



HAL
open science

Bases de références génétiques et études pilotes pour l'inventaire des Téléostéens, Batraciens, Odonates, Écrevisses et Bivalves par l'ADN environnemental

Pauline Jean, Nicolas Poulet, Alice Valentini, Jean-Marc Baudoin, Nicolas Roset, Vincent Prié, Tony Dejean

► To cite this version:

Pauline Jean, Nicolas Poulet, Alice Valentini, Jean-Marc Baudoin, Nicolas Roset, et al.. Bases de références génétiques et études pilotes pour l'inventaire des Téléostéens, Batraciens, Odonates, Écrevisses et Bivalves par l'ADN environnemental. Spygen; AFB - Agence française pour la biodiversité. 2018. hal-04360046

HAL Id: hal-04360046

<https://hal.inrae.fr/hal-04360046v1>

Submitted on 21 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ

ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT

RAPPORT D'ETUDE

Bases de références génétiques et études pilotes pour l'inventaire des Téléostéens, Batraciens, Odonates, Écrevisses et Bivalves par l'ADN environnemental

*Pauline Jean, Alice Valentini, Nicolas Poulet, Jean-Marc Baudoin,
Nicolas Roset, Vincent Prié, Tony Dejean - Décembre 2018*



TABLE DES MATIERES

1	Introduction.....	3
2	La méthode ADNe.....	4
2.1	Echantillonnage ADNe.....	4
2.2	Analyse ADNe.....	6
2.3	Constitution des bases de références.....	6
2.4	Laboratoires ADNe.....	6
3	Téléostéens.....	7
3.1	Base de références Téléostéens.....	7
3.2	Etudes pilotes pour les Téléostéens.....	10
3.2.1	Validation de l'approche ADNe metabarcoding pour les espèces de Téléostéens.....	10
3.2.2	Etudes comparatives entre l'approche ADNe metabarcoding et les méthodes traditionnelles pour les inventaires des Téléostéens en grands milieux stagnants.....	12
3.2.3	Etudes comparatives entre l'approche ADNe metabarcoding et les méthodes traditionnelles pour les inventaires des Téléostéens en cours d'eau.....	14
3.2.4	Etudes sur la distance de détection de l'ADNe en cours d'eau.....	16
3.2.5	Influence de l'effort d'échantillonnage sur la détection des Téléostéens en cours d'eau ..	17
3.2.6	Détection des espèces de Téléostéens au cours de l'année en milieu aquatique courant .	18
3.2.7	Mise en place opérationnelle de la méthode ADNe par les agents de l'AFB.....	19
3.2.8	Conclusion pour les Téléostéens.....	24
4	Batraciens.....	25
4.1	Base de références Batraciens.....	25
4.2	Etudes pilotes pour les Batraciens.....	27
4.2.1	Validation de l'approche ADNe metabarcoding pour les espèces de Batraciens.....	27
4.2.2	Distinctions d'espèces au sein des genres <i>Bufo</i> et <i>Pelophylax</i>	28
4.3	Conclusion sur les Batraciens.....	30
5	Odonates.....	30
5.1	Base de références Odonates.....	30
5.2	Etude de faisabilité pour la détection des Odonates par l'ADNe - détectabilité en fonction de la période d'échantillonnage.....	33
5.3	Conclusion pour les Odonates.....	35
6	Ecrevisses.....	35
6.1	Base de références Ecrevisses.....	35
6.2	Etude pilote pour les Ecrevisses.....	36
6.3	Conclusion pour les Ecrevisses.....	40
7	Bivalves.....	40
7.1	Base de références Bivalves.....	41
7.2	Etudes pilotes pour les Bivalves.....	42
7.2.1	Etudes comparatives sur des cours d'eau français.....	42

7.2.2	Détection des espèces de Bivalves sur l'année	44
7.2.3	Distance de détection du signal ADN des Bivalves.....	45
7.3	Conclusion sur les Bivalves	46
8	Conclusion générale	47
9	Publications scientifiques liées à ce programme.....	48
10	Autres références bibliographiques	49
11	Annexes	49

1 INTRODUCTION

Dans le contexte actuel de changement global, la connaissance et la préservation de la biodiversité sont devenus un enjeu essentiel. Cet enjeu est plus particulièrement crucial pour les milieux aquatiques continentaux dans la mesure où ils abritent une diversité d'espèces très importante (près d'1/3 des vertébrés connus) et dans le même temps subissent des pressions anthropiques multiples.

La connaissance de la biodiversité aquatique pose de nombreux problèmes en raison notamment des difficultés d'échantillonnage des espèces dans ce type de milieux. Il est en effet compliqué de détecter des espèces rares ou morphologiquement proches avec les techniques actuelles d'inventaire, et ces méthodes peuvent avoir un impact sur la survie des individus capturés, ce qui est particulièrement problématique dans le cas d'espèces patrimoniales.

De nouvelles méthodes non invasives basées sur la détection de l'ADN libéré par les espèces dans leur milieu (appelé ADN environnemental ou ADNe) ont vu le jour récemment afin d'aider les gestionnaires de l'environnement et les chercheurs à l'acquisition de connaissances sur la biodiversité aquatique. Cette approche a été testée pour la première fois sur des Vertébrés pour la détection d'une espèce d'Amphibiens envahissante, la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*) dans le Sud-Ouest de la France (Ficetola *et al.* 2008). En 2012, une étude comparative (ADNe vs inventaire classique) a été réalisée à grande échelle (49 sites) et a permis de démontrer les performances de détection de cette nouvelle méthode (Dejean *et al.* 2012). Depuis, cette technique a été appliquée avec succès pour le suivi de différentes espèces de vertébrés rares ou invasives (par exemple Biggs *et al.* 2015, Secondi *et al.* 2016).

SPYGEN est une entreprise à mission qui a pour objectif d'améliorer le suivi et la conservation de la biodiversité à l'échelle mondiale grâce à l'étude de l'ADN environnemental. Depuis sa création en 2011, SPYGEN mène de nombreux travaux de recherche visant à développer la méthode de l'ADN environnemental (ADNe) pour des inventaires spécifiques (ADNe barcoding, visant une espèce cible) et le suivi de groupes taxonomiques à enjeux (ADNe metabarcoding, inventaire de l'ensemble des espèces d'un groupe taxonomique donné).

En 2014, une convention a été mise en place entre SPYGEN et l'AFB afin d'évaluer le potentiel des méthodes ADNe metabarcoding pour le suivi opérationnel de la biodiversité aquatique. Pour cela, deux étapes clés ont été définies : l'établissement de bases de références moléculaires et des tests *in situ* pour cinq groupes taxonomiques (les Téléostéens, les Batraciens, les Odonates, les Bivalves et le Zooplancton). Après discussions entre l'AFB et SPYGEN, le Zooplancton a été remplacé par les Ecrevisses et un avenant à la convention a été signé en 2016 afin d'ajouter une phase de tests de la méthode par les utilisateurs finaux, à savoir des agents de l'AFB.

Plusieurs rapports ont été rendus dans le cadre de cette convention afin de faire part à l'AFB des avancées réalisées sur les bases de références et les tests *in situ*. La première année de ce programme a été principalement consacrée au développement des bases de références génétiques pour les Batraciens, les Téléostéens et les Odonates. La deuxième année a permis de compléter les bases de références et de réaliser des tests de détection *in situ* pour ces trois groupes taxonomiques ainsi que pour les Bivalves. Au cours de l'année 2016-2017, les bases de références pour les Bivalves, les Ecrevisses et les Téléostéens ont été complétées et de nouveaux tests *in situ* ont été réalisés par des agents de l'AFB. L'année 2018 a permis de finaliser la phase de tests avec les utilisateurs finaux. Le présent rapport commence par une brève explication de la méthode et des laboratoires nécessaires à ce type d'analyse puis reprend toutes les avancées de la méthode menées dans le cadre de cette convention depuis 2014 (bases de références moléculaires et tests *in situ* pour chaque groupe taxonomique).

2 LA METHODE ADNE

L'ADN environnemental (ADNe) est défini comme étant l'ADN pouvant être extrait à partir d'échantillons environnementaux tels que le sol, l'eau ou l'air, sans avoir besoin d'isoler au préalable des individus cibles (Taberlet *et al.* 2018). Il est caractérisé par un mélange complexe d'ADN nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique provenant de différents organismes. Il peut être libéré par ces organismes dans l'environnement sous forme de fèces, poils, urine, peau, gamètes, etc., et peut se trouver sous forme intracellulaire (contenu dans des cellules vivantes) ou extracellulaire.

A ce jour, deux approches principales permettent de travailler à partir de l'ADN environnemental :

- Une approche spécifique, permettant de détecter une espèce cible (espèce rare, cryptique, menacée ou invasive),
- Une approche multispécifique, visant à détecter l'ensemble des espèces d'un ou de plusieurs groupes taxonomiques. Elle permet d'évaluer la biodiversité d'un milieu en identifiant la liste des organismes vivants dans le site échantillonné, sans a priori, grâce à l'utilisation de couples d'amorces universels. Il s'agit donc d'un outil de veille environnementale très performant (détection d'espèces exotiques, patrimoniales, etc.).

Seule l'approche multispécifique pour les Téléostéens, les Batraciens, les Odonates, les Bivalves et les Ecrevisses est développée dans la suite de ce rapport.

Les méthodes d'échantillonnage et d'analyse ont été amenées à évoluer au cours de la convention et seuls les protocoles optimisés sont décrits dans les paragraphes suivants.

2.1 ECHANTILLONNAGE ADNE

L'échantillonnage ADNe doit être réalisé par du personnel qualifié. Les partenaires qui ont participé aux différentes études menées dans le cadre de ce programme ont été préalablement formés à la réalisation de cet échantillonnage.

Les prélèvements sont effectués dans les habitats les plus favorables pour les espèces recherchées et lorsque celles-ci sont les plus actives et libèrent un maximum d'ADN dans leur environnement (par exemple pendant la période de reproduction ; des études plus poussées ont été réalisées pour certains groupes taxonomiques et sont détaillées ci-après). L'ADNe se dégrade au cours du temps et a une durée de vie d'environ 15 jours (tests réalisés en milieux aquatiques stagnants, Dejean *et al.* 2011).

➤ Les milieux aquatiques stagnants

Le protocole d'échantillonnage adapté à des sites inférieurs à 1 ha consiste à prélever 20 échantillons d'eau de 100 mL à l'aide d'une louche à usage unique tout autour du milieu étudié et de les rassembler dans un sachet stérile. Cette eau est ensuite prélevée à l'aide d'une seringue stérile, puis passée à travers une capsule de filtration (porosité 0.45 µm - stérile). Un tampon de conservation est ajouté dans la capsule, puis elle est fermée, agitée vigoureusement et stockée à température ambiante et à l'abri des UV avant d'être renvoyée au laboratoire pour analyse (Figure 1).

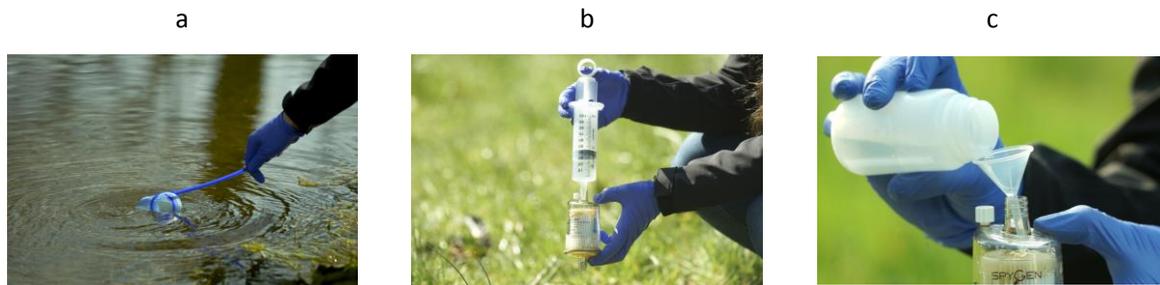


Figure 1 : Protocole d'échantillonnage en milieu aquatique stagnant consistant à (a) prélever 20 échantillons d'eau à l'aide d'une louche, (b) filtrer l'eau prélevée à travers une capsule de filtration et (c) remplir la capsule avec un tampon de conservation.

Pour des sites supérieurs à 1ha, il est préconisé d'utiliser plusieurs kits d'échantillonnage ou une méthode de filtration continue. La méthode de filtration continue nécessite la mise à l'eau d'une embarcation. La filtration est faite directement à partir de cette embarcation, à l'aide d'une pompe péristaltique ainsi que d'un tuyau et d'une capsule de filtration à usage unique. Chaque filtration, d'une durée de 30 minutes, est effectuée en amont de l'embarcation, en longeant les berges. Leur nombre est dépendant du périmètre de l'étang (environ 2 km pour une filtration). Lorsque le plan d'eau est peu profond, il est également conseillé de réaliser une filtration supplémentaire sur un transect central. La capsule de filtration est ensuite traitée de la même façon que précédemment puis renvoyée pour analyse au laboratoire.

➤ Les milieux aquatiques courants

Les prélèvements doivent être réalisés systématiquement à l'aval de la zone étudiée. L'ADN retenu dans ces prélèvements reflète la présence des espèces sur une certaine distance en amont (cf. 3.2.4). Le protocole d'échantillonnage consiste à filtrer de l'eau dans deux échantillons distincts dans la veine d'eau principale du cours d'eau pendant 30 minutes (environ 1L/min par échantillon) à l'aide d'une pompe péristaltique. L'eau est aspirée dans un tuyau avant de passer à travers une capsule de filtration (Figure 2). Comme pour les milieux stagnants, la capsule de filtration est ensuite remplie d'un tampon de conservation, fermée, agitée puis conservée à température ambiante avant d'être envoyée au laboratoire pour analyse.

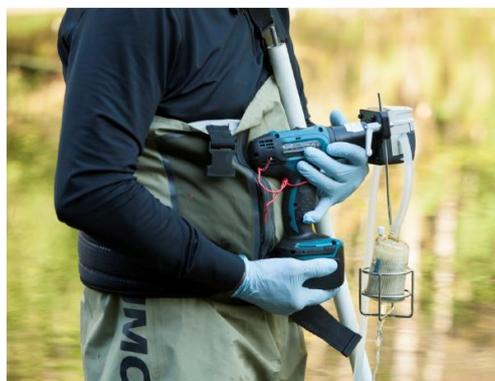


Figure 2 : Protocole d'échantillonnage en milieu aquatique courant consistant à filtrer de l'eau à travers une capsule de filtration à l'aide d'une pompe péristaltique ; ©AFB.

2.2 ANALYSE ADNE

L'ADN est extrait à partir de la capsule de filtration utilisée sur le terrain puis amplifié par PCR à l'aide d'un couple d'amorces universel pour le groupe taxonomique recherché. Pour chaque échantillon, 12 réplicats PCR sont réalisés. Les ADN amplifiés sont ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération puis les séquences obtenues sont analysées grâce à des outils bio-informatiques et comparées aux bases de références développées dans le cadre de cette convention et à celle publique de GenBank[®]. Le fichier final contient le nom des taxons identifiés et le nombre de séquences ADN associées pour chaque échantillon. Des contrôles négatifs sont effectués simultanément, à chaque étape du protocole d'analyse, afin de contrôler la pureté des consommables utilisés et de mettre en évidence une possible contamination croisée au cours de la manipulation. Le protocole détaillé est présenté dans les publications de Valentini *et al.* 2016, Civade *et al.* 2016 ainsi que Pont *et al.* 2018.

2.3 CONSTITUTION DES BASES DE REFERENCES

La mise en place de bases de références génétiques par groupe taxonomique est une étape essentielle dans le développement d'approches ADNe metabarcoding. L'utilisation d'une base de données de références locale et exhaustive sur le territoire étudié permet de pallier aux problèmes liés aux bases de données publiques de GenBank[®], à savoir le manque de séquences pour la région génétique ciblée, la diminution de la résolution taxonomique due à des séquences d'espèces non présentes sur le territoire étudié ainsi que des possibles erreurs de séquençage et d'identification des espèces (Valentini *et al.* 2016).

