=c(fill=c("Gravel", "Pebble", "Boulder", "Branch")),
  ylim=c(0,200), xlab="Number of egg masses per substrate", ylab=c("Number of
observations"))
# END

```

De l'émergence à la ponte des éphémères : Description du comportement de ponte et estimation des distances de dispersion

Le processus de dispersion a une implication importante sur la dynamique des (méta)populations d'insectes de cours d'eau, mais leurs distances de dispersion sont difficiles à estimer. La distance de dispersion estimée des insectes de cours d'eau correspond à la distance entre le site d'émergence et un endroit aléatoire pendant le vol des adultes, et non jusqu'à l'étape finale de la dispersion qui est la ponte : un processus peu connu chez les insectes de cours d'eau. Premièrement, notre étude a décrit et identifiée par barcoding moléculaire les masses d'œufs d'éphéméroptères (*Baetis sp.*) afin d'améliorer les connaissances sur le comportement de ponte interspécifique et la morphologie des masses d'œufs. Deuxièmement, notre étude a utilisé la méthode de marquage-recapture par enrichissement en isotope stable (^{15}N) pour évaluer les distances de dispersion de *Baetis spp.* sur la base d'échantillons de masses d'œufs et de femelles adultes. Nous avons montré que *Baetis rhodani* et *Baetis alpinus* semblent avoir le même comportement de ponte, mais les masses d'œufs de *Baetis rhodani* étaient plus grandes que celles de *Baetis alpinus*. Cette étude est la première démonstration d'un marquage réussi d'œufs d'insectes de cours d'eau en utilisant un enrichissement en isotope stable. Nous avons montré une dispersion préférentielle vers l'amont de *Baetis spp.*, un motif plus clair pour les estimations basées sur les masses d'œufs que celles sur les femelles adultes. Les distances maximales de dispersion de *Baetis rhodani* et *Baetis alpinus* estimées à partir des masses d'œufs (725 m et 325 m, respectivement) étaient plus élevées que celles estimées à partir des femelles adultes (375 m et 225 m, respectivement). Ainsi, l'estimation des distances de dispersion semble être plus précise lorsqu'elle est basée sur les masses d'œufs que sur les femelles adultes, mais le peu d'adultes marqués limite nos conclusions. Néanmoins, notre étude a montré une nouvelle méthode pour évaluer les distances de dispersion des insectes de cours d'eau.

Mots-clés : Œufs - ^{15}N - Isotope stable - Marquage-recapture - Vol d'insecte

From emergence to oviposition of mayflies: Description of the oviposition behaviour and assessment of dispersal distances

The dispersal process had a significant implication on the (meta)population dynamics of stream insects, but their dispersal distances are difficult to assess. The common assessment of the stream insects dispersal distances is the distance from the emergence site to a random location during adult flight, but not to the final step of dispersal which is the oviposition of females, a process not well known for stream insects. First, our study described and identified by DNA barcoding mayfly (*Baetis sp.*) egg masses to improve the knowledge on interspecific oviposition behaviour and egg mass morphology. Second, our study used the mark-recapture method using stable isotope enrichment (^{15}N) to assess the dispersal distances of *Baetis spp.* based on egg masses and adult females samples. We showed that *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus* seems to have the same oviposition behaviour, but *Baetis rhodani* egg masses were larger than *Baetis alpinus*. This study is the first demonstration of a successful label of stream insect eggs using a stable isotope enrichment. We showed a preferential upstream dispersal of *Baetis spp.*, a pattern more clear for estimations based on egg masses than adult females. The maximal dispersal distances of *Baetis rhodani* and *Baetis alpinus* estimated based on egg masses (725 m and 325 m, respectively) were higher than those estimated based on adult females (375 m and 225m, respectively). Thus, the estimation of dispersal distances seems to be more accurate when based on egg masses than on adult females, but few labelled adults limit our conclusion. Nonetheless, our study demonstrated a new method to assess the dispersal distances of stream insects.

Keywords: Eggs - ^{15}N - Stable isotope - Mark-recapture - Insect flight

**ESTIMATION DES DISTANCES DE DISPERSION EFFECTIVE
DES INSECTES EN COURS D'EAU PAR L'ANALYSE
MOLECULAIRE ET ISOTOPIQUE**

RAPPORT D'ACTIVITE PROFESSIONNELLE

Année universitaire 2021-2022

CNAM Rhône-Alpes

LG 034 - LICENCE Sciences Technologies Santé (STS)

Mention Sciences pour l'ingénieur en Chimie Alimentation Santé (CAS)

Parcours Génie Biologique

Centre de Lyon

ESTBB

TITRE CERTIFIE RNCP (niveau II)

Assistant Ingénieur en Biologie-Biochimie-Biotechnologies

NOM : DISDIER

(en majuscules, nom de jeune fille pour les femmes mariées)

NOM D'USAGE OU MARITAL : DISDIER

PRENOM : UMA

ENTREPRISE : INRAE – LEHNA

MAITRE DE STAGE : Maria ALP (INRAE), Mathieu FLOURY (LEHNA)

Remerciement

Je tiens tout particulièrement à remercier Maria Alp et Mathieu Flourey pour m'avoir donné la chance de réaliser ce stage.

Merci pour votre accompagnement, vos conseils et pour les discussions constructives extrêmement intéressantes. Je suis reconnaissante du temps que vous m'avez accordé à partager vos connaissances et intérêts pour cette discipline, aussi bien en laboratoire que sur le terrain.

Merci pour la confiance donnée sur l'ensemble du projet et pour votre bonne énergie. Ce stage m'a réellement permis de développer mon intérêt pour l'étude de la faune en recherche fondamentale en m'apportant de nouvelles connaissances et techniques d'analyse.

Un grand merci à Emmanuel Jaulin pour avoir pris le temps de me conseiller tout au long du stage. Merci pour les moments très agréables passés sur le terrain pour la chasse aux œufs et en laboratoire. Un grand merci également à Maxence Forcellini pour l'accompagnement à la paillasse et pour les précieux conseils sur l'ensemble du stage.

Merci à Thibault Datry pour l'accueil au sein de l'équipe EcoFlows à INRAE, et merci à l'ensemble de l'équipe pour leur bienveillance. Merci également à Antoine Heurtel pour son aide en bio-informatique.

Je souhaite également remercier Florian Mermillod-Blondin pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe E3S du LEHNA. Un merci particulier à Lara Konecny-Dupré et à Laurent Simon pour les conseils et l'apport technique en laboratoire.

Un remerciement également à la formation qui m'a été apporté par l'ESTBB, me permettant d'être autonome et rigoureuse en laboratoire.

Merci pour tout,

Uma

Table des matières

Liste des abréviations

I. Introduction.....	1
A. Présentation des laboratoires d'accueil.....	1
B. Intérêt et difficulté d'étudier les processus de dispersion chez les insectes	1
C. Projets DispEff et RBio II.....	1
II. Matériels et Méthodes.....	4
A. Présentation du site d'échantillonnage et des taxons étudiés	4
B. Analyse génétique (multi-taxons).....	5
1. Préparation des échantillons	5
2. Extraction d'ADN et analyse par Barcoding.....	6
3. Analyse bio-informatique des séquences obtenues : BLAST et phylogénie.....	6
C. Analyse isotopique (<i>Baetis spp.</i>).....	7
1. Nettoyage et lyophilisation des échantillons.....	7
2. Pesée et analyse en spectrophotométrie de masse (EA-IRMS).....	7
3. Analyse statistique des données isotopiques	7
III. Résultats	10
A. Observation de la diversité des pontes des insectes aquatiques dans le Buizin.....	10
B. Répartition spatiale et temporelle des espèces du genre <i>Baetis</i> (adultes et œufs).....	13
1. Identification moléculaire des espèces <i>B. alpinus</i> et <i>B. rhodani</i>	13
2. Répartition des échantillons étudiés en fonction des sites d'échantillonnage	14
C. Estimation des distances de dispersion d'après les deux stades de vie (adultes et œufs)	15
IV. Discussion.....	18
A. Comparaison des distances de dispersion estimées pour les adultes et les œufs <i>Baetis</i>	18
B. Les limites et biais d'échantillonnage sur le Buizin.....	19
C. Protocole alternatif pour l'analyse génétique	20
D. Observation d'un groupe cryptique chez <i>Baetis rhodani</i> et limites de la phylogénie.....	21
V. Conclusion	21
Bibliographie	23
Webographie.....	25
ANNEXE	26

Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- aLRT : Approximate Likelihood Ratio Test
- BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
- BLASTn : Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
- COI : Cytochrome C Oxydase I
- EA-IRMS : Elemental Analyzer Isotope Ratio Mass Spectrometry
- GTR : General Time Reversible
- IRMS : Isotope-Ratio Mass Spectrometry
- NCBI : National Center for Biotechnology Information
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PhyML : Phylogenetic estimation software using Maximum-Likelihood

I. Introduction

A. Présentation des laboratoires d'accueil

Le laboratoire d'écologie LEHNA (Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés) et l'unité RiverLY à INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement) s'intéressent à de nombreuses thématiques environnementales, en particulier celles qui touchent les écosystèmes aquatiques. Les recherches menées dans ce domaine visent à comprendre le fonctionnement des milieux aquatiques et des organismes vivants qui y sont inféodés. Ces milieux sont très impactés par les activités anthropiques (Carpenter et al., 1992), et sont de plus en plus affectés par un dérèglement climatique global. De nombreux travaux de recherche innovants sont donc entrepris dans ces deux laboratoires, à différentes échelles spatio-temporelles et biologiques, afin de développer les connaissances de la biodiversité aquatique pour en assurer une gestion et une protection plus efficaces (Cid et al., 2021; Floury et al., 2021). Les équipes EcoFlows (unité RiverLY – INRAE) et Ecologie, Evolution, Ecosystèmes Souterrains (E3S) (LEHNA) portent ainsi de nombreuses études permettant d'apporter une meilleure compréhension des processus écologiques et évolutifs dans les écosystèmes aquatiques.

B. Intérêt et difficulté d'étudier les processus de dispersion chez les insectes

La dispersion est définie comme un mouvement d'individus comprenant des étapes successives d'émigration, de déplacement et d'immigration, permettant la colonisation d'un nouvel espace (Ronce, 2007). Ce processus est observable chez tous les êtres vivants, et joue un rôle majeur dans l'assemblage des communautés et les dynamiques d'évolution et de flux de gènes des espèces (Nathan, 2001). Différents facteurs influencent ce processus, tel que la disponibilité et la qualité des habitats ou l'évitement de la consanguinité (Bowler and Benton, 2005). Ainsi, une meilleure compréhension de ce processus peut aider à anticiper le comportement des espèces face au réchauffement climatique ou à des modifications anthropiques (ex. aménagement des berges, création d'écluses) ou naturelles (ex. crue, assèchement) de leur habitat.

Pourtant, les mécanismes et les distances de dispersion restent insuffisamment connus, pour de nombreuses espèces aquatiques, notamment chez les invertébrés. Les insectes aquatiques, par exemple, présentent un cycle de vie complexe, avec différents stades de développement, ce qui rend le traçage des individus difficile (Sarremejane et al., 2020). Malgré ces difficultés, certaines techniques sont mises en place pour permettre le suivi d'insectes aquatiques afin d'étudier leur capacité de dispersion. Des méthodes directes telles que celle dite de capture-marquage-recapture permettent de suivre un individu pour mesurer une distance de dispersion, mais restent complexes lors d'étude de macroinvertébrés en raison de leur taille réduite (Lieutier et al., 1986). D'autres méthodes indirectes peuvent être employées telles que l'étude de marqueurs moléculaires (Baguette et al., 2013) ou le marquage isotopique (Briers et al., 2004; Caudill, 2003; Macneale et al., 2005).

C. Projets DispEff et RBio II

Les projets DispEff et RBio II, tous deux financés par l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse, ont été conjointement mis en place, dans la Zone Atelier Bassin du Rhône (la ZABR), avec comme double objectif d'estimer les distances de dispersion d'insectes aquatiques et d'améliorer les connaissances taxonomiques d'un stade de vie peu connu, celui des œufs.

Pour l'estimation des distances de dispersion, différents taxons sont étudiés dans le cadre de ces projets parmi les ordres Ephéméroptères, Plécoptères et Trichoptères (EPT). Chez les éphémères

(nom courant des Ephemeroptères), le genre *Baetis* représente un cas d'étude intéressant pour sa facilité d'identification aux différents stades : œuf, larve, adulte subimago et imago (Figure 1). Des clés d'identification sont notamment utilisées pour les stades larvaires et adultes (Studemann et al., 1992). De plus, ce genre d'éphémère est assez répandu et des espèces telles que *B. rhodani* et *B. alpinus* ont déjà été recensées sur le site d'étude par des échantillonnages préliminaires.

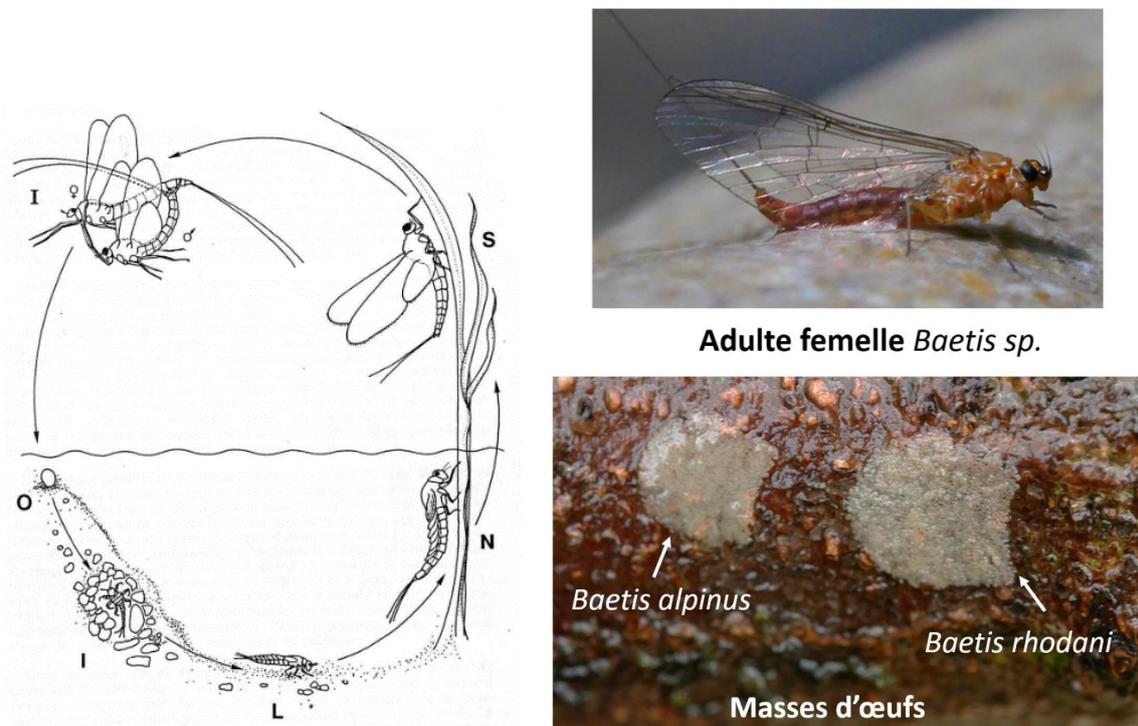


Figure 1 : Cycle de vie des éphémères (à gauche) et photographie d'une masse d'œuf de *Baetis alpinus* et d'une de *Baetis rhodani* et d'une adulte *Baetis spp.* femelle (à droite).