Afin de construire les bases de références pour chaque groupe taxonomique étudié, des tissus de toutes les espèces connues en France ont été prélevés par des spécialistes (lorsque cela était possible) puis envoyés à SPYGEN pour analyse. L'ADN a été extrait à partir des nageoires chez les Téléostéens, du muscle de la patte chez les Batraciens, de l'intérieur des pinces chez les Ecrevisses, des muscles du thorax chez les Odonates et des tissus pour les Bivalves. L'ADN a ensuite été amplifié, puis les produits PCR ont été purifiés et séquencés à l'aide de la technologie Sanger. Les séquences ont ensuite été analysées puis implémentées dans les bases de références créées par groupe taxonomique. Le protocole détaillé utilisé pour les Batraciens et les Téléostéens est présenté dans la publication de Valentini *et al.* 2016.

2.4 LABORATOIRES ADNE

Il est crucial que les laboratoires utilisés pour réaliser les analyses ADNe soient adaptés pour traiter des échantillons environnementaux contenant de l'ADN rare ou dégradé. Les laboratoires de SPYGEN ont été créés spécifiquement pour l'analyse de cet ADN rare et offrent un environnement de type « salle blanche » permettant d'éviter les contaminations extérieures et entre échantillons. Ils sont composés de 5 salles d'analyses correspondant chacune à un niveau de rareté d'ADN différent. Ces salles sont réparties en 3 blocs : ADN rare (équipé d'un sas d'entrée – préparation des kits d'échantillonnage, extraction à partir d'échantillons d'eau), ADN classique (extraction à partir de tissus) et ADN amplifié (Figure 3).

Pour éviter toute contamination, les personnes responsables des analyses doivent respecter un ordre de passage dans les blocs (Bloc 1 → Bloc 2 → Bloc 3 et jamais l'inverse) et doivent porter un équipement adapté (combinaison, gants, masque, charlotte et surchaussures à usage unique). De plus, les salles sont équipées de pressions différentielles (positives pour les salles d'extraction d'ADN rare, nulle pour la salle ADN classique, négative pour la salle d'amplification), d'un renouvellement d'air fréquent et d'un traitement UV.



Figure 3 : Les différences salles d'analyse des laboratoires SPYGEN.

3 TELEOSTEENS

Dans le cadre de ce programme, les premiers développements en ADNé metabarcoding ont été réalisés sur les Téléostéens. Compte tenu du nombre important de connaissances déjà acquises sur la répartition de ces espèces ainsi que de leur biologie et leur distribution ubiquiste, les Téléostéens représentent un bon indicateur de la qualité des milieux aquatiques, et se trouve être ainsi un bon sujet d'études pour tester la méthode ADNé. De plus, de réels enjeux de conservation sont connus pour ce groupe avec par exemple les difficultés de détection d'espèces rares comme l'Apron du Rhône ou la Loche d'étang. L'objectif était donc de tester si l'ADNe pouvait apporter une complémentarité aux méthodes d'inventaires classiques, notamment dans les grands milieux où la détectabilité est parfois compliquée et où les méthodes peuvent être invasives.

Les études sur les Téléostéens ont été menées en collaboration avec de nombreux partenaires, dont notamment l'AFB, le MNHN, le LECA, IRSTEA, l'association ODONAT, l'agence de l'eau Rhin-Meuse, la CNR et EDF. Les bases de références pour les Téléostéens ont été construites en parallèle des différentes études effectuées, à savoir ; la validation des amorces, les tests d'effort et de période d'échantillonnage, l'identification des distances de détection et les comparaisons entre ADNé et inventaires classiques.

3.1 BASE DE REFERENCES TELEOSTEENS

Le Tableau I fait une synthèse des espèces de Téléostéens pour lesquels des tissus sont actuellement présents dans la base de références. Sur les 120 espèces présentes en France (Nicolas Poulet, comm. pers.), 99 ont à l'heure actuelle été séquencées par SPYGEN. Une liste détaillée indiquant notamment les 120 espèces présentes en France et les tissus actuellement manquants est disponible en Annexe 1.

A ce jour, certains taxons ne sont pas différenciables avec le couple d'amorces utilisé pour les Téléostéens :

- *Alosa sp.* : *Alosa alosa* ou *Alosa fallax*,
- *Carassius sp.* : *Carassius auratus*, *Carassius carassius* ou *Carassius gibelio*,
- *Cottus sp.* : *Cottus aturi*, *Cottus gobio*, *Cottus hispaniolensis*, *Cottus perifretum*, *Cottus petiti* ou *Cottus rhenanus*,

- Cyprinidae - Complexe 1 : *Chondrostoma nasus*, *Parachondrostoma toxostoma* ou *Telestes souffia*,
- Cyprinidae - Complexe 2 : *Ctenopharyngodon idella* ou *Hypophthalmichthys molitrix*,
- *Gobio* sp. : *Gobio gobio*, *Gobio lozanoi* ou *Gobio occitaniae*,
- *Lampetra* sp. : *Lampetra fluviatilis* ou *Lampetra planeri*,
- *Leuciscus* sp. : *Leuciscus idus* ou *Leuciscus leuciscus*,
- *Phoxinus* sp. : *Phoxinus bigerri*, *Phoxinus phoxinus* ou *Phoxinus septimaniae*,
- *Salvelinus* sp. : *Salvelinus fontinalis* ou *Salvelinus alpinus*.

Un couple d'amorces complémentaire est en cours de développement pour améliorer la résolution taxonomique de certains de ces taxons (cf. 3.2.7).

Tableau I : Liste des espèces présentes dans la base de références ADNe-France Téléostéens.

Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Abramis brama</i>	Brème commune
<i>Acipenser baerii</i>	Esturgeon sibérien
<i>Acipenser ruthenus</i>	Esturgeon de Sibérie
<i>Acipenser sturio</i>	Esturgeon d'Europe
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	Spirilin
<i>Alburnus alburnus</i>	Ablette
<i>Alosa fallax</i>	Alose feinte
<i>Ambloplites rupestris</i>	Crapet de roche
<i>Ameiurus melas</i>	Poisson-chat
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguille européenne
<i>Aphanius fasciatus</i>	Aphanius de Corse
<i>Atherina boyeri</i>	Athérine
<i>Ballerus sapa</i>	Brème de Danube
<i>Barbatula barbatula</i>	Loche franche
<i>Barbatula quignardi</i>	Loche du Languedoc
<i>Barbus barbus</i>	Barbeau fluviatile
<i>Barbus meridionalis</i>	Barbeau méridional
<i>Blicca bjoerkna</i>	Brème bordelière
<i>Carassius auratus</i>	Carassin doré
<i>Carassius carassius</i>	Carassin commun
<i>Carassius gibelio</i>	Carassin argenté
<i>Chelon labrosus</i>	Mulet lippu
<i>Chondrostoma nasus</i>	Hotu
<i>Cobitis bilineata</i>	Loche italienne
<i>Cobitis taenia</i>	Loche de rivière
<i>Coregonus lavaretus</i>	Corégone
<i>Cottus aturi</i>	Chabot du Béarn
<i>Cottus gobio</i>	Chabot commun
<i>Cottus hispaniolensis</i>	Chabot des Pyrénées
<i>Cottus perifretum</i>	Chabot fluviatile
<i>Cottus petiti</i>	Chabot du Lez
<i>Cottus rhenanus</i>	Chabot du Rhin
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Amour blanc

Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bar
<i>Esox lucius</i>	Brochet
<i>Gambusia affinis</i>	Gambusie
<i>Gambusia holbrooki</i>	Gambusie
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Épinoche
<i>Gobio gobio</i>	Goujon
<i>Gobio lozanoi</i>	Goujon de l'Adour
<i>Gobio occitaniae</i>	Goujon du Languedoc
<i>Gymnocephalus cernuus</i>	Grémille
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Carpe argentée
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Carpe à grosse tête
<i>Ictalurus punctatus</i>	Barbue de rivière
<i>Lampetra fluviatilis</i>	Lamproie fluviatile
<i>Lampetra planeri</i>	Lamproie de Planer
<i>Lepomis gibbosus</i>	Perche-soleil
<i>Leucaspius delineatus</i>	Able de Heckel
<i>Leuciscus aspilus</i>	Aspe
<i>Leuciscus burdigalensis</i>	Vandoise rostrée
<i>Leuciscus idus</i>	Ide mélanote
<i>Leuciscus leuciscus</i>	Vandoise
<i>Liza aurata</i>	Mulet doré
<i>Liza ramada</i>	Mulet porc
<i>Lota lota</i>	Lote
<i>Micropterus salmoides</i>	Achigan à grande bouche
<i>Misgurnus fossilis</i>	Loche d'étang
<i>Mugil cephalus</i>	Mulet cabot
<i>Neogobius fulviatilis</i>	Gobie fluviatile
<i>Neogobius melanostomus</i>	Gobie à taches noires
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Saumon rose
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia du Nil
<i>Osmerus eperlanus</i>	Éperlan
<i>Pachychilon pictum</i>	Épirine lippue
<i>Parachondrostoma toxostoma</i>	Toxostome
<i>Perca fluviatilis</i>	Perche
<i>Petromyzon marinus</i>	Grande lamproie
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Vairon de l'Adour
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Vairon
<i>Phoxinus septimaniae</i>	Vairon du Languedoc
<i>Pimephales promelas</i>	Tête de boule
<i>Platichthys flesus</i>	Flet
<i>Ponticola kessleri</i>	Gobie de Kessler
<i>Proterorhinus semilunaris</i>	Gobie demi-lune
<i>Pseudorasbora parva</i>	Pseudorasbora
<i>Pungitius pungitius</i>	Épinochette
<i>Rhodeus amarus</i>	Bouvière
<i>Romanogobio belingi</i>	Goujon d'Ukraine
<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon

Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Salvia fluviatilis</i>	Blennie fluviatile
<i>Salmo salar</i>	Saumon atlantique
<i>Salmo trutta</i>	Truite commune
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Ombre de fontaine
<i>Salvelinus namaycush</i>	Ombre du Canada
<i>Salvelinus alpinus</i>	Ombre chevalier
<i>Sander lucioperca</i>	Sandre
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Rotengle
<i>Silurus glanis</i>	Silure glane
<i>Squalius cephalus</i>	Chevaine
<i>Squalius laietanus</i>	Chevaine catalan
<i>Telestes souffia</i>	Blageon
<i>Thymallus thymallus</i>	Ombre commun
<i>Tinca tinca</i>	Tanche
<i>Umbra pygmaea</i>	Petit poisson chien
<i>Vimba vimba</i>	Vimbe
<i>Zingel asper</i>	Apron du Rhône

3.2 ETUDES PILOTES POUR LES TELEOSTEENS

De nombreuses études ont été menées pour tester puis améliorer la détection des Téléostéens par l'ADNe en milieux aquatiques continentaux. Dans ce rapport sont présentées les premières validations de la méthode ainsi que les études ayant permis des avancées majeures sur cette détection.

La première validation de la méthode a été publiée en 2016 par Valentini *et al.*. Deux autres publications se sont succédées, l'une traitant de la représentativité spatiale de l'ADNe à l'échelle d'un lac et de son exutoire (Civade *et al.* 2016), l'autre basée sur l'étude des Téléostéens sur le gradient longitudinal d'un fleuve (Pont *et al.* 2018). Une étude a également été mise en place en 2017 avec des agents de l'AFB de façon à tester la mise en œuvre technique de la méthode et à comparer les résultats obtenus sur différents types de cours d'eau français avec ceux obtenus par des inventaires classiques.

En parallèle à ces différentes études, la période d'échantillonnage a été étudiée ainsi que l'effort d'échantillonnage nécessaire pour avoir des résultats fiables.

3.2.1 Validation de l'approche ADNe metabarcoding pour les espèces de Téléostéens

La validation de la méthode ADNe metabarcoding pour les Téléostéens a été publiée en même temps que celle pour les Batraciens, dans l'article de Valentini *et al.* 2016. Elle se décompose en trois étapes distinctes : les validations *in silico*, *in vitro* et *in situ*.

Les couples d'amorces universels pour les Téléostéens ont été créés à l'aide du logiciel ECOPRIMERS. Les tests *in silico* ont été réalisés bio-informatiquement avec le programme ECOPCR. Ce programme permet de mettre en évidence les séquences d'ADN présentes dans les bases de références génétiques publiques (GenBank®) qui peuvent être amplifiées par les couples d'amorces utilisés. Ces tests ont permis de démontrer que le couple d'amorces universel pour les Téléostéens possède une couverture taxonomique élevée (98.55% d'espèces présentes dans GenBank® au moment de l'étude peuvent être amplifiées) et est résolutif (cf. 3.1).

Afin de valider l'universalité du couple d'amorces développé, des tests *in vitro* ont été effectués en mélangeant l'ADN de l'ensemble des espèces de Téléostéens présentes dans la base de références. Ces ADN ont ensuite été amplifiés, séquencés à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération, puis analysés bio-informatiquement. Tous les ADN de Téléostéens ont pu être amplifiés, ce qui confirme leur universalité.

Pour les tests *in situ*, des études comparatives ont été menées sur un total de 22 sites correspondant à différents milieux aquatiques (mares, fossés, lacs, rivières, etc.). Sur chacun de ces sites, les résultats obtenus par l'approche ADNe ont été comparés aux résultats issus d'inventaires classiques (utilisation de verveux, de filets maillants ou de pêche électrique selon les sites). Les résultats ont permis de montrer une bonne détection des espèces de Téléostéens par l'ADNe. Le nombre d'espèces détectées en utilisant l'approche ADNe est pour 89 % des sites étudiés supérieur (47 % des sites) ou identique (42 % des sites) au nombre d'espèces détectées par les inventaires classiques (Figure 4). Les quatre sites utilisés comme contrôle ont permis de montrer qu'aucun faux positif n'était détecté avec cette approche.

La méthode ADNe présente ainsi de nombreux avantages pour la détection des Téléostéens : bonne détectabilité des espèces, faible effort d'échantillonnage, méthode non invasive. Elle reste toutefois complémentaire des méthodes d'inventaire classiques qui permettent d'obtenir des informations supplémentaires sur le nombre d'individus et leurs caractéristiques (taille, âge, sexe, etc.).

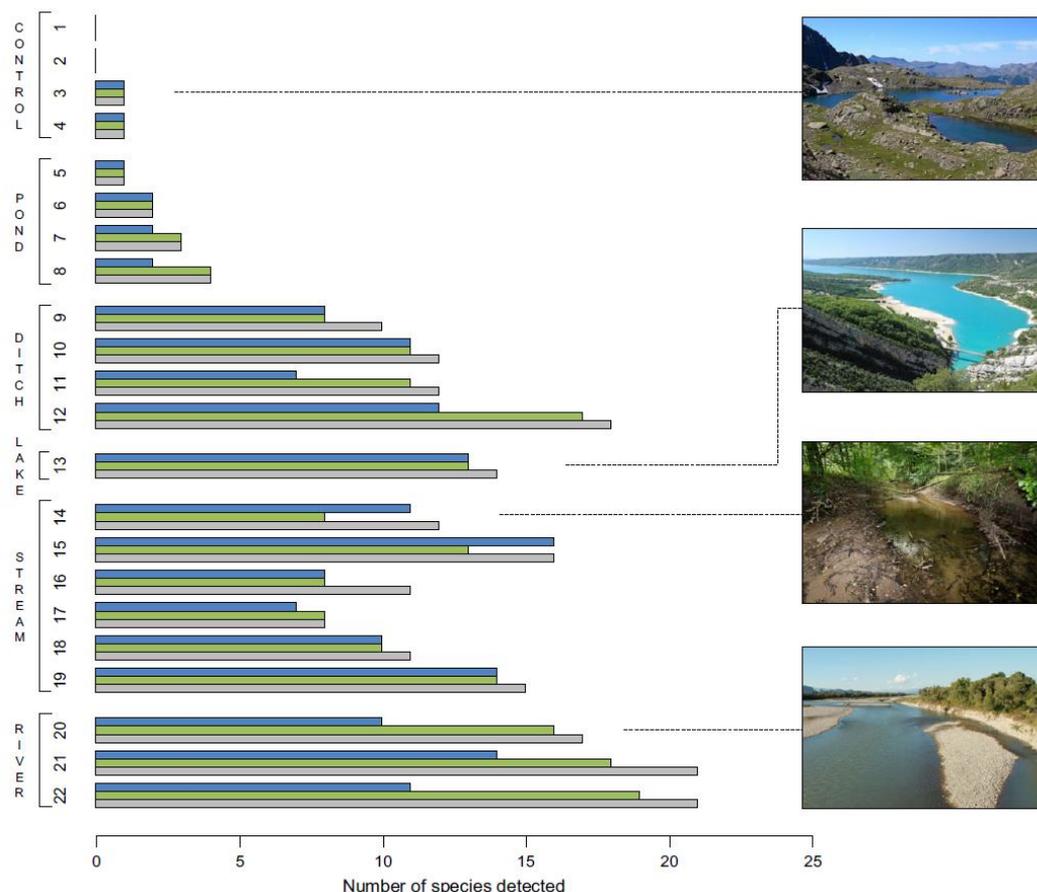


Figure 4 : Nombre d'espèces de Téléostéens détectées dans des écosystèmes d'eau douce d'après des données historiques (sites 1 à 4) et des inventaires traditionnels (sites 5 à 22), en bleu, et avec l'approche ADNe metabarcoding, en vert. Les barres grises présentent le nombre total d'espèces détectées en combinant les deux approches.