Légende du cycle de vie : O = Œuf ; I = jeune larve ; L = larve ; N = nymphe ; S = subimago ; I = imago

Source figure : Studemann et al., 1992

Source photos : Emmanuel Jaulin et Maria Alp

Durant leur phase aérienne, les adultes femelles se dispersent le long du cours d'eau pour trouver un lieu de ponte. Les individus adultes peuvent donc être interceptés lors de cette dispersion. Mais le lieu de capture, qui correspond à une distance de capture en vol, ne permet pas de connaître la destination finale de ponte. Pour certaines espèces, qui fixent leurs masses d'œufs sur des substrats stables (cailloux, morceau de bois), le lieu de ponte peut également correspondre au lieu final de dispersion de l'adulte (femelle), car celle-ci meurt peu après la ponte.

Dans le cadre du projet RBio II, les deux stades de vie (adultes et œufs) ont été utilisés pour estimer les distances de dispersion dans les milieux terrestres. Une technique de marquage par enrichissement en isotope stable du réseau trophique (^{15}N) a été mise en place au printemps 2021 sur un petit cours d'eau du bassin versant de l'Ain. Ce type d'enrichissement permet de modifier la signature isotopique (^{15}N) de l'ensemble du réseau trophique, à partir du biofilm qui assimile une source d'azote marquée sur un tronçon de cours d'eau (ici appelé « zone de marquage ») pour la durée de l'expérience.

En tout, 26 sites répartis sur les environ 2,6 km de la zone d'étude ont été échantillonnés, en amont et en aval du site d'enrichissement, afin de collecter des adultes d'insectes aquatiques (Figure 2). Ces échantillons ont ensuite été analysés par spectrophotométrie de masse pour déterminer leur

signature isotopique et ainsi, leur potentielle appartenance au site d'enrichissement (Hagler and Jackson, 2001). La distance de dispersion estimée pour les individus marqués correspond alors à la distance réalisée depuis le site d'enrichissement jusqu'au lieu de capture. Cette estimation de distance est associée avec une certaine incertitude, dans la mesure où les adultes sont interceptés par les pièges avant d'atteindre leur destination finale.

De plus, d'après Müller (Müller, 1982), la dispersion au stade adulte serait principalement dirigée en amont du cours d'eau, afin de compenser la dérivation ayant eu lieu au stade larvaire. Ainsi, en suivant cette hypothèse, un nombre plus important d'individus marqués serait attendu en amont du site de l'émergence.

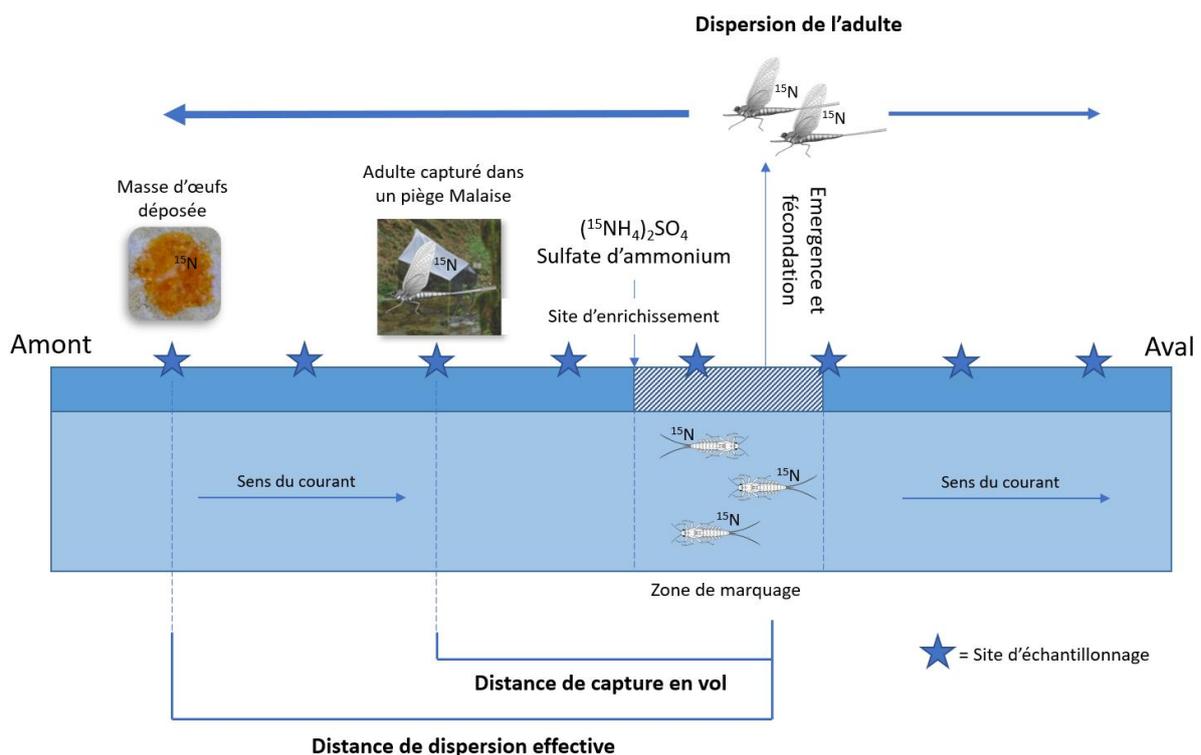


Figure 2 : Estimation des distances de capture en vol et des distances de dispersion effective par enrichissement du réseau trophique en isotope stable ^{15}N .

Ce schéma n'est pas à l'échelle mais présente seulement le fonctionnement de l'expérience de marquage.

L'apport du projet DispEff est de s'intéresser à un stade de vie moins étudié, celui des œufs, pour estimer une distance de dispersion dite effective, définie cette fois comme la distance entre la zone d'enrichissement et le lieu de ponte. En plus de la spectrométrie de masse pour déterminer la signature isotopique des échantillons, des analyses génétiques par barcoding ont été réalisées pour identifier les espèces observées chez les adultes et les œufs du genre *Baetis*, et étudier une éventuelle variabilité inter-spécifique des distances de dispersion. Des masses d'œufs ayant une morphologie distincte de celle caractéristique du genre *Baetis* ont également été échantillonnées et analysées génétiquement pour apporter de nouvelles connaissances à la taxonomie et décrire la diversité des espèces d'insectes aquatiques observés dans le cours d'eau.

Dans le cadre de ces deux projets conjoints, une première analyse des œufs et adultes capturés avait été réalisée par Emmanuel Jaulin au printemps 2021. Celle-ci a permis de montrer, pour la première fois, un enrichissement de l'espèce à tous ses stades de vie, avec notamment un maintien du

marquage isotopique dans les masses d'œufs déposées par un individu marqué (Jaulin 2021). L'intérêt majeur de poursuivre cette étude était donc d'obtenir des résultats robustes et quantitatifs, sur la dispersion des espèces de *Baetis*, en complément des analyses préliminaires réalisées par E. Jaulin.

II. Matériels et Méthodes

A. Présentation du site d'échantillonnage et des taxons étudiés

L'expérience d'enrichissement isotopique au sulfate d'ammonium ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a eu lieu au printemps 2021, correspondant à la période principale d'émergence des éphémères (Brittain, 1982). Le site choisi était le ruisseau Buizin, un cours d'eau du bassin versant de l'Albarine, un affluent de l'Ain. Selon les résultats d'autres études en cours et réalisées depuis diverses années sur ce bassin versant, ce cours d'eau présente une large diversité d'espèces d'insectes aquatiques. Sa largeur moyenne est d'environ trois mètres, ce qui a facilité la mise en place du dispositif expérimental. De plus, le site d'étude ne présente pas de point de rejet d'effluent et se trouve à plusieurs kilomètres en amont de la zone d'habitation la plus proche, limitant les risques de contamination. Les vitesses d'écoulement varient, avec une succession de zones calmes et de radiers, qui correspondent à une zone où l'écoulement de l'eau est plus rapide.

Un piège Malaise a été installé à chacune des 24 stations, placées tous les 50 à 100 mètres (à l'exception de deux sites placés plus en amont) le long des 2,6 km du cours d'eau utilisé pour l'expérience, afin de capturer les adultes par interception (Figure 3). Ce type de piège permet la capture des adultes des insectes aquatiques, qui sont par la suite conservés dans de l'éthanol à 96 %. Les œufs, eux, ont été échantillonnés sur 12 sites parmi les 26 (cf. carte Figure 3), et ont été retrouvés sur des substrats biotiques (morceau de bois) et abiotiques (graviers, cailloux, rochers).

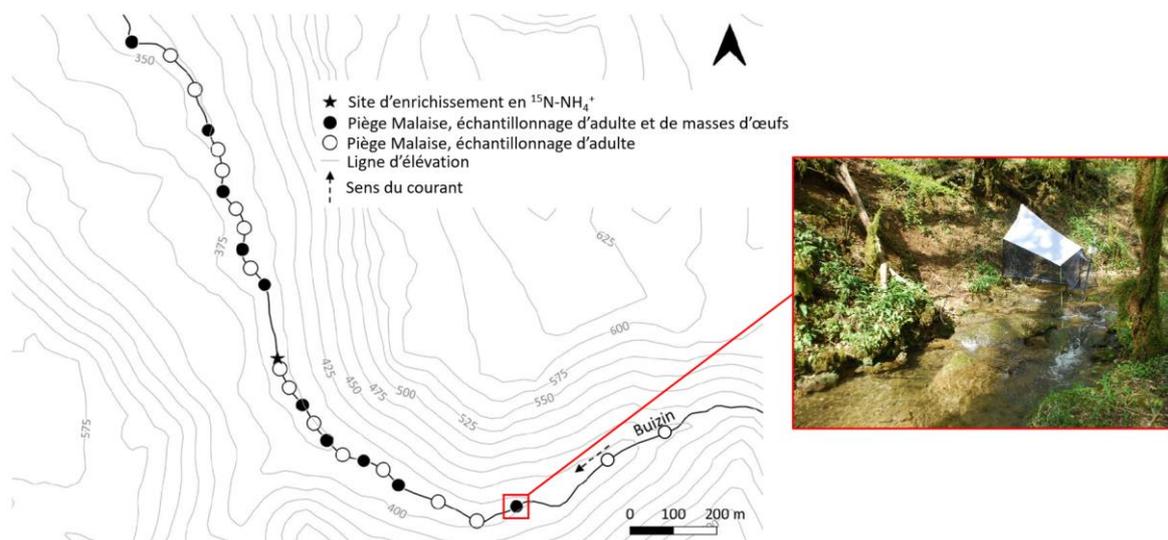


Figure 3 : Carte de la section de la rivière Buizin indiquant la présence des sites d'échantillonnage de l'expérience d'enrichissement isotopique DispEff/RBioll (à gauche) et photographie d'un site d'échantillonnage présentant un piège Malaise (à droite).

L'expérience comprend 26 sites d'échantillonnage pour les insectes adultes, et 12 sites d'échantillonnage pour les masses d'œufs, sur les 2,6 km.

Source photo : Emmanuel Jaulin

Comme indiqué précédemment, le genre d'éphémères *Baetis* est étudié ici à ses différents stades. *Baetis spp.* a une phase de développement aquatique, qui représente la plus grande partie de son cycle de vie (1 à 3 années au stade larvaire), et une phase aérienne, beaucoup plus courte, durant 24 à 48 h (Studemann et al., 1992). Au stade larvaire, *Baetis spp.* est un racleur-brouteur, se nourrissant principalement de biofilm (Cummins, 1973). Ce genre d'éphémère est ainsi très adapté à une expérience d'enrichissement isotopique, car le biofilm est le premier compartiment de l'écosystème à s'enrichir en azote lourd (^{15}N). Il est donc attendu que le marquage soit particulièrement efficace pour les racleurs, et que leur signature isotopique soit conservée pendant la durée du stade adulte. De plus, tout le stockage d'énergie s'effectue au stade larvaire, car au stade adulte, l'ensemble du système digestif de *Baetis* est atrophié, empêchant l'assimilation de nourriture. Le stade adulte ne procède qu'à la reproduction, à la dispersion aérienne et à la ponte des œufs. Les masses d'œufs de *Baetis spp.* sont faciles à identifier visuellement avec leur forme en « fer-à-cheval » (cf. Figure 1), ce qui facilite l'échantillonnage. L'ensemble des échantillons sont conservés dans de l'éthanol à 96 %.

En complément de cette étude, des masses d'œufs ayant un aspect distinct des masses d'œufs *Baetis spp.* ont également été récoltés pour identifier d'autres espèces présentes dans le cours d'eau qui utilisent des substrats fixes pour leur ponte.

B. Analyse génétique (multi-taxons)

1. Préparation des échantillons

La sélection des échantillons étudiés lors de ce stage dépend de ceux préalablement identifiés par Emmanuel Jaulin, au printemps 2021. En annexe est indiquée la répartition des échantillons analysés entre les sites et l'opérateur (Uma Disdier 2022 / Emmanuel Jaulin 2021) des analyses (Annexe 1). Pour les œufs du genre *Baetis*, l'objectif est d'obtenir un total de 35 échantillons par site ($n = 35$) sur les 12 sites étudiés, lorsque le nombre d'échantillons disponibles est suffisant. Des masses d'œufs pondues peu de temps avant l'échantillonnage (distinguées par une couleur plus claire sur les photographies accompagnant une partie des échantillons) sont priorisées, car des masses d'œufs plus « vieilles » peuvent avoir une partie des œufs éclos et donc contenir moins d'ADN (Acide désoxyribonucléique).

Pour les adultes du genre *Baetis*, le nombre maximal d'individus disponible sur les sites communs à l'échantillonnage des œufs est sélectionné (12 sites). De plus, un certain nombre d'individus sur 8 autres sites sont également sélectionnés pour obtenir des résultats robustes. Le nombre total d'échantillons analysés génétiquement pour le taxon *Baetis* est ainsi de $n = 424$ pour les œufs et $n = 488$ pour les adultes (Annexe 1). Les masses d'œufs « complémentaires », n'appartenant pas au genre *Baetis*, analysés génétiquement présentent un total de $n = 86$.

Après sélection des échantillons, les œufs et adultes du genre *Baetis*, ainsi que les œufs de genre inconnu, sont extraits de l'éthanol. La préparation des œufs consiste à isoler, en milieu stérile, environ dix œufs à la loupe binoculaire. En présence de matrice gélatineuse (par exemple pour certains Trichoptères et certains Diptères) les œufs sont séparés de celle-ci pour faciliter la future extraction d'ADN. L'éthanol doit être totalement évaporé.

Pour la préparation des adultes, deux pattes sont prélevées si celles-ci sont toujours intactes. Dans le cas contraire, la tête de l'individu est utilisée pour l'identification génétique.

2. Extraction d'ADN et analyse par Barcoding

Après préparation, les individus sont analysés par Barcoding pour déterminer leur espèce. Cette technique est basée sur l'analyse du gène mitochondrial COI (Cytochrome C Oxydase I), codant pour la sous unité primaire de l'enzyme Cytochrome c oxidase, intervenant dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Folmer et al., 1994). Les compositions des amorces utilisées pour l'amplification du gène COI sont les suivantes : amorce sens (Forward) LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') et amorce anti-sens (Reverse) HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994).

Dans un premier temps, une lyse cellulaire est réalisée sur les œufs et les pattes des individus préparés. Pour chaque échantillon, une solution Chelex 100 Resin® (Bio-rad) à 7 % est utilisée comme milieu d'extraction (Walsh et al., 1991), ainsi que de la Protéinase K à une concentration finale de 6,25 %, pour un volume final de 160 µl. Les échantillons sont ensuite vortexés et centrifugés, avant d'être incubés dans un thermocycleur (Techne Prime Thermal Cycler) pendant 2 heures à 56 °C puis 15 minutes à 90 °C et enfin 5 minutes à 15 °C. Après ce cycle, les lysats sont centrifugés et conservés à -18 °C.

Une amplification du gène COI est ensuite réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans un thermocycleur (Techne Prime Thermal Cycler). Le programme débute par 3 minutes à 95 °C, suivies de 40 cycles de 20 secondes de dénaturation à 95 °C, 30 secondes d'hybridation à 51 °C puis 45 secondes d'élongation à 72 °C, terminant par 5 minutes à 72 °C. Le volume final de chaque échantillon est de 25 µl, avec une concentration finale pour chaque amorce de 0,4 µM. La concentration finale en dNTP (Eurobio Scientific GAEP11-5D) est de 0,8 mM et de 0,05 mg/ml pour l'albumine de sérum bovin (BSA) (Biolabs B9000S). Le tampon de réaction (Eurobio Scientific) est utilisé à 1X comprenant 3 mM de MgCl₂. La polymérase (Eurobiotaq DNA Eurobio Scientific GAETAQ00-4D) est utilisée à une concentration finale de 0,05 U/µl.

Les produits PCR sont ensuite analysés sur un gel agarose 1,3 % (Eurobio) avec du GelRed (6X) avec un temps de migration de 20 minutes à 100 V dans une cuve d'électrophorèse. Les gels sont ensuite observés au transilluminateur UV (UVIdoc HD6).

3. Analyse bio-informatique des séquences obtenues : BLAST et phylogénie

Les produits PCR sont analysés par séquençage forward Sanger (Zimmermann et al., 1988). Les séquences sont obtenues après trimming des bases de mauvaise qualité, à chaque extrémité pour améliorer le signal. Chaque séquence est ensuite analysée par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur la plateforme NCBI (National Center for Biotechnology Information). Un BLASTn est réalisé sur la database nr/nt, avec un programme de recherche de séquences dites similaires. Chaque espèce est confirmée en observant les différents paramètres : E-value, Bit score, pourcentage d'identité et de recouvrement (Altschul et al., 1990; Pertsemlidis and Fondon, 2001). Les séquences ayant des bit-scores inférieurs à 50 ne sont pas retenues (Pearson, 2013).

Après avoir confirmé l'identité des individus par BLAST, un arbre phylogénétique est réalisé afin d'avoir une confirmation et une identification visuelle des séquences obtenues. Le but principal de cette analyse phylogénétique est d'identifier les clades d'intérêts, ici *Baetis alpinus* et *Baetis rhodani*, et non pas de faire de la phylogénétique approfondie. Deux arbres phylogénétiques sont réalisés, uniquement pour le genre *Baetis* (œufs et adultes) et seulement avec les données obtenues lors de ce stage (par Uma Disdier). Pour cela, la liste complète des espèces de *Baetis* présente sur le territoire métropolitain en France est récupérée à partir du site Opie Benthos. A partir de cette liste, 46 séquences du gène COI de ces différentes espèces du genre *Baetis*, ainsi qu'une autre appartenant

à un taxon différent (Out-group, ici *Takobia muticus*), sont récupérées sur GenBank pour construire l'arbre (Annexe 2). Après sélection des séquences obtenues pendant le stage, l'ensemble de ces séquences, ainsi que les 47 autres, sont alignées à l'aide du logiciel de phylogénie moléculaire Seaview par alignement clustalo. Un G-block est ensuite réalisé en désélectionnant les séquences présentant d'importante délétion et en utilisant les options les moins strictes sur Seaview. Un arbre est construit par PhyML (Phylogenetic estimation software using Maximum-Likelihood) avec le modèle de construction GTR (General Time Reversible model) et le support de branche aLRT (SH-like) (Approximate Likelihood-Ratio Test) est sélectionné pour sa rapidité et sa justesse (Anisimova and Gascuel, 2006). Le reste des paramètres disponibles sur le logiciel Seaview sont « optimisés ».

C. Analyse isotopique (*Baetis* spp.)

1. Nettoyage et lyophilisation des échantillons

Seuls les œufs et les adultes identifiés comme appartenant au genre *Baetis* sont analysés en isotopie. Au total, n = 506 adultes et n = 354 masses d'œufs du genre *Baetis* sont analysées en isotopie (Annexe 1). Pour l'analyse isotopique, les individus sont d'abord nettoyés de toute trace d'éthanol et de contamination. Pour cela, les tubes d'éthanol contenant les œufs sont centrifugés à 14 000 G pendant 2 minutes et 30 secondes. L'éthanol est retiré puis les œufs sont séchés à l'air libre durant 15 minutes. 1 ml d'eau ultra-pure est ajouté dans chaque tube qui est ensuite mis à centrifugation à 14 000 G pendant 3 minutes. L'eau ultra-pure est retirée et les œufs sont congelés à -18 °C. Les adultes *Baetis* sont également nettoyés dans 1 ml d'eau ultra-pure. Les tubes sont agités manuellement et l'eau est retirée. Cette étape est répétée trois fois de suite, puis les individus sont congelés à -18 °C.

L'ensemble des échantillons sont ensuite lyophilisés pour enlever toute trace d'eau. Pour cela, les individus sont placés dans un lyophilisateur (Christ Alpha 1-4 LDplus) durant 48 heures.

2. Pesée et analyse en spectrophotométrie de masse (EA-IRMS)

Chaque échantillon lyophilisé est pesé individuellement à la microbalance (Ultra-microbalance Sartorius SE2) pour préparer l'analyse au spectrophotomètre de masse (EA-IRMS : Elemental Analyzer Isotope-Ratio Mass Spectrometry). Les œufs et les adultes sont mis en poudre individuellement et entre 500 et 600 microgrammes de poudre sont prélevés et déposés dans une capsule en étain (Elemental Microanalysis D1008). Les capsules sont pliées et compactées avant d'être passées au spectrophotomètre de masse (Isoprime 100, Elementar), couplé avec un analyseur élémentaire (Vario PYRO Cube, Elementar), afin de déterminer leur ratio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Deux standards (témoins négatifs) sont utilisés au début et à la fin de chaque analyse : Aspartate-3 et Caséine. De plus, un standard d'Aspartate-3 (environ 500 mg) est mesuré tous les 10 échantillons.

3. Analyse statistique des données isotopiques

Des premières mesures en $\delta^{15}\text{N}$ du biofilm et de larves de *Baetis* ont été réalisées dans le cadre du projet RBio II, au printemps 2021 au niveau du site d'enrichissement, afin de définir une zone de marquage (Figure 4). L'identification de cette zone est déterminante pour savoir si un individu est marqué ou non. A la distance de cette zone est assigné un seuil d'enrichissement en $\delta^{15}\text{N}$, et ainsi, un échantillon ayant une signature isotopique supérieur à ce seuil, sera identifiée comme ayant une signature enrichie, et non-naturelle. Plus la sélection des échantillons marquée est stricte (seuil en $\delta^{15}\text{N}$ élevé), plus la zone de marquage est petite et plus les distances estimées de dispersion sont précises. L'intérêt est donc de trouver un équilibre entre l'étendue de la zone considérée comme

marquée, avec la précision des estimations des distances recherchées et le nombre N d'échantillons déterminés comme marqués.

Pour étudier l'impact de la distance de la zone de marquage, différents seuils de signatures isotopiques peuvent être utilisés pour déterminer si un individu provient de celle-ci ou non. D'après Kendall (1998) la proportion en isotope lourd de l'azote (^{15}N) est inférieure à 10 ‰ en conditions naturelles (Annexe 3). Ce seuil de 10 ‰ ainsi que trois autres seuils plus conservatifs (48, 95 et 150 ‰) ont donc été sélectionnés. Pour chacun de ces seuils, une étendue de zone de marquage est déterminée d'après les analyses isotopiques effectuées sur le biofilm et les larves de *Baetis* (Figure 4). La sélection des quatre seuils permet d'étudier l'influence de ce choix sur le nombre et la répartition des échantillons considérés comme marqués (Tableau 1).

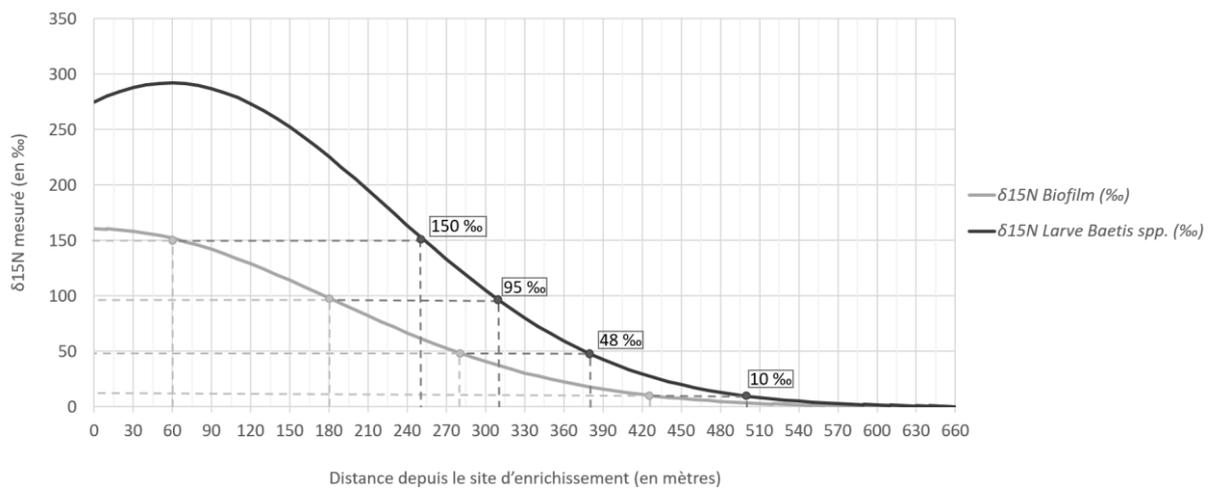


Figure 4 : Signature isotopique du biofilm et des larves *Baetis* en aval de la zone d'enrichissement en sulfate d'ammonium

Données obtenues par E. Jaulin et Mathieu Flourey en analyse EA-IRMS (Elemental Analyzer Isotope Ratio Mass Spectrometry).

Comme observée sur le graphique de la Figure 4, la zone marquée directement après enrichissement (le biofilm) est plus étroite que celle observée par les larves. Cette différence est probablement liée à la dérive des larves dans le courant (Müller, 1982), allongeant ainsi la zone de présence d'individus marqués. Il semble donc plus judicieux de s'appuyer sur une zone de marquage déterminée d'après les larves pour considérer qu'un individu est marqué ou non et par la suite, estimer sa distance de dispersion au stade aérien.

Tableau 1 : Longueur de la zone de marquage en fonction de chaque seuil en $\delta^{15}\text{N}$ sélectionné et nombre d'individus marqués pour chacun de ces seuils

Les longueurs sont obtenues à partir du graphique Figure 4, détaillant les signatures isotopiques en $\delta^{15}\text{N}$ observées en fonction de la longueur en aval du site d'enrichissement en sulfate d'ammonium.

Substrat analysé \ Seuil en $\delta^{15}\text{N}$ sélectionné	> 150 ‰	> 95 ‰	> 48 ‰	> 10 ‰
	Longueur de la zone de marquage			
Biofilm	60 m	180 m	280 m	430 m
Larve <i>Baetis</i>	250 m	310 m	380 m	500 m

<i>Adultes Baetis spp.</i>	Nombre total d'adultes marqués en ^{15}N (n = 506)			
	41	78	113	204
	Nombre d'adultes marqués en ^{15}N (situés en dehors de la zone d'enrichissement définie par les larves <i>Baetis</i>)			
	36	25	51	131

<i>Œufs Baetis spp.</i>	Nombre total de masses d'œufs marquées en ^{15}N (n = 354)			
	16	34	54	126
	Nombre de masses d'œufs marquées en ^{15}N (situés en dehors de la zone d'enrichissement définie par les larves <i>Baetis</i>)			
	14	29	45	69

Ces estimations démontrent que, lors du calcul des distances de dispersion, il est important de prendre en compte l'entièreté de la zone de marquage et non seulement le point fixe d'enrichissement en sulfate d'ammonium (origine à 0 mètre). Lors de cette étude, l'estimation des distances minimales sont recherchées afin de ne pas surestimer les distances réelles.