3.2.2 Etudes comparatives entre l'approche ADNe metabarcoding et les méthodes traditionnelles pour les inventaires des Téléostéens en grands milieux stagnants

Depuis 2013, des tests de l'approche ADNe metabarcoding sont effectués dans des grands milieux stagnants afin d'apprécier les performances de détection de cette méthode. A partir de 2014, un nouveau protocole d'échantillonnage a été testé sur le lac d'Aiguebelette (Civade *et al.* 2016), où une bonne correspondance a été observée entre les résultats ADNe et les inventaires classiques (21 espèces détectées par l'ADNe contre 13 avec les filets maillants posés en 2014 et 22 en comptant 7 campagnes menées avec les filets maillants entre 1995 et 2014). Ce protocole a par la suite été reproduit en 2015 sur le lac de Bimont, en collaboration avec l'équipe AFB-IRSTEA d'Aix-en-Provence puis en 2016 sur trois lacs du Nord-Est de la France en collaboration avec l'AFB et l'association ODONAT.

Sur le Lac de Bimont, l'échantillonnage ADNe a été réalisé le 19 Octobre 2015 : 6 filtrations d'eau de 30 minutes (1L/min) ont été effectuées à l'aide d'une pompe péristaltique ainsi que des tuyaux et capsules de filtration à usage unique (Figure 5). Les trois premières filtrations ont été réalisées tout autour du lac, en suivant les berges. La filtration 4 a été effectuée en surface, sur la transversale du lac. Pour la filtration 5, environ 5L d'eau ont été prélevés en profondeur à l'aide d'une bouteille de prélèvement, sur 5 points répartis sur la transversale. La filtration 6 a été réalisée directement dans le canal du Verdon de façon à contrôler les espèces présentes dans l'affluent et leur apport d'ADN potentiel dans le lac.



Figure 5 : Prélèvements ADNe réalisés sur le lac de Bimont ; les prélèvements 1, 2 et 3 ont été effectués tout autour du lac au niveau des berges - les prélèvements 4 et 5 ont été réalisés sur une transversale du lac, respectivement en surface et en profondeur - le prélèvement 6 a été effectué directement dans le Canal du Verdon, affluent du lac.

Suite aux prélèvements ADNe, 32 filets benthiques et 5 filets pélagiques ont été installés dans le lac. Les jours suivants, les filets ont été relevés et les poissons identifiés, pesés et mesurés. Les résultats ADNe ont également été comparés aux pêches de 2013 réalisées sur ce même lac à l'aide de 32 filets benthiques et 14 filets pélagiques.

Au total, 19 taxons ont été détectés dans le lac de Bimont par la méthode ADNe, contre 11 et 13 par les inventaires aux filets menés respectivement en 2013 et en 2015 (Tableau II). Toutes les espèces détectées par les pêches au filet en 2013 et en 2015 ont été détectées par la méthode ADNe. Les résultats ADNe ont également permis de mettre en évidence l'introduction de certaines espèces suite à des pêches de sauvetage réalisées dans la retenue du Barrage de Zola en 2014. Ainsi, l'Anguille (*Anguilla anguilla*), le Carassin (*Carassius sp.*) et la Tanche (*Tinca tinca*) sont trois espèces qui ont été introduites en 2014 et qui sont détectées par l'ADNe mais pas par les pêches aux filets en 2015.

Trois espèces ont été détectées par ADNe mais par aucun autre inventaire classique : le Chabot (*Cottus sp.*), la Gambusie (*Gambusia affinis*) et l'Ide mélanote ou la Vandoise (*Leuciscus sp.*). L'ADN de Chabot et de Gambusie peut potentiellement être amené par les affluents du lac (Canal du Verdon pour le Chabot et affluent secondaire au niveau de l'Anse de la Cause pour la Gambusie). En ce qui concerne « *Leuciscus sp.* », l'Ide mélanote est connue pour être utilisé comme appât par les pêcheurs, ce qui pourrait expliquer sa détection par l'ADNe.

Tableau II : Taxons détectés par la méthode ADNe en 2015 et par les pêches aux filets en 2015 et en 2013 ; la dernière colonne correspond aux espèces déversées dans le lac de Bimont suite aux pêches de sauvegarde réalisées dans la retenue du Barrage de Zola.

Taxon	Détecté par la méthode ADNe en 2015	Détecté par la pêche aux filets en 2015	Détecté par la pêche aux filets en 2013	Introduits dans le lac de Bimont en 2014
<i>Abramis brama</i>	X	X	X	
<i>Alburnus alburnus</i>	X	X	X	X
<i>Anguilla anguilla</i>	X			X
<i>Blicca bjoerkna</i>	X	X	X	
<i>Carassius sp.</i>	X			X
<i>Cottus sp.</i>	X			
<i>Cyprinus carpio</i>	X		X	X
<i>Esox lucius</i>	X	X	X	
<i>Gambusia affinis</i>	X			
<i>Gobio gobio</i>	X	X	X	
<i>Gymnocephalus cernuus</i>	X	X	X	X
<i>Lepomis gibbosus</i>	X		X	
<i>Leuciscus sp.</i>	X			
<i>Perca fluviatilis</i>	X	X	X	X
<i>Rutilus rutilus</i>	X	X	X	
<i>Sander lucioperca</i>	X	X	X	
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	X	X	X	X
<i>Squalius cephalus</i>	X	X	X	X
<i>Tinca tinca</i>	X			X

En 2016, 3 filtrations d'eau de 30 minutes ont été réalisées sur 3 lacs du Nord-Est de la France (Bouzey, Longemer et Michelbach) juste avant la pose de filets maillants (entre 2 et 4 nuits de pose selon le lac). Les résultats des deux méthodes ont été ensuite comparés. La méthode ADNe permet de bien identifier les peuplements piscicoles en place sur les 3 lacs et détecte même des espèces qui échappent aux filets maillants mais qui sont pourtant connues sur les sites d'après des observations visuelles ou des informations données par les pêcheurs locaux, comme la Tanche (*Tinca tinca*), le Silure (*Silurus glanis*) ou le Chabot (*Cottus sp.*). Sur le lac de Longemer, une des espèces détectées uniquement par l'ADNe, le Vairon (*Phoxinus sp.*), est présente dans le cours d'eau alimentant le lac, ce qui pose la question de la contribution des affluents dans l'ADN détecté en milieu stagnant.

Les résultats des études menées sur les 5 lacs sont compilés dans la Figure 6 et montrent que l'ADNe se révèle être une méthode adaptée pour inventorier les espèces piscicoles dans de grands milieux stagnants, même lorsqu'elles sont présentes en faible densité.

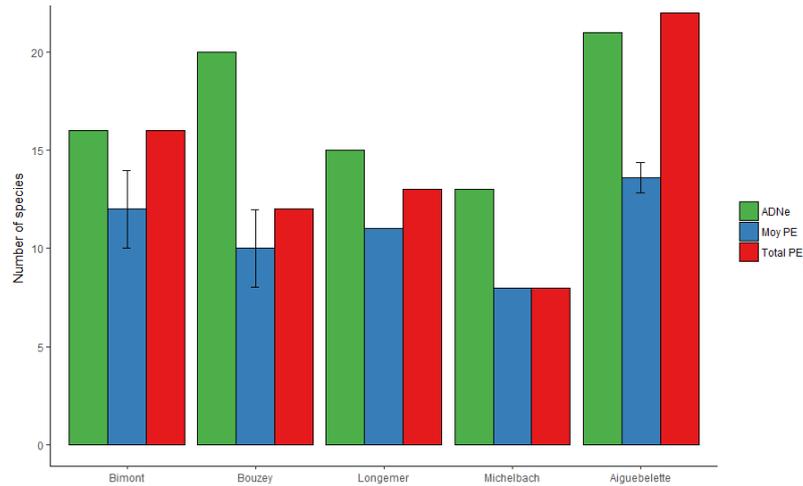


Figure 6 : Comparaison entre le nombre d'espèces détectées par l'ADNe (en vert), le nombre moyen d'espèces détectées par inventaires classiques (en bleu) et le nombre total d'espèces détectées par inventaires classiques (en rouge) pour les 5 lacs étudiés.

3.2.3 Etudes comparatives entre l'approche ADNe metabarcoding et les méthodes traditionnelles pour les inventaires des Téléostéens en cours d'eau

En 2016, une étude a été menée afin de tester le potentiel de l'ADNe pour décrire l'organisation spatiale des communautés de Téléostéens le long d'un gradient longitudinal, en prenant en compte un lac et son exutoire (Figure 7). Afin de pouvoir répondre à cette question, les résultats obtenus par des inventaires ADNe et des inventaires classiques réalisés à quelques jours d'intervalle sur le lac et plusieurs stations de la rivière ont été comparés. Les résultats ADNe ont par la suite également été comparés avec la liste cumulée des espèces détectées dans chaque écosystème au cours des 16 dernières années par les méthodes traditionnelles, avec l'objectif d'obtenir la liste la plus exhaustive possible sur les différents écosystèmes étudiés.

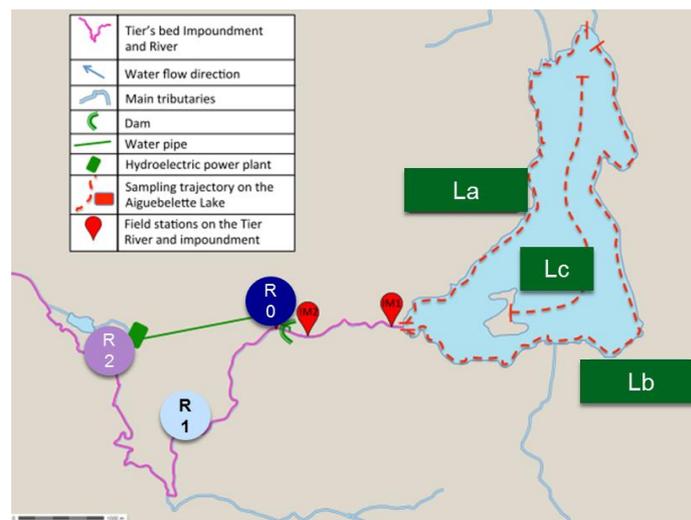


Figure 7 : Localisation des différents points de prélèvement le long d'un gradient longitudinal partant du lac d'Aiguebelette (stations notées en vert) et intégrant son déversoir naturel, le Tier (stations IM notées en rouge, puis R0 en bleu foncé, R1 en bleu clair et R2 en violet).

Dans cette étude, les résultats confirment que l'approche ADNe metabarcoding est plus efficace qu'une seule campagne d'inventaires traditionnels pour détecter la présence d'espèces, en particulier sur les stations du cours d'eau étudiées. Deuxièmement, la liste des espèces obtenue à l'aide de cette approche est comparable à celle obtenue en cumulant toutes les sessions d'échantillonnages traditionnels depuis 1995 et 1988 pour le lac et la rivière, respectivement.

Les résultats ADNe metabarcoding présentés dans l'analyse factorielle des correspondances (AFC) sur la Figure 8 montrent que la méthode ADNe permet de bien différencier l'écosystème lac (prélèvements La, Lb et Lc) de l'écosystème rivière (prélèvements R1 et R2). Une bonne correspondance a été observée entre la compilation de toutes les occurrences d'espèces détectées depuis 1988 à l'aide de méthodes d'échantillonnages traditionnels et les résultats ADNe metabarcoding décrivant l'organisation spatiale du gradient lentico-lotique.

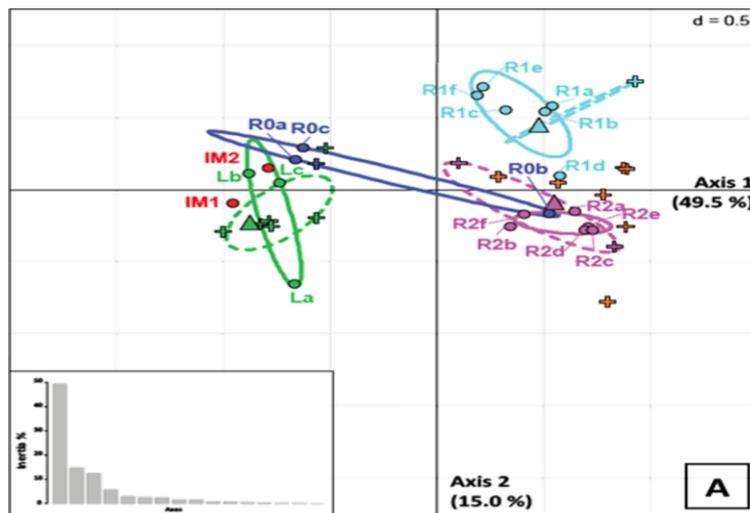


Figure 8 : Carte factorielle de l'analyse des correspondances basée sur l'ensemble de données ADNe et pêches. L'ADNe metabarcoding est représenté par des points avec le lac en vert (L), la retenue en rouge (IM1 et IM2), le Tier en bleu et violet (R0: bleu foncé, R1: bleu clair, R2 : violet). Les pêches traditionnelles ont été ajoutées comme éléments supplémentaires (croix pour les précédentes sessions de pêche et triangles pour les sessions de pêche simultanées en 2014).

Une deuxième étude comparative a été menée en 2016 le long du Rhône avec la Compagnie Nationale du Rhône (Pont *et al.* 2018). Dans cette étude, un des objectifs était de comparer les résultats ADNe metabarcoding avec des pêches électriques historiques menées à une échelle locale et à l'échelle du bassin versant du Rhône.

Des filtrations d'eau ont été réalisées sur 59 sites durant les mois d'Avril et de Mai 2016 (12 jours de terrain). Ces échantillons ont été analysés pour les Téléostéens puis comparés aux données des pêches historiques (entre 2006 et 2016 ; environ 300 jours de terrain) réalisées sur 40 sites par EDF et l'AFB. Des comparaisons ont ensuite été réalisées entre les résultats ADNe et les résultats des pêches sur 16 sections du Rhône.

Les résultats présentés dans la Figure 9 montrent que le nombre d'espèces détectées en 2016 par ADNe est nettement supérieur aux résultats obtenus par pêche électrique sur une année et est similaire au nombre total d'espèces identifiées sur 10 années de pêches. La méthode ADNe permet la détection de 4 espèces jamais référencées dans les inventaires de pêche et pourtant connues dans le bassin du Rhône : la Loche d'étang (*Misgurnus fossilis*), l'Apron du Rhône (*Zingel asper*), le Mulet lippu (*Chelon labrosus*) et le Mulet à grosse tête (*Mugil cephalus*). A contrario, la méthode ADNe détecte quatre espèces dont la présence est très peu probable sur le Rhône. Le Maigre (*Argyrosomus regius*) et le Saumon (*Salmo salar*)

sont deux espèces consommées dont l'ADN peut se retrouver dans l'eau suite à des rejets de stations d'épuration ; le genre *Salvelinus sp.* correspond à des espèces d'eaux froides plutôt retrouvées dans des lacs ou des ruisseaux et peut donc provenir d'affluents ou de lacs proches du Rhône ; et enfin la Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) peut être élevée en pisciculture au bord du Rhône ou être utilisée pour la pêche sportive.