Ainsi, si un individu marqué est observé en amont du site d'enrichissement, il est alors considéré que l'individu a émergé au point le plus en amont de la zone de marquage (ici le site d'enrichissement à 0 m). La distance observée au site de capture correspond donc à la distance de dispersion estimée pour les individus en amont. Cependant, à cause de la longueur de la zone de marquage, les distances observées en aval doivent être corrigées : pour un individu marqué en aval, il est estimé que celui-ci a émergé au niveau de la fin de la zone de marquage. La longueur totale de la zone de marquage observée est donc soustraite à la distance de l'emplacement du site d'échantillonnage par rapport au site d'enrichissement.

L'ensemble des étapes et des techniques utilisées, afin de répondre aux problématiques des projets DispEff et RBioll, est résumé dans la Figure 5 :

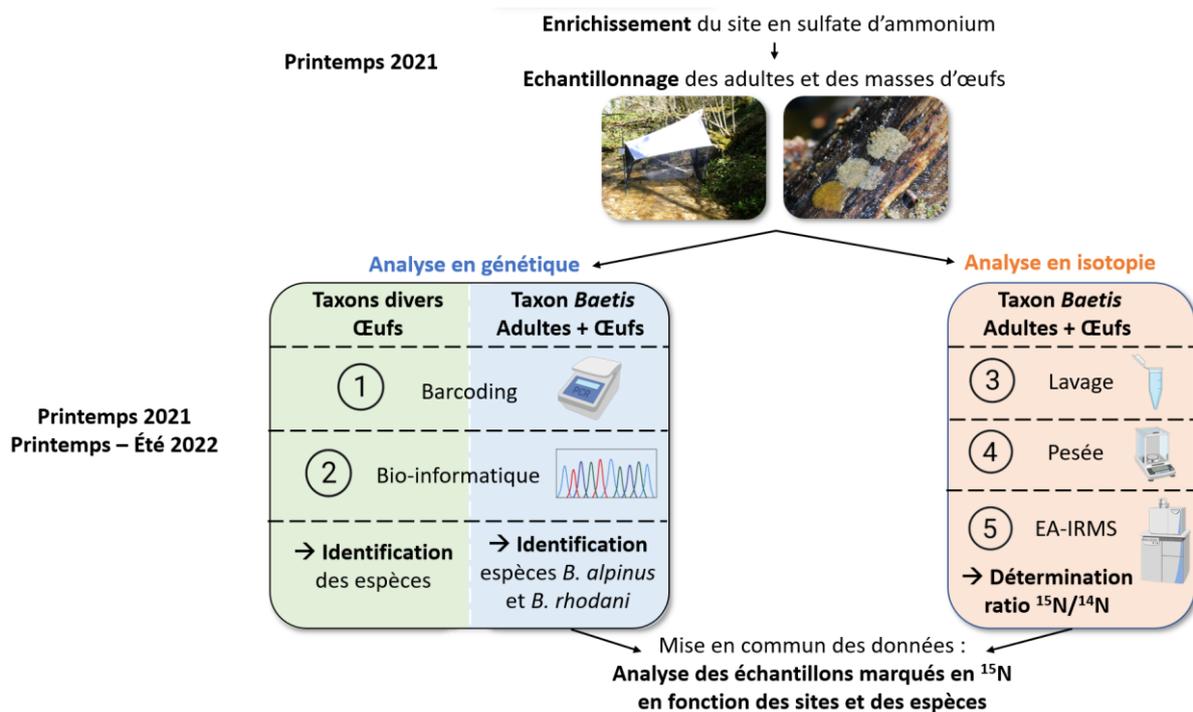


Figure 5 : Estimation des distances de dispersion du taxon *Baetis* par analyse génétique et isotopique, et observation de la diversité du cours d'eau du Buizin par analyse génétique.

L'analyse des échantillons est réalisée par Barcoding (1) : par amplification et séquençage du gène COI. Les séquences sont analysées par BLASTn afin de déterminer les espèces observées (2). Les échantillons du genre *Baetis* sont également analysés en isotopie et sont préparés avant analyse en EA-IRMS (5) : lavage (3) et pesée (4) des adultes et des masses d'œufs. L'ensemble des données obtenues sont ensuite mises en commun pour estimer les distances de dispersion des insectes du genre *Baetis*.

III. Résultats

A. Observation de la diversité des pontes des insectes aquatiques dans le Buizin

De nombreuses masses d'œufs ont été échantillonnées pour recenser les différentes espèces d'insectes trouvées sur le site d'étude. Parmi les 86 œufs analysés en Barcoding n'appartenant pas au genre *Baetis*, 42 ont pu être identifiés au rang taxonomique de l'espèce, 4 à celui du genre et 3 à celui la famille (Tableau 2). Les 37 restants n'ont pas pu être identifiés soit car le gène COI n'a pas été correctement amplifié, soit par contamination de micro-organismes (e.g. algues, rotifères) sur les masses d'œufs.

Parmi les masses d'œufs pour lesquelles l'identification a fonctionné, deux ordres principaux ont été identifiés : les Trichoptères (4 familles identifiées) et les Diptères (2 familles identifiées). De plus, aucune espèce exclusivement aquatique n'a été détectée lors de cet échantillonnage, seulement des espèces d'insectes ayant un stade larvaire aquatique et un stade adulte aérien.

Tableau 2 : Espèces identifiées sur des masses d’œufs échantillonnées sur le cours d’eau du Buizin par Barcoding

Les séquences du gène COI sont obtenues par séquençage forward (LCO1490) et analysées par BLASTn sur la plateforme NCBI. Le symbole « - » indique une non-identification de l’espèce.

ORDRE	FAMILLE	SOUS-FAMILLE	GENRE	ESPÈCES IDENTIFIÉES	Nombre de masse d’œufs (N = 86)
Trichoptera	Hydropsychidae	Hydropsychinae	<i>Hydropsyche</i>	<i>Hydropsyche instabilis</i>	9
	Hydropsychidae	Hydropsychinae	<i>Hydropsyche</i>	<i>Hydropsyche dinarica</i>	1
	Limnephilidae	Drusinae	<i>Drusus</i>	<i>Drusus annulatus</i>	8
	Philopotamidae	Philopotaminae	<i>Philopotamus</i>	<i>Philopotamus variegatus</i>	7
	Odontoceridae	Odontocerinae	<i>Odontocerum</i>	<i>Odontocerum albicorne</i>	2
Diptera	Chironomidae	-	-	-	2
	Chironomoidea	Orthoclaadiinae	-	-	1
	Chironomoidea	Orthoclaadiinae	<i>Cricotopus</i>	-	3
	Chironomoidea	Orthoclaadiinae	<i>Parametriocnemus</i>	<i>Parametriocnemus stylatus</i>	8
	Chironomoidea	Prodiamesinae	<i>Prodiamesa</i>	<i>Prodiamesa olivacea</i>	1
	Chironomoidea	Tanypodinae	<i>Macropelopia</i>	<i>Macropelopia nebulosa</i>	5
	Dixidae	NA	<i>Dixa</i>	-	1
	Dixidae	NA	<i>Dixa</i>	<i>Dixa submaculata</i>	1
TOTAL					49
-	-	-	-	-	37

Les photographies prises lors de l’échantillonnage de ces masses d’œufs permettent d’observer une certaine diversité morphologique (Figure 6). Certaines masses présentent des œufs de petites tailles, disposés en « zigzag » comme pour l’espèce *Parametriocnemus stylatus* (Figure 6.A) ou disposés en pointes, comme pour les espèces *Dixa submaculate* ou *Macropelopia nebulosa* (Figure 6.B). D’autres masses d’œufs présentent des œufs de plus grande taille (quelques millimètres) disposés de manière régulière, comme pour le genre *Hydropsyche spp.* (Figure 6.C) ou bien sphériques au sein d’une matrice très gélatineuse, par exemple pour l’espèce *Odontocerum albicorne* (Figure 6.D).

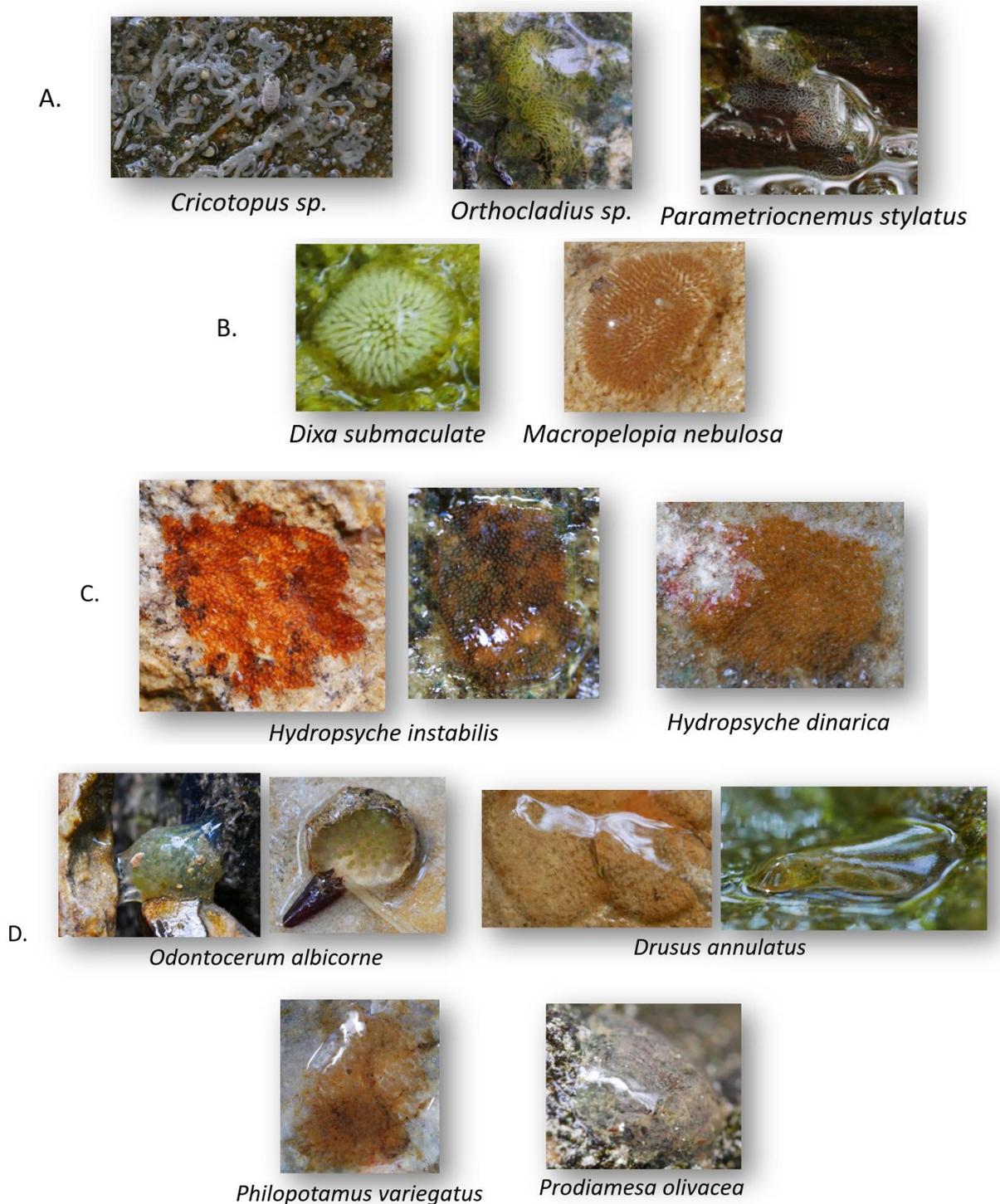


Figure 6 : Masses d'œufs de différentes espèces d'insectes observées dans le court d'eau du Buizin. Les masses d'œufs sont échantillonnées le long du site d'étude et analysées par Barcoding, puis identifiées par BLASTn sur la plateforme NCBI. De nombreuses topologies de masses d'œufs en termes de tailles, couleurs, formes et textures ont été observées (A-D).
Source photos : Emmanuel Jaulin et Maria Alp

B. Répartition spatiale et temporelle des espèces du genre *Baetis* (adultes et œufs)

1. Identification moléculaire des espèces *B. alpinus* et *B. rhodani*

Après une première analyse des séquences par BLAST, les espèces *Baetis alpinus* et *Baetis rhodani* sont identifiées. L'identification de ces espèces est également confirmée visuellement par analyse phylogénétique. L'ensemble des séquences obtenues durant ce stage (189 masses d'œufs et 379 adultes) sont comparées aux 47 séquences récupérées sur la base de données GenBank (Annexe 2). Le placement des échantillons du Buizin sur l'arbre phylogénétique est cohérent entre les deux stades de vie étudiés ici (adultes et œufs) (Figure 7).

La grande majorité des séquences obtenues durant ce stage et identifiées comme *B. rhodani* par BLASTn (n = 103 pour les œufs et pour les adultes) se placent dans l'arbre au niveau des séquences *B. rhodani* récupérées sur GenBank (8 séquences de *B. rhodani*). Un petit groupe (18 séquences pour les œufs et 39 séquences pour les adultes) d'individus identifiés comme *B. rhodani* par BLASTn est également observé à proximité de la branche principale de *B. rhodani*.

Les séquences identifiées comme *B. alpinus* obtenues sur GenBank se placent également en deux groupes. Néanmoins, les séquences identifiées comme *B. alpinus* obtenues durant ce stage (n = 21 pour les œufs et n = 168 pour les adultes) se placent correctement avec trois séquences de GenBank (pour les œufs) et quatre séquences (pour les adultes) identifiées comme *B. alpinus*.

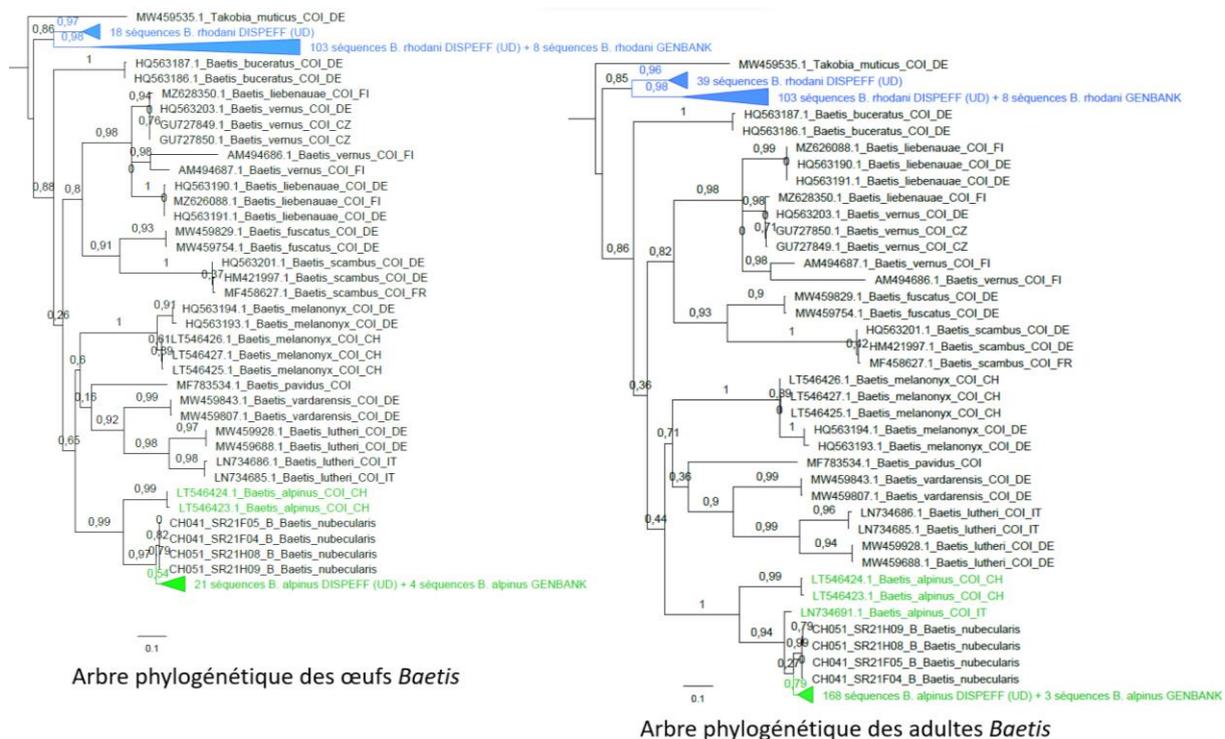


Figure 7 : Arbre phylogénétique des masses d'œufs (à gauche) et des adultes (à droite) appartenant au taxon *Baetis* obtenues par Barcoding

Les arbres phylogénétiques sont construits par PhyML avec le modèle de construction GTR et en support de branche aLRT (SH-like). Ils comprennent les séquences de masses d'œufs et d'adultes *Baetis* spp. obtenues par Uma Disdier pendant ce stage ainsi que 47 autres séquences récupérées sur GenBank (Annexe 2).

2. Répartition des échantillons étudiés en fonction des sites d'échantillonnage

Des analyses génétiques par Barcoding ont été réalisées sur les 379 échantillons *Baetis* adultes, analysés durant ce stage (Uma Disdier), en plus des 109 adultes préalablement identifiés par E. Jaulin (Annexe 1). Parmi les 405 individus adultes pour lesquels l'identification a été possible, 52 % correspondent à *Baetis rhodani* et 48 % correspondent à *Baetis alpinus* (Figure 8). Sur chacun des sites, la répartition entre les deux espèces est relativement homogène.

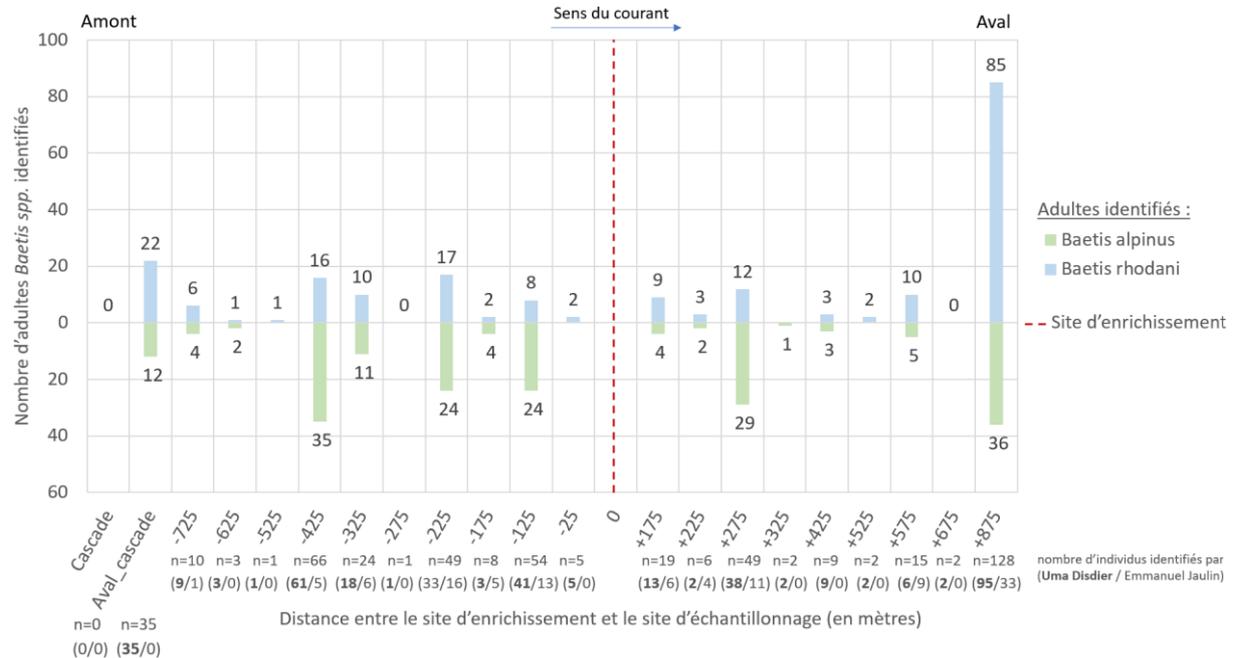


Figure 8 : Répartition des espèces *B. alpinus* et *B. rhodani* identifiées par Barcoding sur des adultes en fonction du site d'échantillonnage sur le Buizin ($N_{total} = 488$)

Les adultes marqués et non marqués sont pris en compte pour cette représentation graphique. Les sites annotés « - » se trouvent en amont du site d'enrichissement et les sites en aval sont annoté « + ». « n = x » indique le nombre total de masses d'œufs *Baetis spp.* analysées pour chaque point d'échantillonnage. Les sites « Aval_cascade » et « Cascade » se trouvent respectivement à 1 200 m et 1 700 m en amont du site d'enrichissement.

Des analyses génétiques par Barcoding ont également été réalisées sur les 189 masses d'œufs du genre *Baetis* obtenues durant ce stage (Uma Disdier), auxquels s'ajoutent les 235 masses d'œufs préalablement identifiées par Emmanuel Jaulin (Annexe 1). Parmi les 424 masses d'œufs de *Baetis* analysées génétiquement, 357 ont pu être identifiées jusqu'à l'espèce (Figure 9). Cette analyse génétique permet d'observer que parmi ces masses d'œufs identifiées, 86 % sont des œufs de *Baetis rhodani*, et les 14 % restants correspondent aux œufs de *Baetis alpinus*. L'espèce *B. rhodani* reste dominante dans l'analyse des masses d'œufs, mais *B. alpinus* est également présente sur la quasi-totalité des sites.

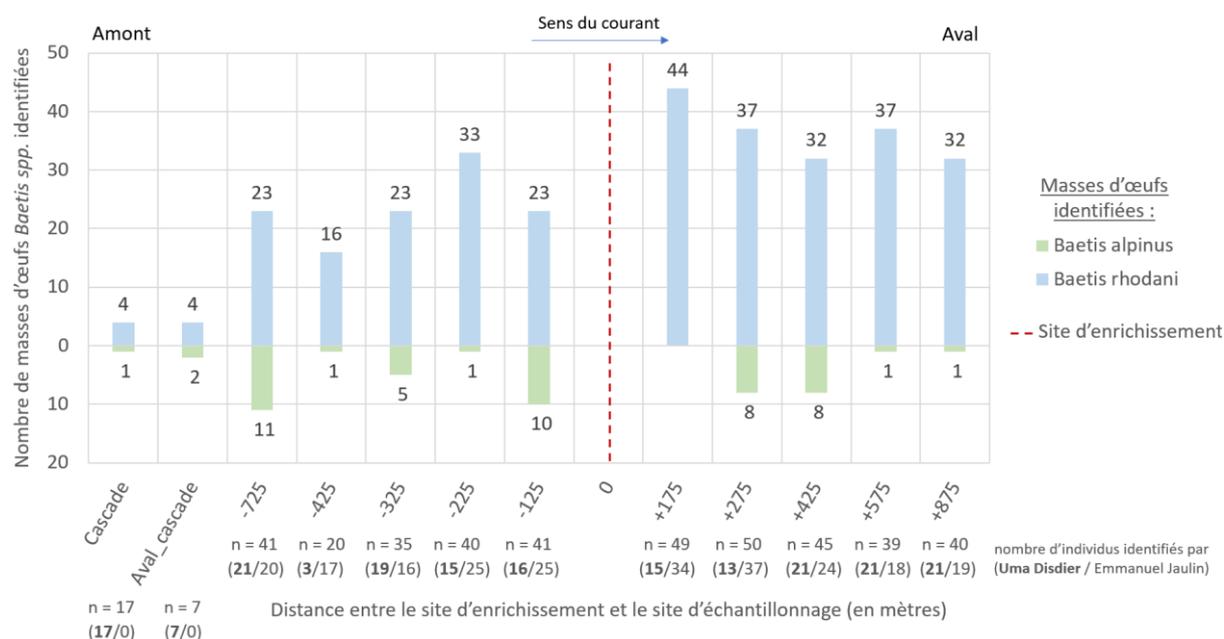


Figure 9 : Répartition des espèces *B. alpinus* et *B. rhodani* identifiées par Barcoding sur des masses d'œufs en fonction du site d'échantillonnage sur le Buizin ($N_{total} = 424$)

Les masses d'œufs marquées et non marquées sont prises en compte pour cette représentation graphique. Les sites annotés « - » se trouvent en amont du site d'enrichissement et les sites en aval sont annoté « + ».

« n = x » indique le nombre total de masses d'œufs *Baetis spp.* analysées pour chaque point d'échantillonnage. Les sites « Aval_cascade » et « Cascade » se trouvent respectivement à 1 200 m et 1 700 m en amont du site d'enrichissement.

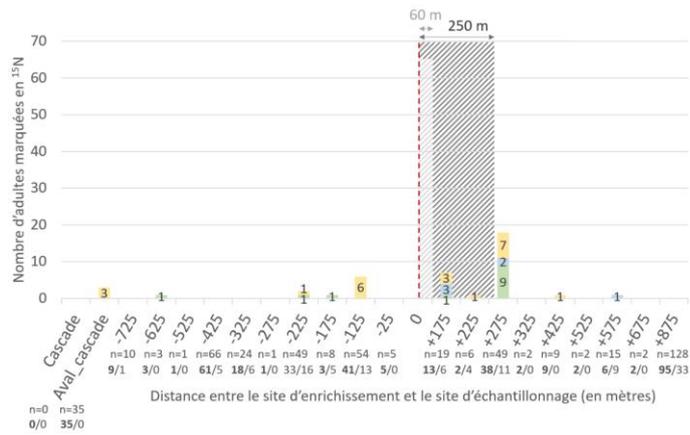
C. Estimation des distances de dispersion d'après les deux stades de vie (adultes et œufs)

Les adultes et masses d'œufs marqués en isotope lourd ^{15}N sont sélectionnés en fonction des différents seuils préalablement définis, et sont regroupés en fonction des différents sites, pour estimer leur distance de dispersion. Les zones de marquage déterminées d'après les données sur le biofilm sont représentées sur le graphique à titre indicatif. Comme expliqué précédemment, l'amplitude entre les zones définies à partir des données du biofilm et des larves de *Baetis* est relativement faible, comme observé sur les figures suivantes (Figure 10 et 11). Ainsi, seule la zone de marquage à partir des données des larves de *Baetis* est utilisée pour estimer les distances de dispersion.

Sur chacun des sites, des individus de *Baetis rhodani* et *Baetis alpinus* marqués en ^{15}N sont retrouvés, pour les adultes et pour les œufs. Pour les adultes, autant d'individus marqués sont observés en aval qu'en amont (hors de la zone de marquage), pour chacun des seuils en $\delta^{15}N$ testés (Figure 10). En sélectionnant le seuil 10 %, des individus marqués sont détectés au site Aval cascade, se trouvant à 1 200 m en amont du site d'enrichissement et jusqu'à 875 m en aval du site. En utilisant un seuil plus conservatif tel que 150 %, des individus marqués sont également détectés jusqu'à 1 200 m en amont.

Pour les masses d'œufs, la majorité des échantillons marqués sont situés en amont du site d'enrichissement lorsque le seuil de $\delta^{15}N$ est 48 %, 95 % ou 150 % (Figure 11). Des masses d'œufs marquées ont été analysées jusqu'à 1 700 m en amont du site et 875 m en aval du site d'enrichissement pour le seuil de $\delta^{15}N$ à 10 %.