Ces deux études comparatives montrent la performance de la méthode ADNe pour inventorier les espèces de Téléostéens et caractériser les communautés le long d'un gradient longitudinal.

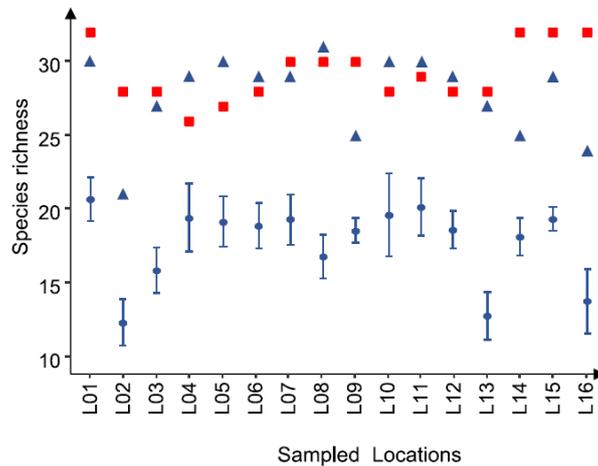


Figure 9 : Comparaison du nombre moyen d'espèces capturées annuellement par pêche électrique (rond bleu), du nombre total d'espèces capturées pendant l'enquête décennale (2006-2016 ; triangle bleu), et du nombre d'espèces détectées dans les échantillons ADNe (carrés rouges) pour chacun des 16 secteurs échantillonnés le long du Rhône avec les deux méthodes.

3.2.4 Etudes sur la distance de détection de l'ADNe en cours d'eau

La provenance de l'ADN est une des questions principales qui se pose dans les études basées sur l'ADNe. Cette question a été traitée pour la première fois en utilisant la méthode ADNe metabarcoding dans l'article de Civade *et al.* 2016 puis ensuite dans celui de Pont *et al.* 2018.

Dans l'étude de Civade *et al.* 2016, un des objectifs était de tester si l'ADN d'espèces présentes dans le lac d'Aiguebelette pouvait se retrouver dans des prélèvements réalisés en aval du lac, dans son unique exutoire le Tier. Pour cela, des filtrations d'eau ont été réalisées sur le lac (La, Lb, Lc - Figure 7), puis sur 5 stations du Tier : IM1 et IM2 entre le lac et le barrage puis R0, R1 et R2 à une distance de respectivement à 1.7, 3.6 et 6.9 km du lac.

Les résultats montrent que la méthode ADNe permet de bien différencier l'écosystème lac de l'écosystème rivière (Figure 8). Cependant, des espèces lacustres sont également détectées dans le cours d'eau. C'est le cas notamment du Corégone (*Coregonus lavaretus*) qui est présent uniquement dans le lac selon différents inventaires classiques menés historiquement et en parallèle des échantillonnages ADNe. Son ADN est pourtant détecté sur les stations IM et R0 (1.7 km en aval du lac) en plus de celles du lac.

Ces résultats montrent donc que la distance de détection dans ce contexte est de quelques kilomètres (entre 1.7 et 3.6). Cette valeur peut varier selon le cours d'eau étudié et les espèces recherchées car elle dépend en grande partie des caractéristiques hydrologiques du cours d'eau et de la quantité d'ADN « source » libérée dans le milieu (par exemple le Corégone fait partie des espèces majoritaires du lac donc son ADN peut être retrouvé plus l'aval qu'une espèce qui sera présente en faible densité dans le lac).

Le Corégone a également été pris en exemple pour simuler la distance de détection de l'ADNe sur le gradient longitudinal du Rhône dans l'étude de Pont *et al.* (2018). En effet, cette espèce est majoritairement présente dans trois lacs alpins du Haut-Rhône et sa présence directement dans le Rhône est considérée comme anecdotique par rapport à l'apport de ces lacs. Suite aux analyses, l'ADN du Corégone a été détecté jusqu'à 130 km à l'état de traces en aval de sa source.

Dans cet article, une simulation de la distance de détection de l'ADN a été faite avec des modèles pré-existants de transport des fines particules de matières organiques. La Figure 10 présente les simulations réalisées en fonction de la profondeur d'un cours d'eau et de son débit, pour une quantité d'ADN initiale donnée. Les résultats semblent être en cohérence avec les distances de détection précédemment données. Ainsi dans de petits cours d'eau, la distance de transport de l'ADN serait de l'ordre de quelques kilomètres, comme indiqué dans la publication de Civade *et al.* 2016. Plus le cours d'eau est grand, plus l'ADN est transporté vers l'aval, avec une distance de détection allant jusqu'à plusieurs dizaines de kilomètres, comme dans l'étude de Pont *et al.* 2018.

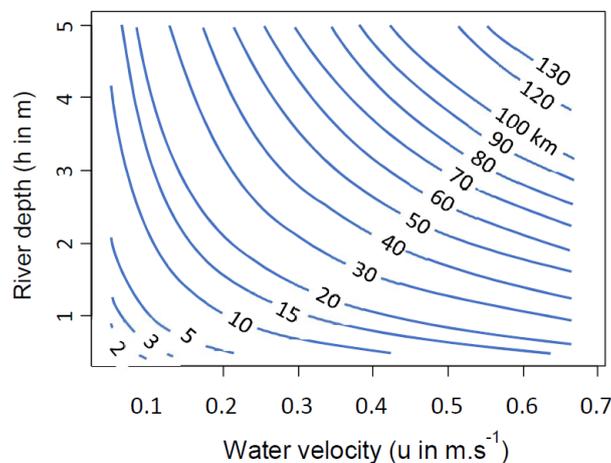


Figure 10 : Distance de détection de l'ADN en fonction de la profondeur du cours d'eau et de son débit.

Ainsi, en analysant non seulement l'occurrence des espèces, mais aussi leur abondance relative sur un gradient amont/aval, il est possible d'avoir une image correcte des structures d'assemblage des poissons dans un grand cours d'eau malgré le transport de leur ADN vers l'aval. En effet, une partie de l'ADN est adsorbée dans les sédiments lors de son transport, ce qui implique que les séquences d'ADN majoritaires obtenues sur une station correspondent principalement aux espèces présentes localement.

3.2.5 Influence de l'effort d'échantillonnage sur la détection des Téléostéens en cours d'eau

Une étude a été réalisée pour tester l'influence de l'effort d'échantillonnage sur la détection des Téléostéens en cours d'eau (Pont *et al.* 2018). Pour cela, 10 prélèvements successifs ont été effectués sur une station du Rhône en Septembre 2015.

Le nombre d'espèces varie selon les échantillons entre 26 et 30. La courbe d'accumulation réalisée à partir de ces résultats indique que deux échantillons sont suffisants pour détecter 96,9 % de la richesse spécifique, soit 29 espèces (Figure 11).

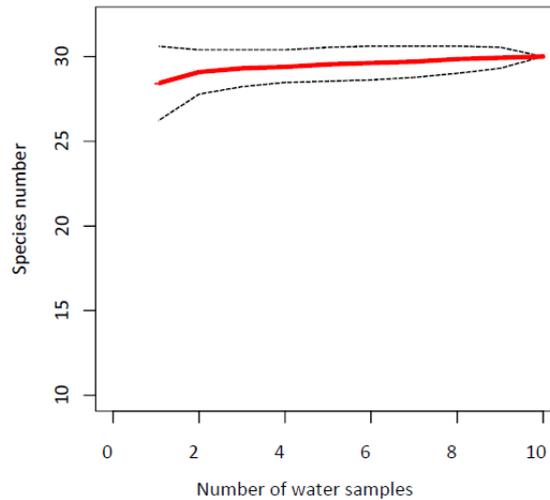


Figure 11 : Courbe d'accumulation sur le nombre d'espèces de Poissons détectées dans 10 échantillons réalisés sur une station du Rhône (Pont *et al.* 2018).

3.2.6 Détection des espèces de Téléostéens au cours de l'année en milieu aquatique courant

Afin de tester l'effet de la période d'échantillonnage sur les résultats ADNe, une étude a été menée sur trois cours d'eau ayant des comportements hydrologiques différents (l'Ain, le Rhône et le Tier). Sur chacun de ces cours d'eau, trois filtrations d'eau ont été réalisées tous les deux mois entre Octobre 2015 et Août 2016.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la

Figure 12 et montrent que le nombre d'espèces détectées peut varier selon la période d'échantillonnage et selon le cours d'eau étudié.

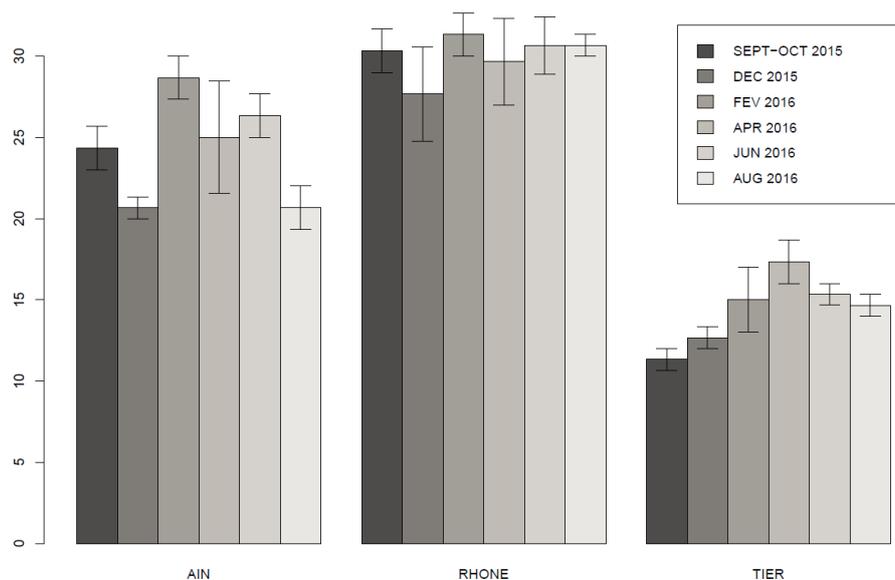


Figure 12 : Nombre d'espèces détectées au cours de l'année (Octobre, Décembre, Février, Avril, Juin et Août) sur trois cours d'eau : l'Ain, le Rhône et le Tier.

Plusieurs paramètres peuvent influencer la détection des espèces au cours de l'année. Premièrement, l'écologie des espèces doit être prise en compte. Les espèces peuvent migrer au sein d'un cours d'eau au cours de l'année et des différences dans les quantités d'ADN libérées peuvent être constatées en fonction par exemple de la période de reproduction de chaque espèce. Ensuite, les conditions hydrologiques du cours d'eau peuvent jouer un rôle important. Le Corégone est par exemple détecté dans le Tier une seule fois dans l'année, en Avril, potentiellement suite à des changements de débit dans le cours d'eau. Une augmentation du débit a ainsi pu amener de l'ADN provenant de beaucoup plus à l'amont (dans ce cas-ci, du lac d'Aiguebelette ; cf. partie 3.2.4). Il serait intéressant de combiner ces résultats avec ceux des débits de chaque cours d'eau lors des échantillonnages.

Une publication est prévue en 2019 sur les résultats de cette étude. Différentes hypothèses pourront donc être testées plus en détails, sur des aspects qualitatifs (différences sur la détection des espèces au cours du temps) et quantitatifs (différences sur le nombre de séquences ADN détectées par espèce au cours du temps).

Dans cette étude, il ne semble pas y avoir de période précise où la détection de l'ADN n'est pas optimale. Cependant, d'après des retours d'expériences dans le cadre d'autres études, la période hivernale ne semble pas la plus appropriée pour les échantillonnages ADNe (faible activité des organismes, températures froides, peu de matière organique,...) et donne parfois des résultats peu interprétables avec un nombre d'espèces détecté très faible. De plus, il est important de choisir la période d'échantillonnage en fonction de l'objectif de l'étude menée : par exemple une étude sur les espèces migratrices devra être menée à la période où ces espèces sont actives de façon à optimiser leur détection.

3.2.7 Mise en place opérationnelle de la méthode ADNe par les agents de l'AFB

Suite aux différents travaux de recherche menés de 2014 à 2016, l'objectif en 2017 était de travailler à plus large échelle avec des agents de l'AFB préalablement formés à l'échantillonnage ADNe de façon à (1) continuer à tester la méthode ADNe sur de nouveaux sites à travers la France où la faune piscicole est connue et ainsi faire ressortir les avantages et limites actuels de la méthode et (2) évaluer la mise en place opérationnelle de l'échantillonnage.

Pour cela, 19 sites ont été échantillonnés entre le 9 Juin et le 26 Octobre 2017 (Figure 13). Sur chacun de ces sites, deux filtrations d'eau ont été réalisées en aval du secteur étudié et dans la veine d'eau principale lorsque cela était possible. Les prélèvements ont été réalisés avec une pompe péristaltique (soit le préleveur Vampire, soit le bateau VigiBOAT) et les remarques associées à la mise en place de l'échantillonnage ont été compilées. Les analyses ont été faites dans un premier temps avec le couple d'amorces universel pour les Téléostéens. Des analyses ont par la suite été réalisées sur quelques échantillons avec un couple d'amorces pour les Cyprinidés. Toutes ces données ont ensuite été comparées avec le nombre maximum d'espèces pêchées sur chaque station étudiée ainsi qu'avec une moyenne des 5 dernières années de pêches disponibles. L'interprétation de tous les résultats de cette étude a été discutée avec les agents de l'AFB concernés.



Figure 13 : Carte des 19 sites échantillonnés par l'AFB en 2017.

➤ Comparaisons entre inventaires ADNe metabarcoding et pêches électriques

Les résultats des comparaisons entre les inventaires ADNe metabarcoding et les pêches électriques sont représentés dans la Figure 14.

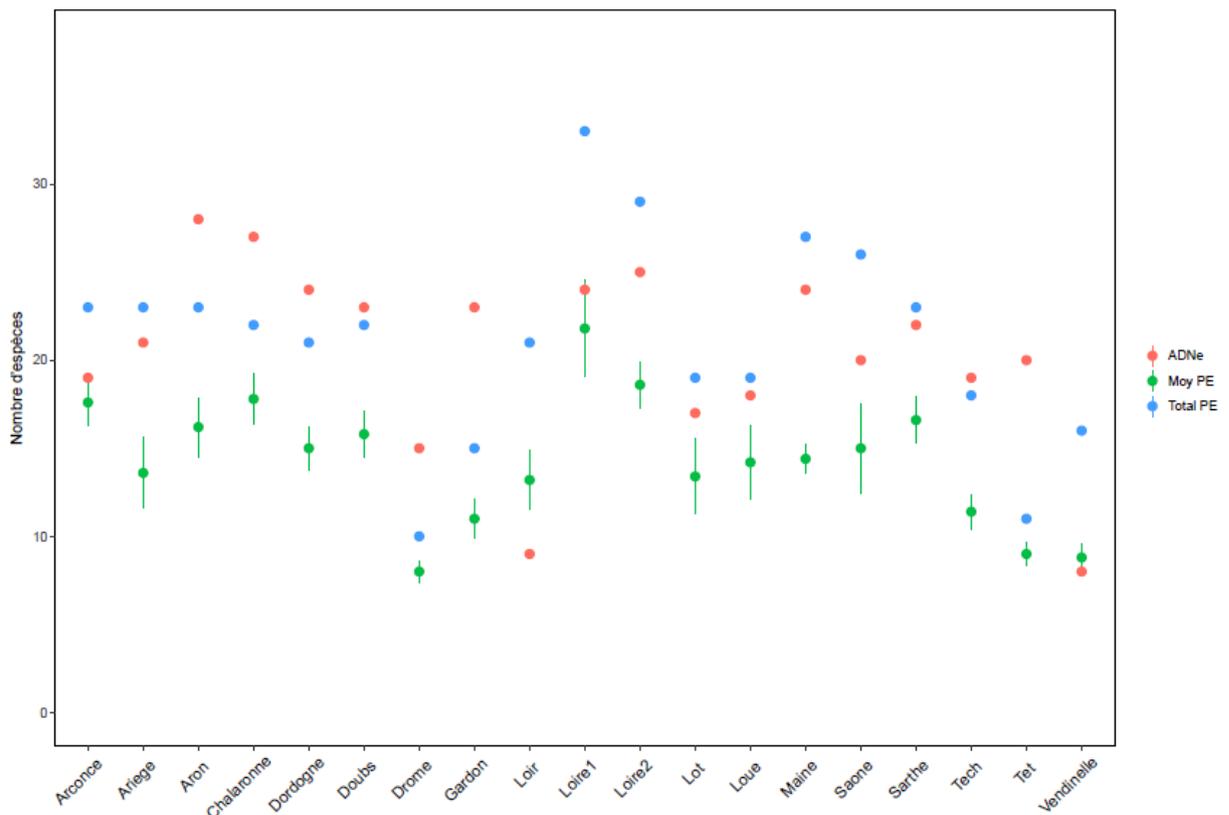


Figure 14 : Comparaison entre le nombre d'espèces détectées par l'ADNe metabarcoding (en rouge), le nombre moyen d'espèces détectées par pêche électrique (en vert) et le nombre total d'espèces détectées par pêche électrique (en bleu) pour les 19 stations étudiées.