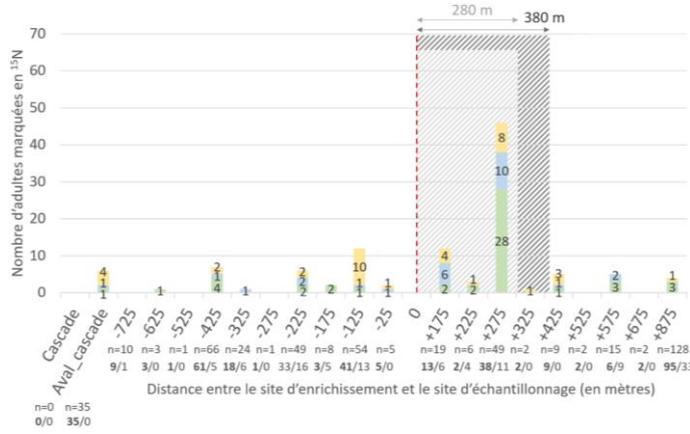
A.1) Seuil : $\delta^{15}\text{N}$ < 150 ‰



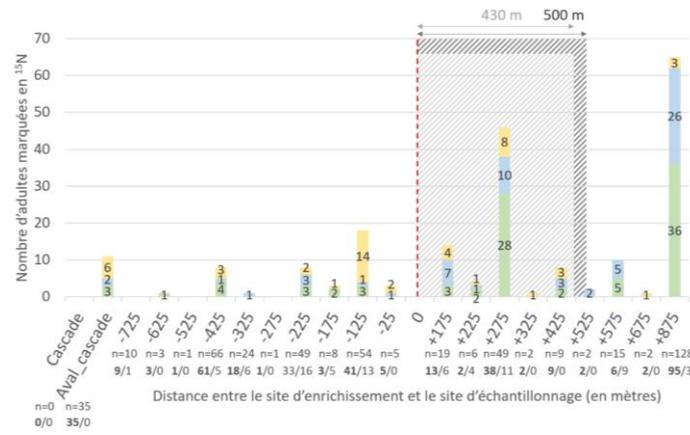
A.2) Seuil : $\delta^{15}\text{N}$ < 95 ‰



A.3) Seuil : $\delta^{15}\text{N}$ < 48 ‰



A.4) Seuil : $\delta^{15}\text{N}$ < 10 ‰



Légende :

Adultes identifiés :

- *Baetis* sp.
- *Baetis rhodani*
- *Baetis alpinus*

- ▨ Zone de marquage (biofilm)
- ▨ Zone de marquage (larves de *Baetis*)

-- Site d'enrichissement

nombre d'échantillons identifiés par (Uma Disdier / Emmanuel Jaulin)

Figure 10 : Répartition des adultes *Baetis* spp. marqués en isotope lourd ^{15}N , analysés en IRMS, pour les différents seuils en $\delta^{15}\text{N}$ sélectionnés, en fonction du site d'échantillonnage.

Répartition des adultes *Baetis spp.* possédant une signature isotopique supérieure à 150 ‰ (A.1), à 95 ‰ (A.2), à 48 ‰ (A.3) et à 10 ‰ (A.4). Les zones de marquage « biofilm » et « larve de *Baetis* » sont déterminées à partir du graphique de la Figure 4. Les sites annotés « - » se trouvent en amont du site d'enrichissement et les sites en aval sont annotés « + ». Les sites « Aval_cascade » et « Cascade » se trouvent respectivement à 1 200 m et 1 700 m en amont du site d'enrichissement.

« n = x » indique le nombre total d'adultes *Baetis spp.* analysés pour chaque distance.

Les échantillons n'ayant pas pu être identifiés à l'espèce restent identifiés au genre et sont nommés « *Baetis sp.* ».

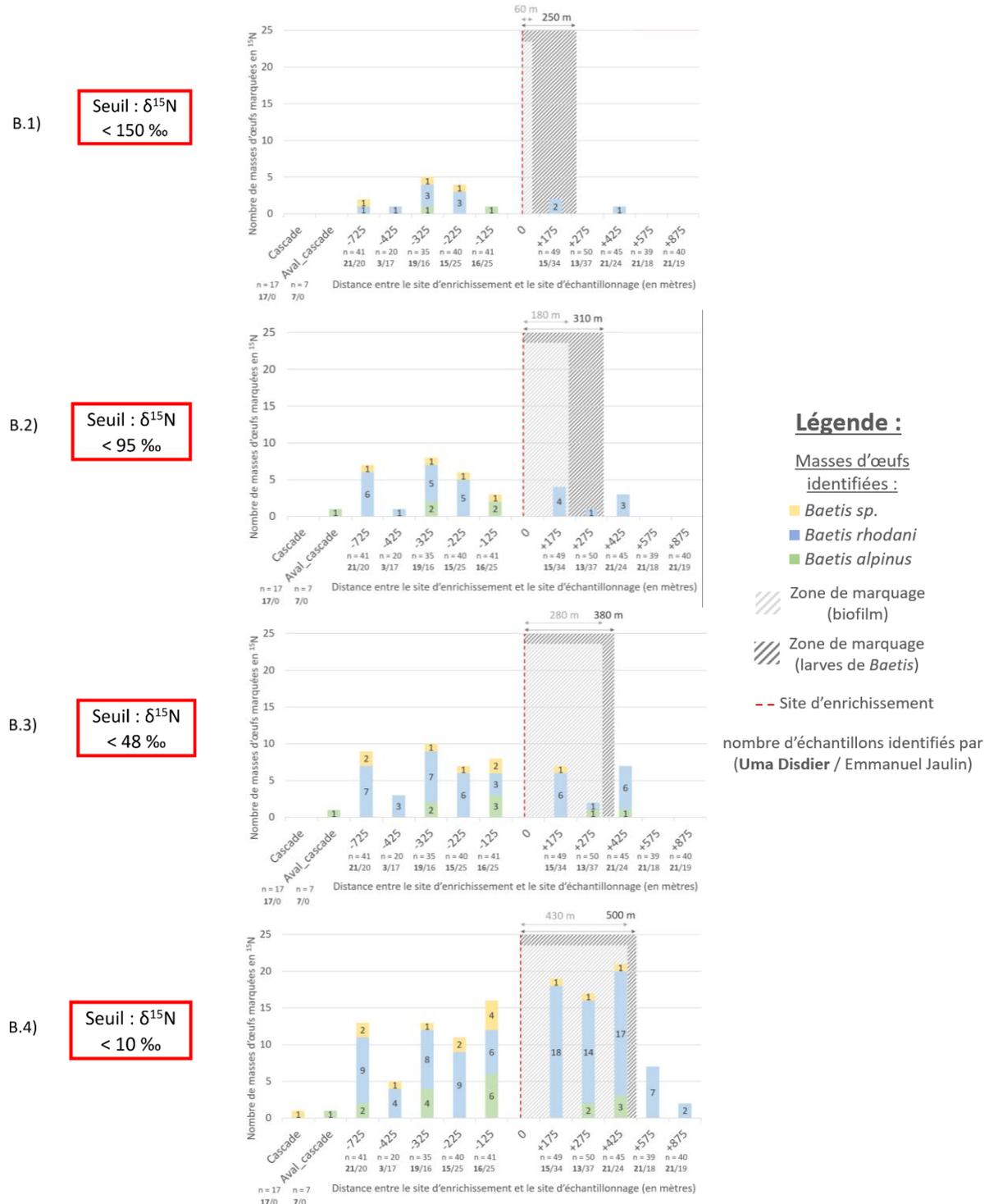


Figure 11 : Répartition des masses d'œufs *Baetis spp.* marqués en isotope lourd ^{15}N , analysés en IRMS, pour les différents seuils en $\delta^{15}\text{N}$ sélectionnés, en fonction du site d'échantillonnage.

Répartition des masses d'œufs *Baetis spp.* possédant une signature isotopique supérieure à 150 ‰ (B.1), à 95 ‰ (B.2), à 48 ‰ (B.3) et à 10 ‰ (B.4).

Les zones de marquage « biofilm » et « larve de *Baetis* » sont déterminées à partir du graphique de la Figure 4. Les sites annotés « - » se trouvent en amont du site d'enrichissement et les sites en aval sont annotés « + ». Les sites « Aval_cascade » et « Cascade » se trouvent respectivement à 1 200 m et 1 700 m en amont du site d'enrichissement.

« n = x » indique le nombre total de masses d'œufs *Baetis spp.* analysés pour chaque distance.

Les échantillons n'ayant pas pu être identifiés à l'espèce restent identifiés au genre et sont nommés « *Baetis sp.* ».

A partir de ces observations, une tendance est observée : les adultes sont interceptés de manière homogène sur l'ensemble des sites, alors que les œufs sont principalement observés en amont du site de marquage.

Des estimations sur les distances de dispersion peuvent être ensuite calculées. Néanmoins, les distances observées ici doivent être ajustées pour ne pas surestimer ou sous-estimer les distances réelles de dispersion. Le seuil de $\delta^{15}\text{N}$ à 48 ‰ est sélectionné pour observer les résultats. Celui-ci semble être le plus pertinent, en observant le rapport entre la longueur de la zone d'enrichissement et le nombre d'échantillons marqués, hors de cette zone. De plus, ce seuil reste relativement élevé par rapport aux valeurs indiquées par Kendall (1998), permettant de confirmer un enrichissement artificiel de ces échantillons. Ainsi, des adultes *Baetis* marqués sont observés à 1 200 m en amont et à 875 m en aval, avec une zone de marquage de 380 mètres. Les distances de dispersions estimées calculées sont de 1 200 m en amont et 495 m en aval ($875 - 380 = 495$). Pour les œufs, des échantillons marqués à 1 200 m en amont sont également observés et à 425 m en aval pour le seuil de 48 ‰. La distance estimée des adultes *Baetis* à partir des masses d'œufs est de 1 200 m en amont et 45 m en aval.

IV. Discussion

A. Comparaison des distances de dispersion estimées pour les adultes et les œufs *Baetis*

Les distances de dispersion sont estimées en analysant les échantillons adultes et les masses d'œufs *Baetis* en spectrophotométrie de masse.

La longueur de la zone d'enrichissement artificiel en sulfate d'ammonium sélectionnée joue un rôle important dans l'analyse de ces échantillons. Néanmoins, malgré la variation du nombre d'individus considérés comme enrichis en isotope ^{15}N en fonction des différents seuils, les tendances observées entre les adultes et les œufs, restent les mêmes. Comme indiqué précédemment, le seuil $\delta^{15}\text{N}$ à 48 ‰ présente un bon équilibre entre la fiabilité du marquage, c'est à dire qu'il n'est pas confondu avec d'autres potentielle sources de modification de la signature isotopique (ex. eutrophisation), et la taille de la zone considérée comme marquée.

Même si ce seuil en $\delta^{15}\text{N}$ semble être plus judicieux pour une analyse générale des échantillons, il reste intéressant d'observer les distances maximales de capture de certains individus pour des seuils différents. Par exemple, des adultes marqués sont capturés jusqu'à 1 200 m en amont en utilisant un seuil de 150 ‰, mettant en évidence la robustesse de cette estimation de distance. Autre exemple, au seuil de 10 ‰, une masse d'œufs marquée est observée à 1 700 m en amont, permettant d'estimer la distance de dispersion de l'adulte l'ayant déposé de 1 700 m.

Les estimations des distances de dispersion, sont estimées de manière conservative (cf. II.C.3), en prenant en compte comme point d'émergence de l'adulte, le point le plus proche du site de capture

(longueur de la zone d'enrichissement la plus proche du site d'échantillonnage). Aucune différence n'est observée dans la dispersion entre les espèces *Baetis alpinus* et *Baetis rhodani*, qui sont toutes deux (individus et masses d'œufs marqués) retrouvées sur la plupart des sites. Les distances maximales de dispersion des adultes (obtenue à partir des mesures sur les adultes), pour ces deux espèces, sont toutes deux de 1 200 m pour le seuil de signature isotopique de 48 ‰. Ces valeurs correspondent à des distances de capture en vol des adultes, et non réellement à la distance de dispersion effective des insectes, c'est-à-dire la colonisation d'un nouvel espace. D'où l'intérêt également d'estimer les distances de dispersion à partir des masses d'œufs. En observant les œufs, la masse d'œuf *Baetis spp.* retrouvée au site cascade, indique une distance de dispersion de 1 700 m.

Ainsi, les distances estimées ici sont dans les mêmes ordres de grandeurs que les estimations observées dans la littérature, avec une distance de dispersion des adultes *Baetis spp.* comprises entre 1,6 et 1,9 km (Hershey et al., 1993).

Finalement, une dispersion préférentielle vers l'amont (depuis le site d'émergence) des individus *Baetis* est observée en étudiant les masses d'œufs (avec une signature supérieure à 48 ‰), permettant de confirmer les observations réalisées par Müller (Müller, 1982). Le contraste observé entre la distribution des adultes (en amont et en aval) et des œufs marqués (principalement en amont), montre l'intérêt d'étudier les masses d'œufs des insectes pour observer le processus de dispersion, étant donné que les adultes peuvent être interceptés à tous endroits entre leur point de départ et leur destination finale.

B. Les limites et biais d'échantillonnage sur le Buizin

Pour obtenir des estimations de distances de dispersion effectives robustes, il a été nécessaire de réaliser un échantillonnage comprenant un nombre important d'individus. Malgré un échantillonnage conséquent, la répartition entre les deux espèces *Baetis* observées (*B. alpinus* et *B. rhodani*) est différente entre l'étude des adultes et celle des œufs. En effet, parmi les 357 masses d'œufs identifiées, la grande majorité correspond à l'espèce *B. rhodani*, alors que parmi les 405 adultes identifiés, la répartition entre les deux espèces est homogène. Ainsi, lors de l'échantillonnage, beaucoup plus de masses d'œufs *B. rhodani* ont été récoltés par rapport à *B. alpinus*. Cette différence peut s'expliquer par un biais d'échantillonnage lors de la sélection des masses d'œufs à récolter. En effet, il a été observé par Jaulin (2021) que les masses d'œufs *B. alpinus* sont plus petites en tailles que celles de *B. rhodani*. Ainsi, lors de l'échantillonnage, des masses d'œufs avec plus de matière à analyser ont pu être inconsciemment privilégiées.

Par ailleurs, il est très important de souligner la spécificité des résultats observés, par rapport au site d'étude, ici le Buizin. En effet, la morphologie du cours d'eau peut fortement influencer la présence ou non de lieux disponibles pour la ponte et ainsi, agir sur les besoins de dispersion des individus. Par exemple, certaines zones en amont présentent de fortes concrétions de calcaire, ce qui peut diminuer le nombre d'échantillons à analyser (ex. site M21 avec seulement 20 échantillons disponibles (Annexe 1)). De plus, il existe également un déséquilibre dans la sélection des sites d'échantillonnage. Le site d'enrichissement en isotope est placé au milieu des 2,6 km du site, mais à cause de la longueur de la zone de marquage, un nombre plus important de sites hors de la zone sont présents en amont qu'en aval, ce qui peut apporter un biais dans les résultats.

D'autre part, le nombre d'adultes analysés en IRMS n'est pas le même sur chaque site, contrairement aux œufs (environ $n = 35$). Cette approche pour les œufs permet d'observer un équilibre dans la répartition des échantillons en fonction des sites et donc une interprétation des résultats isotopiques plus cohérente. Il serait donc intéressant de définir également un nombre minimal

d'échantillons adultes à analysés en IRMS pour chaque site, afin d'observer un éventuel patron dans la répartition des espèces dans l'espace.

Enfin, il serait intéressant d'observer la proportion d'adultes marqués ayant encore des œufs dans le thorax, par rapport aux adultes capturés après avoir déposé leurs œufs. Ces derniers auraient déposé leurs œufs, mais auraient pu continuer de voler et donc avoir une distance de capture en vol inférieure ou supérieure à la localisation exacte de la masse d'œufs déposée.

C. Protocole alternatif pour l'analyse génétique

Parmi l'ensemble des œufs morphologiquement différents des œufs *Baetis*, près de la moitié n'ont pas pu être identifiés à l'espèce. Pour un certain nombre d'entre eux, le séquençage forward du gène COI présente des séquences d'une cinquantaine de paires de bases, sur les 710 paires de bases attendues (Folmer et al., 1994).

Comme illustré dans la Figure 6, certaines masses d'œufs présentent des matrices gélatineuses, pouvant empêcher une lyse correcte des œufs en utilisant du Chelex 100. Ainsi, une alternative au protocole d'extraction, utilisé lors de cette étude, pourrait être envisagée afin d'améliorer l'extraction d'ADN. La technique d'extraction d'ADN par utilisation du phénol-chloroforme est courante pour des échantillons biologiques (Köchler et al., 2005; McKiernan and Danielson, 2017). Chez certains ovipares, des matrices gélatineuses enrobent les œufs pour les maintenir physiquement, mais également comme apport d'énergie, en étant riche en protéine (Hedrick and Nishihara, 1991). La technique d'extraction d'ADN par phénol-chloroforme peut donc être judicieuse pour ces échantillons présentant des matrices épaisses. Les cellules sont lysées par la protéinase K et du SDS, et l'ajout du phénol-chloroforme permet la séparation d'une phase aqueuse contenant l'ADN et d'une phase organique contenant les protéines et les lipides (Figure 12). Cependant, cette technique n'a pas pu être testée lors de ce stage par faute de temps.

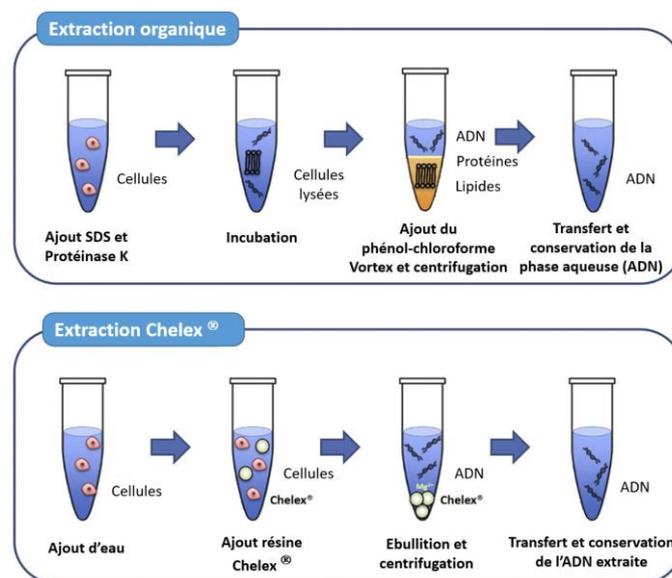


Figure 12 : Protocole d'extraction d'ADN par extraction organique au phénol-chloroforme et par extraction au Chelex®

L'extraction organique permet une séparation de la phase aqueuse (ADN) et de la phase organique (protéines et lipides). L'extraction au Chelex® permet une libération de l'ADN par chélation des billes de Chelex au cation divalent (ex. Mg^{2+}).

Source modifiée à partir de : McKiernan and Danielson, 2017

Pour certains œufs du genre *Baetis* l'extraction de l'ADN a également échoué et ils n'ont pas pu être identifiés à l'espèce. Les masses d'œufs *Baetis* ne présentent pas de matrice gélatineuse épaisse, par conséquent, l'échec de l'extraction d'ADN peut s'expliquer de différentes raisons : soit l'échantillon est trop abimé, soit les œufs ont déjà éclos, et ne présentent pas suffisamment d'ADN.

D. Observation d'un groupe cryptique chez *Baetis rhodani* et limites de la phylogénie

L'analyse génétique des séquences du gène COI par BLASTn sur la plateforme NCBI a permis d'identifier les espèces observées dans les échantillons. A ces résultats, se joint une analyse phylogénétique des séquences pour valider les espèces observées. Dans un premier temps, des groupes cryptiques sont observés pour les échantillons identifiés comme *B. rhodani*, aussi bien pour les adultes que pour les masses d'œufs. La présence de groupes cryptiques au sein d'une espèce correspond à des individus présentant des traits morphologiques similaires, mais une différence génétique importante (Korshunova et al., 2019). En observant les séquences des deux groupes *B. rhodani* observés sur l'arbre phylogénétique (Figure 7), des substitutions de bases sont observées (Annexe 4). Les espèces *B. rhodani* et *B. alpinus* sont décrites comme étant des espèces complexes, présentant des « sous-espèces » non identifiées en raison de leurs ressemblances morphologiques (Leys et al., 2016; Williams et al., 2006). Malgré l'existence de ces sous-espèces, les données présentées ici ne permettent pas d'observer une différence de comportement dans la dispersion des insectes, car le nombre d'individus appartenant au groupe externe et également marqués en isotope lourd est trop faible.

D'autre part, l'analyse phylogénétique réalisée, lors de cette étude permet seulement de s'assurer de l'insertion correcte des séquences DispEff/RBioII au sein des taxons d'intérêt, ici *B. alpinus* et *B. rhodani*. Les valeurs obtenues par support de branche aLRT (SH-like) ne sont pas analysés en dehors de ces taxons d'intérêts, car seule l'identification des espèces est recherchée, et non leur lien de parenté. Ces valeurs de support pour un clade extérieur à celui de *B. alpinus* ou *B. rhodani* n'influencent pas celles du clade d'intérêt. Ainsi, il est observé que les valeurs de support de branche aLRT, pour les clades de *B. rhodani* ainsi que pour *B. alpinus*, sont suffisamment élevée pour confirmer l'homologie des séquences identifiées en BLASTn.

Néanmoins, il reste important de seulement émettre des hypothèses sur l'emplacement des séquences *Baetis* analysées lors de ce stage dans l'arbre, car les séquences récupérées sur GenBank peuvent présenter des inexactitudes ou des erreurs d'identification.

V. Conclusion

Le processus de dispersion chez les insectes aquatiques est un phénomène encore peu étudié, notamment du fait de leur cycle de vie complexe, aérien et aquatique. Une nouvelle approche de l'estimation des distances de dispersion des insectes est établie avec l'analyse des masses d'œufs enrichies en isotope ¹⁵N, améliorant la précision des estimations de distance. Cette étude permet d'apporter de nouvelles connaissances sur les masses d'œufs, une phase du cycle de vie peu considérée. De plus, le recensement et la description de nombreuses masses d'œufs appartenant au taxon *Baetis* ou à d'autres taxons présentant une morphologie distincte permettent d'enrichir les connaissances sur les insectes aquatiques.

Encore plus aujourd'hui, il est important de comprendre les mécanismes de dispersion des insectes. En effet, avec le réchauffement climatique et le déplacement des niches d'habitats, il semble

essentiel d'observer le potentiel de recolonisation des espaces par les espèces afin de les protéger et de gérer correctement leurs habitats.

Pour conclure d'un point de vue personnel, j'étais extrêmement motivée à l'idée de rejoindre le LEHNA et INRAE pour participer à un projet en écologie. J'ai pu rencontrer des personnes passionnées par leur travail et leurs convictions, me donnant réellement envie de continuer mes études dans cette direction. L'étude des comportements et des mécanismes de dispersion des organismes vivant, notamment des animaux, est très passionnante et me semblent fondamentale pour assurer une préservation correcte de la faune et de la flore.

Bibliographie

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

Anisimova, M., and Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>.

Baguette, M., Blanchet, S., Legrand, D., Stevens, V.M., and Turlure, C. (2013). Individual dispersal, landscape connectivity and ecological networks. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 88, 310–326. <https://doi.org/10.1111/brv.12000>.

Bowler, D.E., and Benton, T.G. (2005). Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biol. Rev.* 80, 205–225. <https://doi.org/10.1017/S1464793104006645>.

Briers, R.A., Gee, J.H.R., Cariss, H.M., and Geoghegan, R. (2004). Inter-population dispersal by adult stoneflies detected by stable isotope enrichment. *Freshw. Biol.* 49, 425–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01198.x>.

Brittain, J.E. (1982). *Biology of Mayflies*. 29. .

Carpenter, S.R., Fisher, S.G., Grimm, N.B., and Kitchell, J.F. (1992). Global Change and Freshwater Ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23, 119–139. .

Caudill, C.C. (2003). Measuring dispersal in a metapopulation using stable isotope enrichment: high rates of sex-biased dispersal between patches in a mayfly metapopulation. *Oikos* 101, 624–630. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12467.x>.

Cid, N., Eros, T., Heino, J., Singer, G., Jähnig, S.C., Cañedo-Argüelles, M., Bonada, N., Sarremejane, R., Mykra, H., Sandin, L., et al. (2021). From meta-system theory to the sustainable management of rivers in the Anthropocene. <https://doi.org/10.32942/osf.io/9pyb3>.

Cummins, K. (1973). *Trophic Relations of Aquatic Insects*. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.EN.18.010173.001151>.

Floury, M., Pollock, L.J., Buisson, L., Thuiller, W., Chandesris, A., and Souchon, Y. (2021). Combining expert-based and computational approaches to design protected river networks under climate change. *Divers. Distrib.* 27, 2428–2440. <https://doi.org/10.1111/ddi.13411>.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299. .

Hagler, J.R., and Jackson, C.G. (2001). Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annu. Rev. Entomol.* 46, 511–543. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.511>.

Hedrick, J.L., and Nishihara, T. (1991). Structure and function of the extracellular matrix of anuran eggs. *J. Electron Microsc. Tech.* 17, 319–335. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060170306>.

- Hershey, A.E., Pastor, J., Peterson, B.J., and Kling, G.W. (1993). Stable Isotopes Resolve the Drift Paradox for *Baetis* Mayflies in an Arctic River. *Ecology* 74, 2315–2325. <https://doi.org/10.2307/1939584>.
- Kendall, C. (1998). Tracing Nitrogen Sources and Cycling in Catchments. In *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*, (Elsevier), pp. 519–576.
- Köchl, S., Niederstätter, H., and Parson, W. (2005). DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol-Chloroform Method and Real-Time PCR. In *Forensic DNA Typing Protocols*, A. Carracedo, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 13–29.
- Korshunova, T., Picton, B., Furfaro, G., Mariottini, P., Pontes, M., Prkić, J., Fletcher, K., Malmberg, K., Lundin, K., and Martynov, A. (2019). Multilevel fine-scale diversity challenges the ‘cryptic species’ concept. *Sci. Rep.* 9, 6732. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42297-5>.
- Leys, M., Keller, I., Räsänen, K., Gattolliat, J.-L., and Robinson, C.T. (2016). Distribution and population genetic variation of cryptic species of the Alpine mayfly *Baetis alpinus* (Ephemeroptera: Baetidae) in the Central Alps. *BMC Evol. Biol.* 16, 77. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0643-y>.
- Lieutier, F., Ham, R., Ham, M.C., and Garcia, J. (1986). Une methode de marquage individuel des coleopteres scolytides pour les etudes de laboratoire. *Agronomie* 6, 773–776. .
- Macneale, K.H., Peckarsky, B.L., and Likens, G.E. (2005). Stable isotopes identify dispersal patterns of stonefly populations living along stream corridors. *Freshw. Biol.* 50, 1117–1130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01387.x>.
- McKiernan, H.E., and Danielson, P.B. (2017). Chapter 21 - Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. In *Molecular Diagnostics (Third Edition)*, G.P. Patrinos, ed. (Academic Press), pp. 371–394.
- Müller, K. (1982). The colonization cycle of freshwater insects. *Oecologia* 52, 202–207. <https://doi.org/10.1007/BF00363837>.
- Nathan, R. (2001). The challenges of studying dispersal. *Trends Ecol. Evol.* 16, 481–483. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02272-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02272-8).
- Pearson, W.R. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Curr. Protoc. Bioinforma.* Ed. Board Andreas Baxevanis AI 0 3, 10.1002/0471250953.bi0301s42. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>.
- Pertsemlidis, A., and Fondon, J.W. (2001). Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). *Genome Biol.* 2, REVIEWS2002. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-10-reviews2002>.
- Ronce, O. (2007). How Does It Feel to Be like a Rolling Stone? Ten Questions about Dispersal Evolution. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 231–253. .
- Sarremejane, R., Cid, N., Stubbington, R., Datry, T., Alp, M., Cañedo-Argüelles, M., Cordero-Rivera, A., Csabai, Z., Gutiérrez-Cánovas, C., Heino, J., et al. (2020). DISPERSE, a trait database to assess the dispersal potential of European aquatic macroinvertebrates. *Sci. Data* 7, 386. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00732-7>.

Williams, H.C., Ormerod, S.J., and Bruford, M.W. (2006). Molecular systematics and phylogeography of the cryptic species complex *Baetis rhodani* (Ephemeroptera, Baetidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 40, 370–382. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.03.004>.

Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., and Ansorge, W. (1988). Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett.* 233, 432–436. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80477-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80477-0).

Webographie

National Library of Medicine – NCBI,
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

MNHN & OFB [Ed]. 2003-2022. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN),
Site web : <https://inpn.mnhn.fr>

Opie Benthos – Office pour les insectes et leur environnement,
Site web : http://www.opie-benthos.fr/opie/pages_dyna.php?idpage=515

ANNEXE

Annexe 1 : Détails de l'origine des échantillons *Baetis spp.* (*Baetis alpinus*, *Baetis rhodani* et *Baetis sp.*) sélectionnés pour l'analyse génétique et isotopique, en printemps 2021 par E. Jaulin et printemps 2022 par U. Disdier

La plupart des échantillons analysés en génétique sont également analysés en isotopie. Si le nombre d'échantillons varie entre les deux analyses sur un même site, le nombre d'échantillons analysé en isotopie est indiqué entre parenthèses.