Dans 89 % des cas, le nombre d'espèces détectées par l'ADNe est supérieur à la moyenne du nombre d'espèces observées lors des 5 dernières années de pêches. Les 11% des cas restants concernent les cours d'eau du Loir et de la Vendinelle. Dans le cas du Loir, les résultats obtenus ne semblent pas représenter correctement les espèces présentes car même des espèces pêchées chaque année et en forte densité comme l'Ablette (*Alburnus alburnus*) et le Rotengle (*Scardinius erythrophthalmus*) n'ont pas été détectées. A la vue des résultats, il semblerait qu'un problème soit apparu lors de l'échantillonnage ou de l'analyse (très peu de réplicats positifs ont été observés pour les différentes espèces) et il doit être noté que la localisation des prélèvements n'était pas optimale (à partir de la berge plutôt que dans la veine d'eau principale). Dans le cas de la Vendinelle, les espèces majoritaires ont été détectées par l'ADNe mais pas les espèces en plus faible densité comme par exemple les Brèmes (*Abramis brama* et *Blicca bjoerkna*). L'échantillonnage a été compliqué sur ce cours d'eau car les capsules de filtration ont colmaté très rapidement (au bout d'une dizaine de minutes ce qui n'a pas permis de réaliser les trente minutes préconisées dans le protocole) et le cours d'eau s'est révélé être plutôt lentique à cette période de l'année, ce qui n'a peut être pas permis de faire des prélèvements représentatifs de la station.

Sur les grands milieux tels que la Loire ou la Saône, les résultats ADNe restent meilleurs que les résultats des différentes années de pêches pris individuellement mais plusieurs espèces capturées sur une ou plusieurs sessions de pêches n'ont pas été détectées par l'ADNe. Par exemple sur la Saône, le Pseudorasbora (*Pseudorasbora parva*), le Rotengle (*Scardinius erythrophthalmus*) ou la Bouvière (*Rhodeus amarus*) ne sont pas détectés par l'ADNe. Les études précédentes en grand milieu ont principalement été réalisées sur le Rhône, qui se trouve au final être un système très homogène comparé à d'autres cours d'eau. La stratégie d'échantillonnage employée sur le Rhône (deux prélèvements en statique dans la veine d'eau principale) n'est peut être pas adaptée pour des cours d'eau comme la Saône ou la Loire. Il serait intéressant de tester des stratégies différentes sur ces stations, en réalisant des transects sur toute la largeur du cours d'eau par exemple.

Sur 8 sites, les résultats ADNe présentent plus d'espèces que le nombre total d'espèces détectées par les 5 dernières années de pêches. Ces nouvelles données ADNe peuvent provenir d'espèces rares qui sont difficilement capturées par pêche électrique. C'est par exemple le cas de la Carpe commune (*Cyprinus carpio*) ou du Sandre (*Sander lucioperca*) qui sont détectés par ADNe sur le Doubs mais pas pêchés, ou de l'Alose (*Alosa sp.*) détectée sur le Gardon et qui est seulement connue par « bulls » (mais jamais pêchée). Certaines espèces sont effectivement difficiles à détecter en pêche électrique et peuvent ne pas être capturées pendant plusieurs années malgré leur présence sur la station. Il est également parfois possible que l'ADN provienne d'espèces présentes plus à l'amont ou dans des étangs annexes comme la Vandoise (*Leuciscus sp.*) détectée sur le Gardon par ADNe mais pas sur la station même (par contre elle est détectée sur une station de pêche en amont) et le Carassin (*Carassius sp.*) dans la Drôme provenant d'un étang à proximité du cours d'eau. L'expertise d'un écologue est donc indispensable au moment des prélèvements et lors de l'interprétation des résultats de façon à interpréter au mieux les résultats (possibles connexions avec des affluents ou des étangs, écologie des espèces, etc.). De futures études plus détaillées sur la distance de détection permettront également de mieux cibler la provenance de l'ADN.

De façon générale, les deux prélèvements effectués sur chaque station ont donné une bonne image des espèces piscicoles présentes. Des tests complémentaires pourront être menés afin d'améliorer la détectabilité de certaines espèces, en travaillant notamment sur la stratégie d'échantillonnage adaptée à des cours d'eau peu homogènes.

➤ **Questionnement sur certains taxons**

Lors de cette étude, des questions sur des possibles confusions entre des espèces proches sont apparues. Les détails de la provenance des tissus présents dans la base de référence pour les taxons évoqués ci-dessous sont donnés dans l'Annexe 1.

Au cours de l'étude, une question s'est posée sur l'Ombre commun (*Thymallus thymallus*). En effet, cette espèce bien connue sur l'Orbe n'apparaissait pas dans les résultats ADNe. Des remarques similaires sont ressorties dans d'autres études pour cette espèce. Suite à ces remarques, de nouveaux tissus de l'espèce ont été demandés et après analyse de leur ADN, il s'est avéré que la séquence d'ADN obtenue était différente de celle déjà présente dans la base de références. L'ajout de ce nouvel haplotype dans la base de références a par la suite permis de bien détecter l'Ombre commun sur l'Orbe, et également sur la Dordogne. Compte tenu de la variabilité génétique de l'espèce en France, de nouveaux tissus seraient nécessaires pour compléter la base de références.

A plusieurs reprises, les correspondances entre les résultats ADNe et les pêches pour la Brème commune (*Abramis brama*) et la Brème bordelière (*Blicca bjoerkna*) ont amené des interrogations. Par exemple sur la Loire à Montjean, la Brème commune est tout autant détectée que la Brème bordelière alors que lors de la dernière pêche, seule des Brèmes bordelières ont été capturées. Un nombre important de tissus de France et d'autres pays Européens est présent pour ces deux espèces dans la base de références Téléostéens, ce qui ne laisse que peu de place au doute sur leur identification sur les différents sites de l'étude. Un point pourra néanmoins être fait avec le MNHN sur des sites où l'espèce de Brème connue n'est pas celle détectée par ADNe (collection de tissus et vérification taxonomique).

Des questions se sont également posées sur la Vandoise (*Leuciscus sp.*) et la Vandoise rostrée (*Leuciscus burdigalensis*). Par exemple sur l'Aron, les deux taxons ont été détectés par ADNe alors que seule la Vandoise est référencée par pêche. Les résultats des pêches doivent cependant être interprétés avec précaution car la distinction entre les deux espèces n'est pas toujours faite. Lors des prochaines pêches sur cette station, une attention particulière pourra être apportée à ces deux taxons afin de valider ou non les résultats ADNe. Un point pourra également être fait avec Vincent Dubut (IMBE), spécialiste de ces espèces.

Dans le cas du Chevaine (*Squalius cephalus*) et du Chevaine catalan (*Squalius laietanus*), les résultats semblent confus sur l'Ariège, le Lot et le Tech, où les deux espèces sont détectées par ADNe alors que seul le Chevaine est pêché. La séquence détectée pour le Chevaine catalan sur ces sites correspond pourtant parfaitement à la séquence ADN du tissu envoyé par le MNHN. Un contrôle sera fait avec le MNHN sur ces différents sites.

Des questions ont été posées pour la Lote (*Lota lota*), qui a bien été détectée sur un site (l'Oussière) dans le cadre de cette étude mais qui semble avoir été plusieurs fois non détectée (ou sous détectée) par l'ADN dans d'autres études, notamment sur le Rhône. Des tissus complémentaires sont nécessaires pour cette espèce et des tests pourraient être faits sur des sites où des populations sont présentes en faible densité.

Un travail plus poussé sera également à envisager avec le MNHN et Vincent Dubut (IMBE) sur certains taxons où l'identification se fait à l'heure actuelle au genre : *Carassius sp.*, *Cottus sp.*, *Gobio sp.*, *Leuciscus sp.* et *Phoxinus sp.*

➤ **Informations apportées avec de nouvelles amorces pour les Cyprinidés**

Certains Cyprinidés ne peuvent pas être différenciés par le couple d'amorces universel pour les Téléostéens. C'est le cas pour :

- le complexe 1 qui comprend le Hotu (*Chondrostoma nasus*), le Toxostome (*Parachondrostoma toxostoma*) et le Blageon (*Telestes souffia*) ;
- le complexe 2 qui comprend l'Amour blanc (*Ctenopharyngodon idella*) et la Carpe argentée (*Hypophthalmichthys molitrix*) ;
- le genre *Leuciscus sp.* qui comprend l'Ide mélanote (*Leuciscus idus*) et la Vandoise (*Leuciscus leuciscus*).

Sept cours d'eau de l'étude ont été ré-analysés avec un couple d'amorces spécifiquement développé pour les Cyprinidés (Taberlet *et al.* 2018). Ces cours d'eau ont été choisis avec un intérêt particulier pour le complexe 1 et le genre *Leuciscus sp.*.

Les résultats présentés dans le Tableau III montrent une bonne distinction des espèces du complexe 1 avec les amorces Cyprinidés. Les espèces détectées correspondent par ailleurs parfaitement avec les données de pêche sur ces cours d'eau. Les résultats ne sont par contre pas concluants pour le genre *Leuciscus sp.* car la distinction n'est toujours pas faite entre les différentes espèces. Un point doit être fait en 2019 avec Vincent Dubut (IMBE) pour ce genre (cf. Annexe 1). Pour le complexe 2, seul l'Amour blanc a été détecté. Les sites étudiés n'ayant pas été ciblés pour ce complexe, de nouveaux tests devraient être réalisés pour ces espèces.

Pour des sites à enjeux pour le complexe 1, il apparait donc tout à fait envisageable de réaliser de nouvelles analyses sur les extraits ADN pour compléter les informations données par le couple d'amorces universel pour les Téléostéens. Ces analyses pourront être proposées dès 2019.

Tableau III : Résultat des analyses menées sur sept cours d'eau pour les Cyprinidés - complexe 1 (a) en jaune avec le couple d'amorces universel pour les Téléostéens, (b) en vert avec les amorces spécifiquement développées pour les Cyprinidés ; les résultats correspondent aux espèces connues sur les différents sites.

	Ariège	Chalaronne	Dordogne	Gardon	Loire2	Loue	Saône
<i>Cyprinidae - Complexe 1</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>Chondrostoma nasus</i>		X		X	X	X	X
<i>Parachondrostoma toxostoma</i>	X		X	X		X	
<i>Telestes souffia</i>		X	X	X		X	

➤ **Retours d'expérience sur l'échantillonnage ADN**

Lors de cette étude, les agents de l'AFB ont pu tester le matériel d'échantillonnage et la mise en œuvre du protocole sur différents sites. Deux pompes différentes étaient disponibles : le préleveur Vampire, déjà testé dans d'autres études (Figure 15a) et le bateau VigiBOAT, dont une nouvelle version était testée dans le cadre de cette étude (Figure 15b et Figure 15c).

D'après les différents retours d'expérience, le protocole est facile à mettre en œuvre et le matériel est facilement transportable, que ce soit avec l'une ou l'autre des pompes et ne nécessite pas beaucoup de personnel (une à deux personnes). Le temps de mise en œuvre pour deux prélèvements par site avec une pompe unique est entre 1h30 et 2h selon la praticabilité du site. Les points négatifs évoqués concernent les difficultés pour l'insertion de la capsule sur le tuyau de prélèvement et la quantité importante de déchets par site. Tout le matériel utilisé à part la pompe est à usage unique pour éviter tout risque de contamination

et des démarches sont actuellement en cours pour trouver des filières de recyclage ou de réutilisation des différents matériaux utilisés sur le terrain.

Lorsque les deux systèmes de pompage sont comparés, il ressort que le bateau VigiBOAT possède une meilleure autonomie, réalise le prélèvement de manière autonome ce qui évite à l'échantillonneur de rester dans l'eau, et est plus facilement utilisable sur des grands milieux accessibles uniquement à partir de ponts (bien qu'il soit parfois difficile de réaliser des prélèvements sur des ponts très hauts et fortement passants). Par contre les risques de contamination semblent plus élevés via les coques et les ancres. De plus, un manque de fiabilité a été relevé sur ce matériel suite à des problèmes de moteur décelés au milieu de l'étude. A l'inverse, la pompe Vampire semble plus adaptée sur des petits milieux du fait de sa portabilité et de la rapidité de sa mise en place (pas d'ancre notamment). L'autonomie est cependant plus faible, il est donc nécessaire d'avoir plusieurs batteries si plusieurs sites sont échantillonnés par jour et il est nécessaire pour le personnel intervenant de rester dans l'eau de façon à maintenir la filtration active. Ce matériel reste cependant fiable sur le long terme car il a longtemps été éprouvé. Son problème majeur pour une standardisation des échantillonnages ADNe concerne le débit de pompage, qui reste variable selon la pompe et la batterie utilisées et ne peut pas être réglé.

Dans le cadre de la standardisation de l'échantillonnage ADNe, de nouveaux modèles de pompe sont envisagés et seront proposés prochainement à l'AFB pour des tests. Il est également prévu d'utiliser un débitmètre afin de contrôler le volume d'eau prélevé.

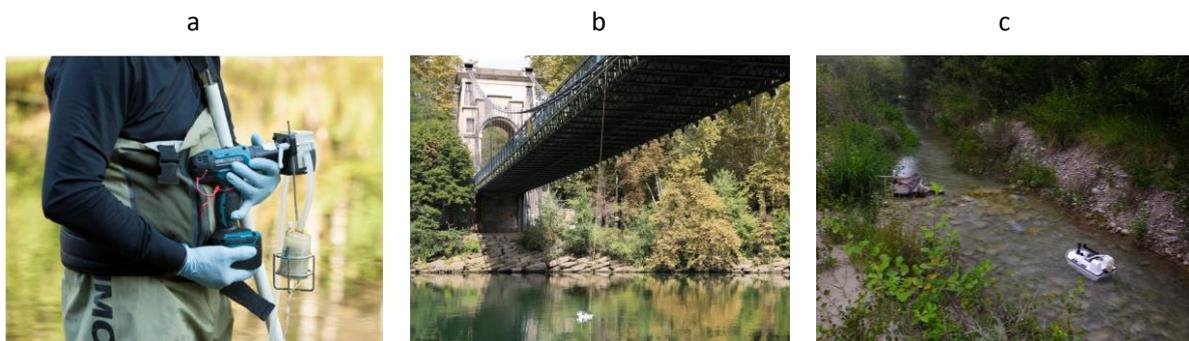


Figure 15 : Prélèvements réalisés avec la pompe Vampire (a), ainsi qu'avec le bateau VigiBOAT à partir d'un pont (b) et directement dans le cours d'eau (c) ; ©AFB.