Sites échantillonnés		Uma Disdier				Emmanuel Jaulin				TOTAL global Génétique	TOTAL global Isotopie
		Echantillons analysés : en Génétique et (en Isotopie)				Echantillons analysés : en Génétique et (en Isotopie)					
Espèces identifiées		<i>B. alpinus</i>	<i>B. rhodani</i>	<i>Baetis sp.</i>	Sous-TOTAL	<i>B. alpinus</i>	<i>B. rhodani</i>	<i>Baetis sp.</i>	Sous-TOTAL		
OEUF	M1 / +875 m	-	17	4	21	1 (0)	15 (12)	3 (2)	19 (14)	40	35
	M4 / +575 m	1	19	1	21	-	18 (14)	-	18 (14)	39	35
	M7 / +425 m	3	15	3	21	5 (1)	17 (12)	2 (1)	24 (14)	45	35
	M10 / +275 m	1	11	1	13	7 (3)	26 (18)	4 (1)	37 (22)	50	35
	M12 / +175 m	-	13	2	15	-	31 (20)	3 (0)	34 (20)	49	35
	M15 / -125 m	2	7	7	16	8 (5)	16 (13)	1 (1)	25 (19)	41	35
	M17 / -225 m	1	12	2	15	-	21 (17)	4 (3)	25 (20)	40	35
	M19 / -325 m	3	10	6	19	2 (2)	13 (12)	1 (0)	16 (14)	35	33
	M21 / -425 m	-	1	2	3	1 (0)	15 (14)	1 (0)	17 (14)	20	17
	M24 / -725 m	7	8	6	21	4 (3)	15 (11)	1 (0)	20 (14)	41	35
	Aval cascade	2	4	1	7	-	-	-	-	7	7
	Cascade	1	4	12	17	-	-	-	-	17	17
TOTAL		21	121	47	189	28 (14)	187 (143)	20 (8)	235 (165)	424	354
ADULTES	M1 / +875 m	36	52	7	95	-	33	-	33	128	128
	M3 / +675 m	-	-	2	2	-	-	-	-	2	2
	M4 / +575 m	4	2	-	6	1	8	-	9	15	15
	M5 / +525 m	-	2	-	2	-	-	-	-	2	2
	M7 / +425 m	3	3	3	9	-	-	-	-	9	9
	M9 / +325 m	1	-	1	2	-	-	-	-	2	2
	M10 / +275 m	22	8	8	38	7	4	-	11	49	49
	M11 / +225 m	-	1	1	2	2	2	-	4	6	6
	M12 / +175 m	3	4	6	13	1	5	-	6	19	19
	M13 / -25 m	-	2	3	5	-	-	-	-	5	5
	M15 / -125 m	18	2	21	41	6	6	1 (0)	13 (12)	54	53
	M16 / -175 m	1	-	2	3	3	2	-	5	8	8
	M17 / -225 m	20	5	8 (10)	33 (35)	4	12	-	16	49	51
	M18 / -275 m	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1
	M19 / -325 m	11	4	3	18	-	6	-	6	24	24
	M21 / -425 m	31	16	14	61	4	-	1 (0)	5 (4)	66	65
	M22 / -525 m	-	1	-	1	-	-	-	-	1	1
	M23 / -625 m	2	1	-	3	-	-	-	-	3	3
M24 / -725 m	4	5	-	9	-	1 (1)	-	1 (1)	10	10	
Cascade	12	22	1 (19)	35 (53)	-	-	-	-	35	53	
TOTAL		168	130	81 (101)	379 (399)	28	79	2 (0)	109 (107)	488	506

Annexe 2 : Séquences utilisées pour réaliser l'arbre phylogénétique

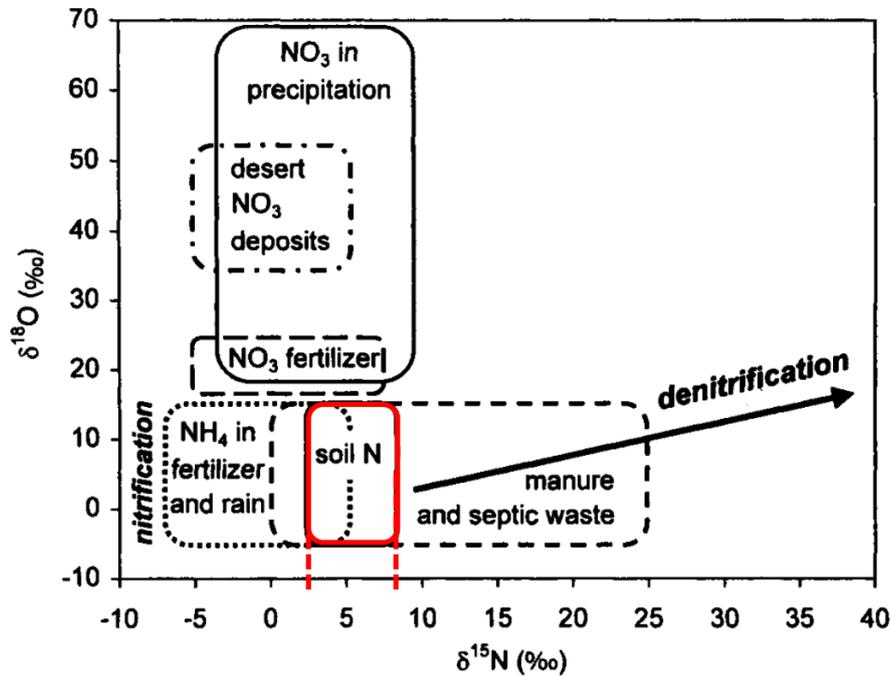
L'ensemble des séquences sont récupérées sur GenBank, à l'exception des séquences de *B. nubecularis* (*). Ces séquences ne sont pas encore publiées et ont été prêtées par Jean-Luc Gattolliat (Museum Lausanne). L'identifiant correspond à celui de l'étude.

	Espèce	Origine	GenBank_Id
Taxon Baetis	<i>B. liebenauae</i>	Finlande	MZ628350.1
			MZ626088.1
		Allemagne	HQ563191.1
			HQ563190.1
	<i>B. alpinus</i>	Suisse	LT546424.1
			LT546423.1
		Allemagne	HQ563184.1
			HQ563183.1
		Italie	LN734691.1
	LN734690.1		
	<i>B. buceratus</i>	Allemagne	HQ563187.1
			HQ563186.1
	<i>B. fuscatus</i>	Allemagne	MW459829.1
			MW459754.1
	<i>B. lutheri</i>	Allemagne	MW459928.1
			MW459688.1
		Italie	LN734686.1
			LN734685.1
	<i>B. melanonyx</i>	Allemagne	HQ563194.1
			HQ563193.1
		Suisse	LT546427.1
			LT546425.1
			LT546426.1
<i>B. pavidus</i>	NA	MF783534.1	
<i>B. rhodani</i>	Allemagne	MW459959.1	
		MW459950.1	
	Finlande	MZ628638.1	
		MZ625575.1	
	Norvège	JN299083.1	
		JN299082.1	
	Royaume-Uni	GU812339.1	
		GU812337.1	
<i>B. scambus</i>	Allemagne	HQ563201.1	
		HM421997.1	
	France	MF458627.1	
<i>B. vardarensis</i>	Allemagne	MW459843.1	
		MW459807.1	
<i>B. vernus</i>	République Tchèque	GU727850.1	
		GU727849.1	
	Allemagne	HQ563203.1	
		Finlande	AM494687.1
		AM494686.1	
<i>B. nubecularis</i>	NA	* CH051_SR21H09	
		* CH041_SR21F04	
		* CH041_SR21F05	
		* CH051_SR21H08	
Outgroup	Takobia muticus	Allemagne	MW459535.1

Annexe 3 : Intervalle de signature isotopique en $\delta^{18}\text{O}$ et en $\delta^{15}\text{N}$ au sein de différentes sources.

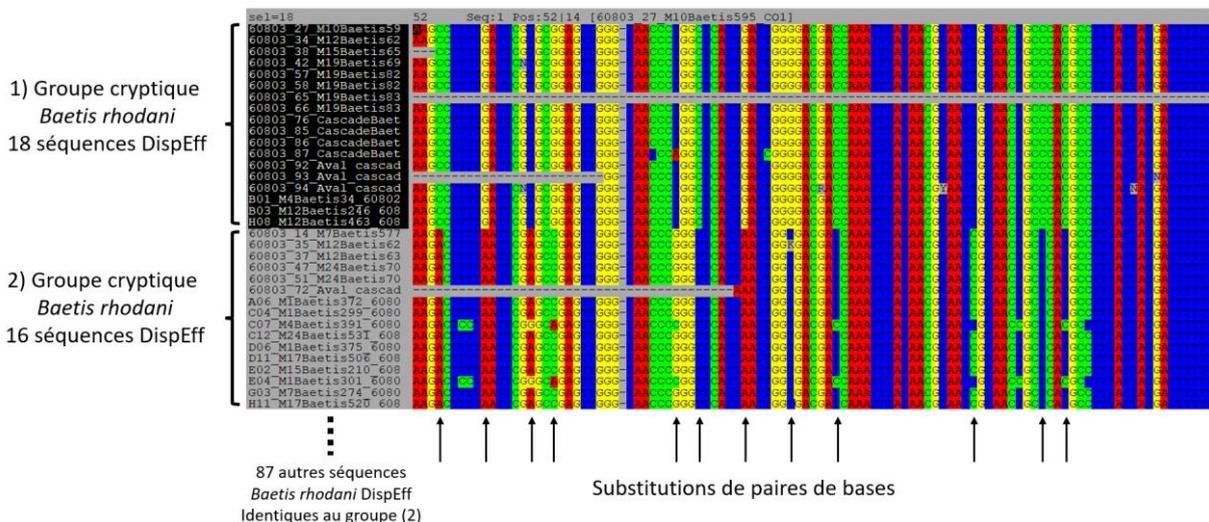
La valeur d'intérêt ici est l'intervalle de signature isotopique naturelle en $\delta^{15}\text{N}$ dans le sol : comprise entre 2 et 8 ‰.

Source modifiée : (Kendall, 1998)



Annexe 4 : Comparaison d'une section du gène COI entre des masses d'œufs *B. rhodani* issus de deux groupes cryptiques.

Alignement par clustalo sur le logiciel Seaview. Les séquences de masses d'œufs surlignées appartiennent aux groupes cryptiques le plus petit observé dans l'arbre phylogénétique (Figure 7). Des substitutions de bases sont observées à différents sites, indiquées par des flèches noires.



Résumé

Le processus de dispersion est très important chez les insectes pour coloniser de nouveaux espaces, mais reste peu étudié chez certaines espèces aquatiques présentant un cycle de vie complexe (phase aquatique et aérienne) (Nathan, 2001). Dans le cadre des projets DispEff/RBioll, un enrichissement du réseau trophique en isotope lourd ^{15}N suivi d'un échantillonnage, a été mis en place sur le cours d'eau du Buizin, dans l'Ain, afin d'estimer les distances de dispersion de différentes espèces d'insectes aquatiques.

Les éphémères du genre *Baetis* ont été utilisées comme organisme d'étude, pour leur facilité d'identification au stade adulte (Studemann et al., 1992) et de masses d'œufs (Jaulin, 2021). Les échantillons de *Baetis spp.* (adultes et œufs) ont été analysés en génétique permettant d'identifier les espèces *Baetis alpinus* et *Baetis rhodani*. Les échantillons ont ensuite été analysés en isotopie (EA-IRMS) afin de déterminer leur signature isotopique en ^{15}N . Pour la première fois, un maintien de la signature isotopique « artificielle » (i.e. marquée en ^{15}N) a été retrouvée sur des masses d'œufs déposées par des adultes eux-mêmes marqués.

Par ailleurs, différents seuils de signature en $\delta^{15}\text{N}$ ont été testés pour étudier l'influence sur l'estimation des distances parcourues. Pour un seuil de 48 ‰, les distances de dispersion estimées à partir des adultes capturés *Baetis spp.* étaient de 1 200 m en amont et 495 m en aval. L'estimation des distances de dispersion à partir des masses d'œufs *Baetis spp.* était de 1 200 m en amont et 45 m en aval. De manière générale, les deux espèces de *Baetis* détectées ne présentent pas de variabilité significative dans leur patrons dispersion sur le site d'étude.

Enfin, des masses d'œufs morphologiquement différentes des masses d'œufs du genre *Baetis*, ont également été analysées génétiquement afin d'observer la diversité des espèces présentes sur le Buizin.

Mots-clés : *Barcoding – Isotope stable – Masses d'œufs – ^{15}N – Vol d'insecte*

Abstract

Dispersal process is a very important mechanism for new habitat colonization and the survival of populations. It remains not well studied especially for some species of aquatic insects, with a complex life cycle (aquatic and aerial phases) (Nathan, 2001). For the projects DispEff/RBioll, an enrichment in ^{15}N isotope was realized and followed by a sampling of insects on the Buizin river, in the Ain, to assess dispersal distances of insects.

Mayflies of the genus *Baetis* were used as study organisms, because of their easy identification at the adult stage (Studemann et al., 1992) and egg masses (Jaulin, 2021). These samples (adults and eggs) were first analyzed in genetics. The species *Baetis alpinus* and *Baetis rhodani* were observed. An isotopic analysis (EA-IRMS) was then realized on adults and egg samples, to determine their ^{15}N isotopic signature. For the first time, a maintenance of the ^{15}N isotopic signature was found on egg masses deposited by marked adults.

In addition, different $\delta^{15}\text{N}$ signature thresholds were studied to study its influence on the estimation of dispersal distances. For a $\delta^{15}\text{N}$ threshold of 48 ‰, estimated dispersal distances from captured *Baetis spp.* adults were 1 200 m upstream and 495 m downstream. Estimated dispersal distances from egg masses of *Baetis spp.* were 1 200 m upstream and 45 m downstream. The two observed species of *Baetis* did not show any variability in their dispersion on the study site.

Furthermore, egg masses morphologically different from the egg masses of the genus *Baetis*, are also analyzed genetically to observe the diversity of species present in the Buizin river.

Keywords : *Barcoding – Stable isotope – Egg masses – ^{15}N – Insect flight*