3.2.8 Conclusion pour les Téléostéens

De nombreux travaux ont été réalisés sur la détection des Téléostéens par l'ADNe metabarcoding. Cette méthode, actuellement utilisée dans le cadre de multiples projets (études d'impacts réglementaires, projets de conservation), a prouvé maintes fois son efficacité, notamment dans des milieux difficiles à prospecter par inventaires classiques comme par exemple le Rhône ou bien pour des espèces rares et discrètes comme l'Apron du Rhône ou la Loche d'étang. La base de référence nécessite encore d'être complétée pour répondre aux questions posées sur quelques complexes d'espèces et éviter les faux négatifs en intégrant toute la variabilité génétique des différentes espèces de Téléostéens (comme cela a été le cas pour l'Ombre commun dans la première partie de l'étude citée en 3.2.7). Dans un cadre de veille environnementale, il serait également intéressant d'inclure des espèces à potentiel invasif présentes dans les pays frontaliers ou utilisées pour l'élevage ou l'aquariophilie.

Les travaux menés sur l'effort d'échantillonnage ont montré la nécessité de réaliser deux échantillons par site en cours d'eau pour optimiser la détection des espèces rares. La stratégie d'échantillonnage (nombre et localisation des prélèvements) nécessite cependant d'être revue pour des cours d'eau plus

complexes comme par exemple la Saône et la Loire pour lesquels plusieurs espèces faiblement abondantes n'ont pas été détectées par l'ADNe. La stratégie à adopter en grand milieu stagnant sera quant à elle revue dans le cadre d'un projet de recherche (READ-FISH) mené avec IRSTEA, l'AFB et l'INRA qui débutera en 2019.

Les premiers tests réalisés sur la distance de détection de l'ADNe en milieux aquatiques courants montrent que le signal peut persister sur quelques kilomètres pour les petits cours d'eau à plusieurs dizaines de kilomètres pour des cours d'eau plus importants. Des études complémentaires devront cependant être menées pour définir des modèles plus précis sur les distances de détection.

Les tests menés sur les périodes d'échantillonnage indiquent des variations du nombre d'espèces au cours du temps, pouvant être liées à des modifications hydrologiques des cours d'eau ou à l'écologie des espèces. La période reste à adapter en fonction des espèces recherchées, en sachant qu'il est préférable d'éviter la période hivernale où des résultats peu concluants ont été obtenus dans le cadre de quelques études.

Toutes ces études ont dans un premier temps été ciblées sur l'aspect qualitatif de la méthode. Suite aux bons résultats obtenus, des recherches plus poussées pourraient être menées sur l'aspect semi-quantitatif, afin de distinguer des classes d'abondances des espèces au sein de chaque échantillon et d'étudier la conformité de ces abondances par rapport à celles obtenues par les pêches électriques. Une première comparaison a été réalisée dans la publication de Pont *et al.* 2018 (non abordée dans ce rapport) mais cette thématique mériterait d'être développée plus amplement à l'avenir.

4 BATRACIENS

La classe des Batraciens comprend de nombreuses espèces discrètes et rares, ce qui en fait un des groupes d'animaux le plus vulnérable. La distribution de ces espèces est souvent mal connue car les probabilités de détection en utilisant les inventaires traditionnels peuvent être très faibles et varier en fonction des conditions environnementales locales. Compte tenu de ce fait et des problématiques d'espèces protégées et d'espèces invasives pour ce groupe, des tests ont été menés dès 2008 pour évaluer l'efficacité de la méthode ADNe. Les premiers tests ont été réalisés en ADNe barcoding (pour la Grenouille taureau avec Ficetola *et al.* 2008, Dejean *et al.* 2012 ; pour le Triton crêté avec Biggs *et al.* 2015 et pour le Xénope lisse avec Secondi *et al.* 2016).

La présente convention avait pour but d'évaluer l'efficacité de la méthode ADNe metabarcoding pour inventorier toutes les espèces d'Amphibiens dans un milieu aquatique. Un des objectifs avec cette méthode consiste à obtenir une liste d'espèces exhaustive en réalisant l'échantillonnage à un seul moment de l'année (contrairement aux inventaires classiques qui nécessitent des inventaires à plusieurs périodes).

Les développements pour ce groupe taxonomique ont été réalisés en partenariat avec l'AFB, le CEFE, le LECA et le bureau d'études Ecosphère.

4.1 BASE DE REFERENCES BATRACIENS

La base de références génétiques pour les Batraciens est aujourd'hui complète avec des séquences validées pour l'ensemble des espèces présentes en France (42 espèces - Tableau IV).

La résolution du couple d'amorces universel utilisé pour les Batraciens est à l'espèce sauf pour les genres *Bufo sp.* et *Pelophylax sp.*. Cette information est détaillée dans la partie 4.2.2.

Tableau IV : Liste des espèces présentes dans la base de références ADNe-France Batraciens

Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Alytes obstetricans</i>	<i>Alyte accoucheur</i>
<i>Bombina variegata</i>	Sonneur à ventre jaune
<i>Bufo bufo</i>	Crapaud commun
<i>Bufo spinosus</i>	Crapaud épineux
<i>Bufo viridis</i>	Crapaud vert
<i>Calotriton asper</i>	Calotriton des Pyrénées
<i>Discoglossus montalentii</i>	Discoglosse corse
<i>Discoglossus pictus</i>	Discoglosse peint
<i>Discoglossus sardus</i>	Discoglosse sarde
<i>Epidalea calamita</i>	Crapaud calamite
<i>Euproctus montanus</i>	Euprocte de Corse
<i>Hyla arborea</i>	Rainette verte
<i>Hyla meridionalis</i>	Rainette méridionale
<i>Hyla sarda</i>	Rainette sarde
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	Triton alpestre
<i>Lissotriton helveticus</i>	Triton palmé
<i>Lissotriton vulgaris</i>	Triton ponctué
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Grenouille taureau
<i>Pelobates cultripes</i>	Pélobate cultripède
<i>Pelobates fuscus</i>	Pélobate brun
<i>Pelodytes punctatus</i>	Pélodyte ponctué
<i>Pelophylax bedriagae</i>	Grenouille de Bedriaga
<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	Grenouille commune
<i>Pelophylax kl. grafi</i>	Grenouille de Graf
<i>Pelophylax lessonae bergeri</i>	Grenouille de Berger
<i>Pelophylax lessonae lessonae</i>	Grenouille de Lessona
<i>Pelophylax perezii</i>	Grenouille de Pérez
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Grenouille rieuse
<i>Pelophylax rid. kurtmuelleri</i>	Grenouille des Balkans
<i>Rana arvalis</i>	Grenouille des champs
<i>Rana dalmatina</i>	Grenouille agile
<i>Rana pyrenaica</i>	Grenouille des Pyrénées
<i>Rana temporaria</i>	Grenouille rousse
<i>Salamandra atra</i>	Salamandre noire
<i>Salamandra corsica</i>	Salamandre de Corse
<i>Salamandra lanzai</i>	Salamandre de Lanza
<i>Salamandra salamandra</i>	Salamandre tachetée
<i>Speleomantes strinatii</i>	Spélerpès de Strinati
<i>Triturus carnifex</i>	Triton crêté italien
<i>Triturus cristatus</i>	Triton crêté
<i>Triturus marmoratus</i>	Triton marbré
<i>Xenopus laevis</i>	Xénope lisse

4.2 ETUDES PILOTES POUR LES BATRACIENS

4.2.1 Validation de l'approche ADNe metabarcoding pour les espèces de Batraciens

La validation de la méthode ADNe metabarcoding pour les Batraciens a été publiée en même temps que celle pour les Téléostéens, dans l'article de Valentini *et al.* 2016. Elle se décompose en trois étapes distinctes : les validations *in silico*, *in vitro* et *in situ*.

Le couple d'amorces universel pour les Batraciens a été créé à l'aide du logiciel ECOPRIMERS. Les tests *in silico* ont été réalisés bio-informatiquement avec le programme ECOPCR. Ce programme permet de mettre en évidence les séquences d'ADN présentes dans les bases de références génétiques publiques (GenBank®) qui peuvent être amplifiées par le couple d'amorces utilisé. Ce test a permis de démontrer que le couple d'amorces universel pour les Batraciens possède une couverture taxonomique élevée (99.28% des espèces présentes dans GenBank au moment de l'étude peuvent être amplifiées) et est fortement résolutif (cf. 4.2.2 pour les deux seuls taxons non différenciés).

Afin de valider l'universalité du couple d'amorces développé, des tests *in vitro* ont été effectués en mélangeant l'ADN de l'ensemble des espèces françaises de Batraciens présentes dans la base de références. Ils ont ensuite été amplifiés, séquencés à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération, puis analysés bio-informatiquement. Ces tests ont permis de valider l'amplification de l'ADN de tous les Batraciens présents dans les bases de références et donc de confirmer l'universalité du couple d'amorces universel développé.

Pour les tests *in situ*, des études comparatives ont été menées sur 39 sites. Sur chacun de ces sites, les résultats obtenus par l'approche ADNe ont été comparés aux résultats issus d'inventaires classiques (prospections diurne et nocturne) et à des données historiques. Ces résultats ont permis de montrer une très bonne détectabilité des espèces de Batraciens par l'ADN environnemental. La probabilité de détection avec l'approche ADNe est de 97% contre 58% pour les inventaires traditionnels (Figure 16). Ainsi, quatre visites successives sont nécessaires en utilisant les méthodes classiques pour arriver à la même probabilité de détection qu'avec un seul passage par l'approche ADNe.

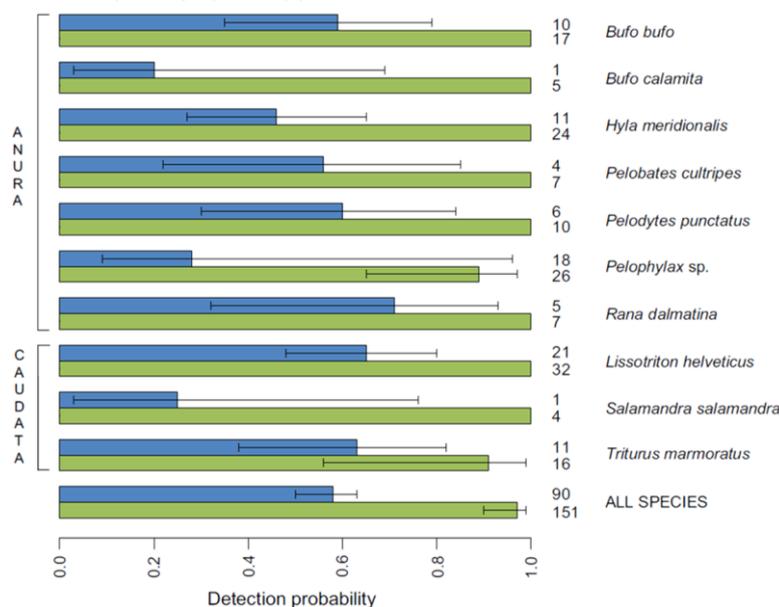


Figure 16 : Probabilité de détection pour chaque espèce de Batraciens en utilisant les inventaires classiques (bleu) et l'approche ADNe metabarcoding (vert). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance des analyses et n représente le nombre de détections pour chaque méthode et pour chaque espèce.

La méthode ADNe présente ainsi de nombreux avantages pour la détection des Batraciens : bonne détectabilité des espèces, faible effort d'échantillonnage, méthode non invasive. Elle reste toutefois complémentaire des méthodes d'inventaire classiques qui permettent d'obtenir des informations supplémentaires sur le nombre d'individus et leurs caractéristiques (taille, âge, sexe, etc.).

4.2.2 Distinctions d'espèces au sein des genres *Bufo* et *Pelophylax*

Dans le cadre de ce programme de recherche, une étude complémentaire a été menée pour étudier le potentiel de discrimination des marqueurs génétiques Batraciens pour des taxons faisant partie des complexes d'espèces des genres *Bufo* et *Pelophylax*. Avec les méthodes d'inventaire classique, il est très difficile, voire impossible, de distinguer les espèces au sein de ces complexes. En effet, les espèces de *Pelophylax* présentes en France (8 espèces) sont souvent identifiées comme « grenouilles vertes », sans distinction entre elles. Le groupe *Bufo bufo* est quant à lui constitué en France de 2 espèces : *Bufo bufo* et *Bufo spinosus*. Cette dernière a été considérée, dans le passé, soit comme synonyme de *Bufo bufo* soit comme sous-espèce de celle-ci. C'est en 2004 qu'elle a été reconnue comme espèce distincte, ce qui a été confirmé par des études phylogénétiques en 2012.

Afin de tester *in vitro* le pouvoir discriminant du couple d'amorces universel pour les Batraciens, 76 tissus de *Pelophylax sp.* et 15 de *Bufo sp.*, provenant d'Europe et du Proche-Orient ont été analysés (Figure 17).

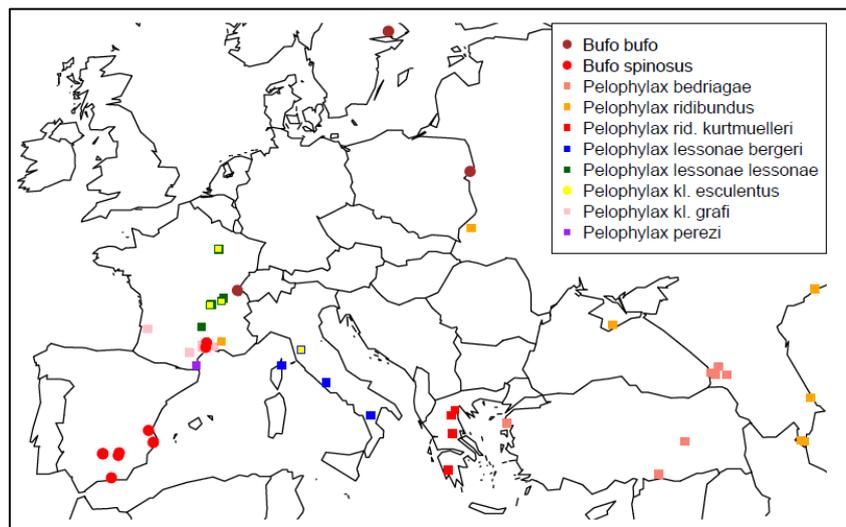


Figure 17 : Sites de prélèvements de tissus des genres *Bufo* et *Pelophylax*.

Afin de valider la discrimination de ces espèces *in situ*, des prélèvements d'eau ont été réalisés dans 27 mares où leur présence était connue. L'ADN a été extrait, amplifié et séquencé selon le protocole présenté dans l'article Valentini *et al.* 2016.

L'analyse de ces tissus a permis de montrer que le couple d'amorces universel pour les Batraciens semble différencier *Bufo bufo* de *Bufo spinosus* (Figure 18a) et que les espèces de *Pelophylax* peuvent être regroupées en 3 complexes d'espèces (Figure 18b) :

1. *Pelophylax perezii* / *grafi*,
2. *Pelophylax lessonae* / *bergeri* / *esculentus*,
3. *Pelophylax ridibundus* / *kurtmuelleri* / *bedriagae*.

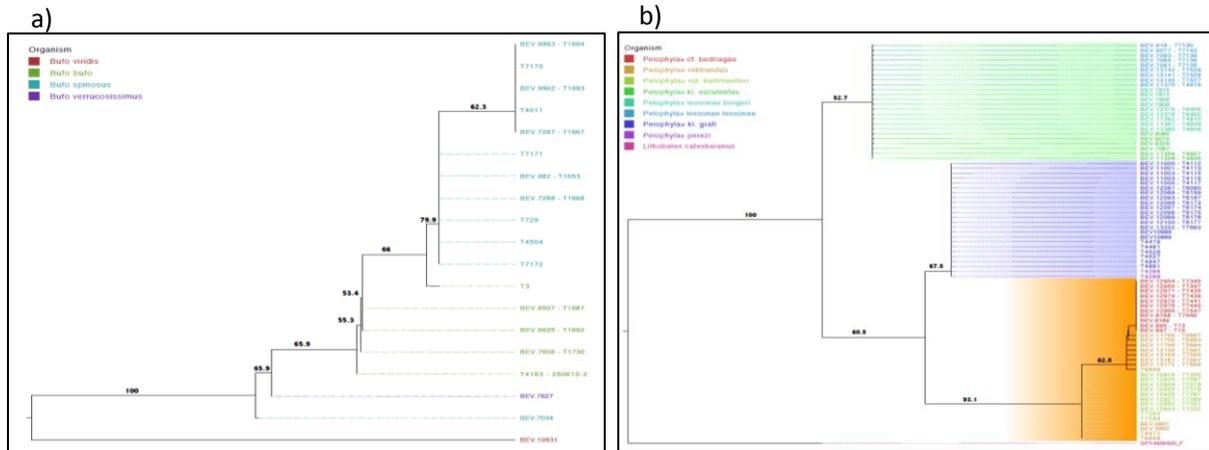


Figure 18 : Arbres phylogénétiques montrant la différenciation des espèces pour le groupe *Bufo* sp. (a) et les espèces du genre *Pelophylax* sp. (b) avec le couple d'amorces universel Batraciens.

Les résultats obtenus avec les prélèvements d'ADNe *in situ* sont en accord avec les résultats obtenus *in vitro* et démontrent des séquences génétiques différentes entre les espèces du genre *Pelophylax* sp. et entre *Bufo bufo* et *Bufo spinosus*. Cependant, avec l'ADNe, il a été possible de détecter des haplotypes mitochondriaux de l'espèce *Bufo bufo* autour de la zone de Montpellier, plus au sud de la répartition de *Bufo bufo* décrite par Arntzen *et al.* 2013 (Figure 19).

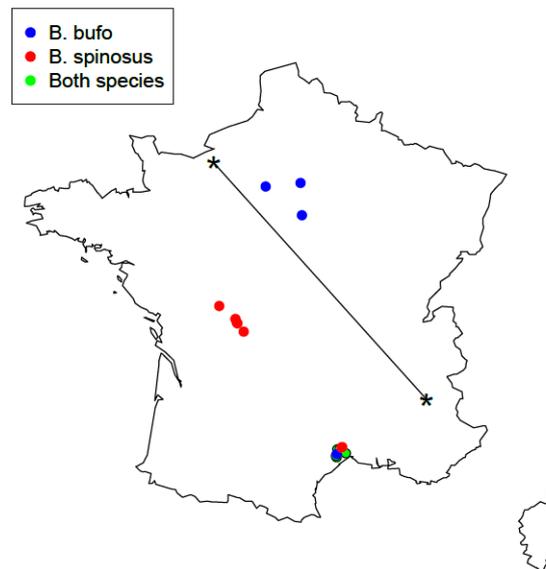


Figure 19 : Distribution des espèces de *Bufo* sp. détectées en utilisant l'approche ADNe metabarcoding, la ligne diagonale délimite la séparation entre les deux espèces selon Arntzen *et al.* 2013.

Ceci démontre une introgression de l'ADN mitochondrial de cette espèce dans les populations de *Bufo spinosus*. La détection de *Bufo bufo* à cet endroit par ADNe ne signifie donc pas que l'espèce est *Bufo bufo* : il s'agit en fait de *Bufo spinosus* avec l'ADN mitochondrial de *Bufo bufo*. Ainsi, les deux espèces ne peuvent pas être différenciées par l'ADNe à l'heure actuelle (hormis sur des localisations très éloignées de la zone de contact entre les deux espèces). Des analyses complémentaires seront menées en 2019 avec le CEFÉ de Montpellier en comparant les résultats où les espèces de *Bufo* ont été détectées par le passé avec l'ADNe, pour établir une cartographie de ces deux haplotypes sur la France.

4.3 CONCLUSION SUR LES BATRACIENS

En amont de la convention entre l'AFB et SPYGEN, une étude avait été réalisée avec l'association Natureparif pour déterminer la période d'échantillonnage optimale pour l'étude des Batraciens. En effet, l'idéal afin de limiter les coûts d'inventaire est de trouver une période qui puisse correspondre à l'activité à la fois des espèces précoces et des espèces tardives. Les résultats récemment publiés par Zucca et Meunier (2018) montrent qu'en 2013, en région parisienne, l'échantillonnage optimal était en Mai, avec 95% des espèces détectées. Cette période doit cependant être ajustée en fonction du lieu d'échantillonnage et des conditions climatiques de l'année considérée.

De nombreuses études ont été menées à ce jour sur les Batraciens (y compris en milieu courant, par exemple Lopes *et al.* 2016) et ces expertises sont maintenant reconnues pour avoir une bonne détectabilité d'espèces rares (patrimoniales ou invasives). Des axes de développement demeurent pour les différenciations des *Bufo* et une distinction plus précise des *Pelophylax*, mais cela demanderait probablement de travailler sur de l'ADN nucléaire, ce qui serait limitant pour des études ADN environnemental. En effet, l'ADN nucléaire est beaucoup moins présent dans l'environnement que l'ADN mitochondrial (jusqu'à 2000 fois moins).

Des développements sont actuellement en cours pour mieux détecter les pathogènes des Batraciens, comme par exemple la Chytridiomycose ou les Ranavirus. Des études déjà menées sur les Ranavirus avec le CEFE et sur *Batrachochytrium salamandrivorans* en collaboration avec l'ONG RAVON et l'université de Gent montrent que leur détection par l'ADNe est possible et fiable. Une meilleure connaissance de la répartition de ces pathogènes semble en effet indispensable pour la conservation des espèces de Batraciens.

5 ODONATES

Les inventaires odonatalogiques classiques sont variés, avec des études qui peuvent être faites sur les adultes, les exuvies ou les larves. La méthode la plus employée et la moins chronophage reste à l'heure actuelle l'observation des adultes pendant la période de vol. Cette méthode demande toutefois plusieurs passages sur site, est dépendante des conditions climatiques et requiert une bonne connaissance des Odonates, notamment pour certains taxons difficiles à différencier. La méthode ADNe a été testée afin d'évaluer si elle pouvait simplifier les inventaires pour les Odonates, améliorer la connaissance des espèces et potentiellement identifier les sites concernés par de la reproduction (car la méthode est basée sur les prélèvements d'eau, lieu de reproduction puis de développement larvaire pour les Odonates). Pour cela, une collaboration a été mise en place en 2014 entre SPYGEN, l'OPIE, la SFO et l'AFB. L'objectif était de constituer des bases de références génétiques pour les Odonates et de tester leur détectabilité par l'ADNe en fonction de la période d'échantillonnage.

5.1 BASE DE REFERENCES ODONATES

La base de références génétiques pour les Odonates contient à ce jour 94 espèces (Tableau V) sur les 102 espèces observées depuis 1900 en France métropolitaine. Certaines espèces n'ont pas pu être collectées par l'OPIE à cause de leur répartition très localisée, de leur phénologie particulière, de leur présence de façon erratique voire douteuse en France, ou du fait de problèmes taxonomiques : *Anax junius*, *Brachythemis impartita*, *Calopteryx splendens caprai*, *Leucorrhinia rubicunda*, *Orthetrum trinacria*, *Somatochlora meridionalis*, *Sympecma paedisca*, *Sympetrum vulgatum ibericum*.

Le couple d'amorces universel utilisé pour les Odonates n'est pas toujours résolutif à l'espèce. Ainsi, certains taxons ne peuvent pas être différenciés et sont donc notés au genre. C'est le cas pour :

- *Aeshna* sp. : *Aeshna cyanea* ou *Aeshna mixta*
- *Anax* sp. : *Anax parthenope* ou *Anax imperator*
- *Coenagrion* sp. : *Coenagrion puella* ou *Coenagrion mercuriale*
- *Calopteryx* sp. : *Calopteryx splendens splendens* ou *Calopteryx xanthostoma*
- *Ischnura* sp. : *Ischnura elegans* ou *Ischnura genei*
- *Platycnemis* sp. : *Platycnemis pennipes* ou *Platycnemis latipes*

De plus, les sous-espèces de *Calopteryx virgo* et celles de *Onychogomphus forcipatus* ne peuvent pas être différenciées.

Tableau V : Liste des espèces présentes dans la base de références ADNe-France Odonates.

Noms scientifiques	Nom vernaculaire
<i>Aeshna affinis</i>	Aeschne affine
<i>Aeshna caerulea</i>	Aeschne azurée
<i>Aeshna cyanea</i>	Aeschne bleue
<i>Aeshna grandis</i>	Grande aeschne
<i>Aeshna isocèles</i>	Aeschne isocèle
<i>Aeshna juncea</i>	Aeschne des joncs
<i>Aeshna mixta</i>	Aeschne mixte
<i>Aeshna subarctica</i>	Aeschne subarctique
<i>Anax imperator</i>	Anax empereur
<i>Anax parthenope</i>	Anax napolitain
<i>Boyeria irene</i>	Aeschne paisible
<i>Brachytron pratense</i>	Aeschne printanière
<i>Calopteryx haemorrhoidalis</i>	Caloptéryx hémorroïdal
<i>Calopteryx splendens splendens</i>	Caloptéryx éclatant
<i>Calopteryx virgo meridionalis</i>	Caloptéryx vierge méridional
<i>Calopteryx virgo virgo</i>	Caloptéryx vierge septentrional
<i>Calopteryx xanthostoma</i>	Caloptéryx occitan
<i>Ceriagrion tenellum</i>	Agrion délicat
<i>Chalcolestes parvidens</i>	Leste vert oriental
<i>Chalcolestes viridis</i>	Leste vert occidental
<i>Coenagrion caerulescens</i>	Agrion bleuissant
<i>Coenagrion hastulatum</i>	Agrion à fer de lance
<i>Coenagrion lunulatum</i>	Agrion à lunules
<i>Coenagrion mercuriale</i>	Agrion de Mercure
<i>Coenagrion ornatum</i>	Agrion orné
<i>Coenagrion puella</i>	Agrion jouvencelle
<i>Coenagrion pulchellum</i>	Agrion joli
<i>Coenagrion scitulum</i>	Agrion mignon
<i>Cordulegaster bidentata</i>	Cordulégastre bidenté
<i>Cordulegaster boltonii boltonii</i>	Cordulégastre annelé
<i>Cordulegaster boltonii immaculifrons</i>	Cordulégastre à front jaune
<i>Cordulia aenea</i>	Cordulie bronzée
<i>Crocothemis erythraea</i>	Crocothémis écarlate

Noms scientifiques	Nom vernaculaire
<i>Enallagma cyathigerum</i>	Agrion porte-coupe
<i>Epitheca bimaculata</i>	Epithèque bimaculée
<i>Erythromma lindenii</i>	Naïade de Vander Linden
<i>Erythromma najas</i>	Naïade aux yeux rouges
<i>Erythromma viridulum</i>	Naïade au corps vert
<i>Gomphus flavipes</i>	Gomphe à pattes jaunes
<i>Gomphus graslinii</i>	Gomphe de Graslin
<i>Gomphus pulchellus</i>	Gomphe joli
<i>Gomphus simillimus</i>	Gomphe semblable
<i>Gomphus vulgatissimus</i>	Gomphe vulgaire
<i>Hemianax ephippiger</i>	Anax porte-selle
<i>Ischnura elegans</i>	Agrion élégant
<i>Ischnura genei</i>	Agrion de Gené
<i>Ischnura graellsii</i>	Agrion de Graells
<i>Ischnura pumilio</i>	Agrion nain
<i>Lestes barbarus</i>	Leste sauvage
<i>Lestes dryas</i>	Leste des bois
<i>Lestes macrostigma</i>	Leste à grands ptérostigmas
<i>Lestes sponsa</i>	Leste fiancé
<i>Lestes virens vestalis</i>	Leste verdoyant septentrional
<i>Lestes virens virens</i>	Leste verdoyant méridional
<i>Leucorrhinia albifrons</i>	Leucorrhine à front blanc
<i>Leucorrhinia caudalis</i>	Leucorrhine à large queue
<i>Leucorrhinia dubia</i>	Leucorrhine douteuse
<i>Leucorrhinia pectoralis</i>	Leucorrhine à gros thorax
<i>Libellula depressa</i>	Libellule déprimée
<i>Libellula fulva</i>	Libellule fauve
<i>Libellula quadrimaculata</i>	Libellule quadrimaculée
<i>Lindenia tetraphylla</i>	Lindénie à quatre feuilles
<i>Macromia splendens</i>	Cordulie splendide
<i>Nehalennia speciosa</i>	Déesse précieuse
<i>Onychogomphus forcipatus forcipatus</i>	Gomphe à forceps septentrional
<i>Onychogomphus forcipatus unguiculatus</i>	Gomphe à forceps méridional
<i>Onychogomphus uncatus</i>	Gomphe à crochets
<i>Ophiogomphus cecilia</i>	Gomphe serpentin
<i>Orthetrum albistylum</i>	Orthétrum à stylets blancs
<i>Orthetrum brunneum</i>	Orthétrum brun
<i>Orthetrum cancellatum</i>	Orthétrum réticulé
<i>Orthetrum coerulescens anceps</i>	Orthétrum de Rambur
<i>Orthetrum coerulescens coerulescens</i>	Orthétrum bleuissant
<i>Oxygastra curtisii</i>	Cordulie à corps fin
<i>Paragomphus genei</i>	Gomphe de Gené
<i>Platycnemis acutipennis</i>	Agrion orangé
<i>Platycnemis latipes</i>	Agrion blanchâtre
<i>Platycnemis pennipes</i>	Agrion à larges pattes
<i>Pyrrhosoma nymphula</i>	Petite nymphe au corps de feu
<i>Somatochlora alpestris</i>	Cordulie alpestre
<i>Somatochlora arctica</i>	Cordulie arctique
<i>Somatochlora flavomaculata</i>	Cordulie à taches jaunes

Noms scientifiques	Nom vernaculaire
<i>Somatochlora metallica</i>	Cordulie métallique
<i>Sympecma fusca</i>	Leste brun
<i>Sympetrum danae</i>	Sympétrum noir
<i>Sympetrum depressiusculum</i>	Sympétrum déprimé
<i>Sympetrum flaveolum</i>	Sympétrum jaune d'or
<i>Sympetrum fonscolombii</i>	Sympétrum de Fonscolombe
<i>Sympetrum meridionale</i>	Sympétrum méridional
<i>Sympetrum pedemontanum</i>	Sympétrum du Piémont
<i>Sympetrum sanguineum</i>	Sympétrum sanguin
<i>Sympetrum striolatum</i>	Sympétrum fascié
<i>Sympetrum vulgatum</i>	Sympétrum vulgaire
<i>Trithemis annulata</i>	Trithémis annelé

5.2 ETUDE DE FAISABILITE POUR LA DETECTION DES ODONATES PAR L'ADNE - DETECTABILITE EN FONCTION DE LA PERIODE D'ECHANTILLONNAGE

En parallèle de l'élaboration de la base de de références génétiques, des prélèvements ont été réalisés par l'OPIE dans 10 mares de la forêt de Fontainebleau et à 6 périodes différentes au cours de la saison d'activité des Odonates (début mai, fin mai, juin, juillet, août, septembre pour 8 de ces mares et début juin, fin juin, juillet, août, début septembre et fin septembre pour les 2 autres). Des inventaires classiques ont été menés en parallèle de ces prélèvements, principalement par des captures à vue.

Tableau VI : Espèces d'Odonates détectées sur 10 mares par ADNe et par inventaires classiques.

Espèces détectées	par ADNe	par Inventaires classiques
<i>Aeshna cyanea</i>	X	X
<i>Anax imperator</i>	X au genre <i>Anax sp.</i>	X
<i>Anax parthenope</i>	X au genre <i>Anax sp.</i>	X
<i>Brachytron pratense</i>		X
<i>Calopteryx splendens splendens</i>		X
<i>Ceragrion tenellum</i>	X	X
<i>Chalcolestes viridis</i>	X	X
<i>Coenagrion puella</i>	X au genre <i>Coenagrion sp.</i>	X
<i>Coenagrion scitulum</i>	X	
<i>Cordulia aenea</i>	X	X
<i>Erythromma lindenii</i>		X
<i>Ischnura elegans</i>	X	X
<i>Lestes sponsa</i>	X	X
<i>Lestes virens vestalis</i>	X	X
<i>Lestes virens virens</i>	X	X
<i>Leucorrhinia pectoralis</i>	X	
<i>Libellula depressa</i>	X	X
<i>Libellula quadrimaculata</i>	X	X
<i>Onychogomphus forcipatus forcipatus</i>		X
<i>Orthetrum cancellatum</i>	X	
<i>Platycnemis pennipes</i>	X au genre <i>Platycnemis sp.</i>	X
<i>Pyrhosoma nymphula</i>	X	X
<i>Somatochlora metallica</i>		X
<i>Sympecma fusca</i>	X	
<i>Sympetrum danae</i>	X	X
<i>Sympetrum sanguineum</i>	X	X
<i>Sympetrum striolatum</i>	X	X

Au total, 25 taxons d'Odonates ont été détectés sur les 10 mares de Fontainebleau, dont 23 par les inventaires classiques et 21 par l'approche ADNe (Tableau VI). Tous les taxons ont été identifiés à l'espèce par les inventaires classiques. Pour l'approche ADNe, trois taxons n'ont pu être identifiés à l'espèce : *Anax sp.* (*Anax imperator* ou *Anax parthenope*), *Coenagrion sp.* (*Coenagrion puella* ou *Coenagrion mercuriale*) et *Platycnemis sp.* (*Platycnemis pennipes* ou *Platycnemis latipes*).

Les espèces qui ont été détectées par inventaires classiques mais pas par ADNe étaient présentes en faible densité sur chaque mare (seulement quelques individus observés sur toute la saison d'échantillonnage). Deux possibilités peuvent alors être envisagées : soit l'ADN de ces espèces n'était pas présent en quantité suffisante dans la mare pour être détecté par l'approche ADNe metabarcoding, soit ces espèces n'utilisaient pas la mare pour la reproduction et n'ont pas pu être détectées à partir de prélèvements d'eau.

Aucune période d'échantillonnage optimale ne semble se dégager de cette étude, la détectabilité de l'ADN des Odonates restant très fluctuante pour une même période d'échantillonnage entre différents sites (Figure 20). De plus, pour chaque espèce, la détectabilité varie au cours de la saison (Figure 21 avec *Aeshna cyanea*, *Ceriagrion tenellum*, *Chalcolestes viridis* et *Libellula quadrimaculata*) sans que cette fluctuation puisse être reliée à la biologie de l'espèce (état larvaire, émergence, reproduction, etc.).

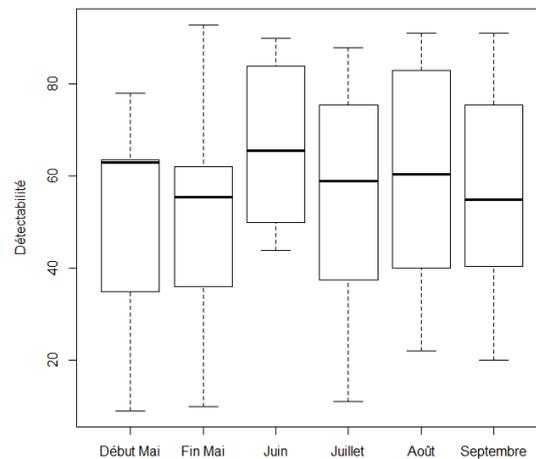


Figure 20 : Détectabilité des espèces d'Odonates en fonction de la période d'échantillonnage sur les 8 mares échantillonnées.

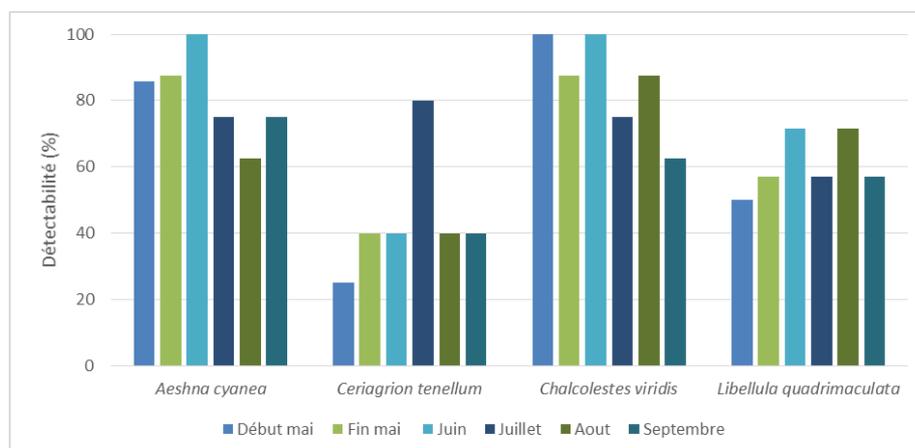


Figure 21 : Détectabilité des espèces *Aeshna cyanea* (n = 8 sites), *Ceriagrion tenellum* (n = 5 sites), *Chalcolestes viridis* (n = 8 sites) et *Libellula quadrimaculata* (n = 7 sites) en fonction de la période d'échantillonnage sur les mares où elles ont été détectées au moins une fois.

5.3 CONCLUSION POUR LES ODONATES

La méthode ADNe metabarcoding permet de détecter des espèces d'Odonates en milieux aquatiques stagnants mais n'est pas suffisamment performante à l'heure actuelle pour envisager des inventaires opérationnels pour ces espèces. En effet, plusieurs échantillonnages seraient nécessaires à différentes saisons pour fournir une image réelle des communautés d'Odonates présentes. De plus, plusieurs espèces ne peuvent pas être différenciées avec le couple d'amorces universel utilisé (alors qu'elles sont différenciables par inventaire classique), ce qui pose problème notamment lorsqu'elles ont des statuts de conservation différents.

Ces résultats ont été confortés par une autre étude menée avec l'association ODONAT sur des mares de plus grande taille à différentes périodes de l'année. La détection des espèces restait aléatoire et n'était pas reliée à l'écologie de l'espèce (stade larvaire, émergence,...).

Il serait cependant intéressant de savoir si cette détectabilité limitée des Odonates est uniquement liée à la faible quantité d'ADN présente dans le milieu ou si d'autres paramètres sont à prendre en compte. Plusieurs prélèvements pourraient ainsi être réalisés successivement sur des mares de façon à vérifier la cohérence entre les résultats des différents échantillons. Une différence significative confirmerait l'hypothèse de la présence d'une très faible quantité d'ADN dans le milieu, qui serait détectée de manière aléatoire.

Les tests réalisés sur les Odonates ont jusque-là été essentiellement menés en milieux lenticules. Il pourrait être intéressant de tester la méthode sur des milieux lotiques où le courant pourrait jouer un rôle d'homogénéisateur de l'ADN.

6 ECRESSISSES

En France, les enjeux liés aux Ecrevisses sont importants, avec des espèces concernées par des programmes de sauvegarde comme l'Ecrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*) et d'autres espèces invasives et porteuses de pathogènes comme l'Ecrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*) ou l'Ecrevisse de Californie (*Pacifastacus leniusculus*). Après avoir démontré l'efficacité de la méthode ADNe metabarcoding pour la détection des Batraciens et des Téléostéens, les développements de la technique ADNe se sont orientés vers les Ecrevisses. Cependant, la détection de ces espèces représente un défi important compte tenu du fait qu'elles libèrent probablement moins d'ADN dans le milieu que des Téléostéens ou des Batraciens. En effet, ces espèces restent au fond des masses d'eau, sont peu mobiles et possèdent une carapace qui limite les échanges d'ADN avec le milieu.

Suite à une demande faite à l'AFB par le Conseil départemental et la DDTM de l'Eure pour inventorier les Ecrevisses sur leur département, un projet a été mis en place afin de tester la détectabilité des Ecrevisses par l'ADNe metabarcoding à l'échelle nationale, en associant différents partenaires (association ODONAT, Université de Poitiers, ARFA et agences de l'eau Seine-Normandie et Rhin-Meuse).

6.1 BASE DE REFERENCES ECRESSISSES

En 2016, le génome mitochondrial complet de 6 espèces d'Ecrevisses a été séquencé par SPYGEN en collaboration avec le LECA, ENGEES et le LEIC. Les tissus des 3 autres espèces présentes en France ont été obtenus en fin d'année 2017 et sont séquencés dans la région d'intérêt (16S) (Tableau VII). Compte tenu du

faible nombre de tissus obtenus par espèce (1 ou 2), de nouveaux tissus sont nécessaires pour compléter la base de références.

Tableau VII : Liste des espèces présentes dans la base de références ADNe-Écrevisses.

Noms scientifiques	Nom vernaculaire
<i>Astacus astacus</i>	Écrevisse à pattes rouges
<i>Astacus leptodactylus</i>	Écrevisse à pattes grêles
<i>Austropotamobius pallipes</i>	Écrevisse à pattes blanches
<i>Austropotamobius torrentium</i>	Écrevisse des torrents
<i>Orconectes immunis</i>	Écrevisse calicot
<i>Orconectes juvenilis</i>	Écrevisse juvénile
<i>Orconectes limosus</i>	Écrevisse américaine
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Écrevisse de Californie
<i>Procambarus clarkii</i>	Écrevisse de Louisiane

6.2 ETUDE PILOTE POUR LES ECREVISSES

➤ Sites et espèces concernés

Pour cette étude, seuls des sites où la présence d'Écrevisses était avérée ont été choisis. Le choix s'est porté à la fois sur des sites en milieux stagnants et en milieux courants et avec des fortes ou des faibles densités d'Écrevisses (plusieurs sites pour chaque possibilité).

Suite à la demande initiale du Département de l'Eure et à l'investissement de l'AFB (DIR 1 et SD Eure et Orne), les sites ont été sélectionnés prioritairement dans l'Eure et dans l'Orne. Un complément a ensuite été réalisé par les différents partenaires du projet avec des sites dans la Vienne, dans la Gironde, dans les Vosges, dans la Moselle et dans le Bas-Rhin pour arriver à un total de 46 sites testés par l'ADNe.

Les espèces d'Écrevisses concernées par ces tests sont l'Écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*), l'Écrevisse à pattes rouges (*Astacus astacus*), l'Écrevisse à pattes grêles (*Astacus leptodactylus*), l'Écrevisse américaine (*Orconectes limosus*), l'Écrevisse de Californie (*Pacifastacus leniusculus*), l'Écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*) et l'Écrevisse calicot (*Orconectes immunis*). L'Écrevisse des torrents (*Austropotamobius torrentium*) et l'Écrevisse juvénile (*Orconectes juvenilis*) n'ont pas été étudiées du fait de leur aire de répartition très restreinte en France.

Sur chaque site, des prélèvements ADNe et des inventaires classiques ont été réalisés (recherche active ou mise en place d'habitats artificiels). Les précisions sur les sites choisis par espèce sont données dans le Tableau VIII.

➤ Résultats

Les résultats des inventaires classiques et des inventaires ADNe sont donnés dans le Tableau VIII.

Ces résultats mettent en évidence une faible détection des différentes espèces par l'approche ADNe metabarcoding. Les Écrevisses ont ainsi été détectées sur 7 sites sur 47 :

- l'Écrevisse à pattes blanches a été détectée sur le site E136 (86).
- l'Écrevisse à pattes grêles a été détectée sur la Carrière des tourelles à Aubry (61).

- L'Ecrevisse de Californie a été détectée sur la Charentonne à St Agnan de Cernières (27) et sur l'Egrenne à Beauchêne (61).

- L'Ecrevisse de Louisiane a été détectée sur le Site 3 de l'ARFA (33), sur le Plan d'eau communal de St Denis sur Sarthon (61) et sur le plan d'eau communal de Ceton (61).

Ces sites ont en commun une forte densité des espèces d'Ecrevisses présentes.

Tableau VIII : Espèces recherchées, localisation et typologie des sites échantillonnés (la typologie a été donnée avant les passages par inventaires classiques ; MC = Milieu courant ; MS = Milieu stagnant ; FoD = Forte densité ; FaD = Faible densité ; ? = Densité inconnue), informations sur les prélèvements ADNe (date, type [FC = Filtration continue ; P = Ponctuel], nombre d'échantillons) et résultat pour l'espèce recherchée par inventaire classique et par ADNe (les résultats positifs ont été mis en évidence par un fond vert).

Espèce	Localisation	Typologie	Date éch. ADNe	Type éch. ADNe	Nombre éch. ADNe	Détection par inventaire classique	Détection par ADNe
Ecrevisse à pattes blanches (<i>Austropotamobius pallipes</i>)	Sébec amont (27)	MC - FoD	20/10/2016	FC	2	OUI	NON
	La Tourville (27)	MC - FoD	20/10/2016	FC	2	OUI	NON
	Ruisseau des marnes (27)	MC - FoD	04/11/2016	FC	2	OUI	NON
	Saint Laurent (27)	MC - FaD	-	-	-	NON, site remplacé	-
	Freneuse (27)	MC - FaD	04/11/2016	FC	2	OUI	NON
	Le Bec (27)	MC - FaD	21/10/2016	FC	2	OUI	NON
	Lévière aval (27)	MC - FaD	24/10/2016	FC	2	OUI	NON
	E104 (86)	MS - FoD	07/11/2016	P	1	OUI	NON
	E121 (86)	MS - FoD	07/11/2016	P	1	OUI	NON
	E122 (86)	MS - FoD	07/11/2016	P	1	OUI	NON
	E124 (86)	MS - FoD	07/11/2016	P	1	OUI	NON
	E129 (86)	MS - FoD	07/11/2016	P	1	OUI	NON
E136 (86)	MS - FoD	07/11/2016	P	1	OUI	OUI	
Ecrevisse à pattes rouges (<i>Astacus astacus</i>)	Etang ferme des Evêques (88)	MS - FoD	11/10/2016	P	1	OUI	NON
	Etang de Francogney (88)	MS - FoD	11/10/2016	P	1	OUI	NON
	Etang St Amour (88)	MS - FoD	11/10/2016	P	1	OUI	NON

Espèce	Localisation	Typologie	Date éch. ADNe	Type éch. ADNe	Nombre éch. ADNe	Détection par inventaire classique	Détection par ADNe
Ecrevisse à pattes rouges (<i>Astacus astacus</i>)	Etang Bildmuehle (57)	MS - FaD	10/10/2016	P	1	OUI	NON
	Etang Girfontaine (88)	MS - FaD	11/10/2016	P	1	OUI	NON
	Etang Goetzenbruck (57)	MS - FaD	10/10/2016	P	1	OUI	NON
Ecrevisse à pattes grêles (<i>Astacus leptodactylus</i>)	Plan d'eau de l'Abbaye (27)	MS - FoD	31/10/2016	P	1	OUI	NON
	Mare "le long le bois" (27)	MS - FaD	07/11/2016	P	1	OUI	NON
	Plan d'eau ru du moulin neuf (61)	MS - ?	03/11/2016	P	1	OUI	NON
	Carrière des tourelles (61)	MS - ?	03/11/2016	P	1	OUI	OUI
	Etang de cachot (61)	MS - ?	-	-	-	NON, site remplacé	-
	Mare du ru vivier Tranchant (61)	MS - ?	25/10/2016	P	1	OUI	NON
Ecrevisse américaine (<i>Orconectes limosus</i>)	Sec Iton à Villalet (27)	MC - FoD	24/10/2016	FC	2	OUI	NON
	Seine à Poses (27)	MC - FoD	18/10/2016	FC	2	OUI	NON
	Iton à Bourth (27)	MC - FoD	-	-	-	NON, site remplacé	-
	Rouloir (27)	MC - FoD	17/10/2016	FC	2	OUI	NON
	Ballastière de Toutainville (27)	MS - FoD	20/10/2016	FC	2	OUI	NON
	Plan d'eau Marcilly/Eure (27)	MS - FoD	04/11/2016	P	1	OUI	NON
	Etang de cachot (61)	MS - ?	25/10/2016	P	1	OUI	NON
	Plan d'eau Reignier (27)	MS - FoD	17/10/2016	P	1	OUI	NON
Ecrevisse de Californie (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	Risle ornaise (61)	MC - FoD	08/11/2016	FC	2	OUI	NON
	Charentonne à St Agnan (27)	MC - FoD	08/11/2016	FC	2	OUI	OUI
	Egrenne à Beauchène (61)	MC - FoD	28/10/2016	FC	2	OUI	OUI
	Iton à Bourth (27)	MC - FaD	25/10/2016	FC	2	OUI	NON
	Risle à Rugles (27)	MC - FaD	-	-	-	NON, site remplacé	-

Espèce	Localisation	Typologie	Date éch. ADNe	Type éch. ADNe	Nombre éch. ADNe	Détection par inventaire classique	Détection par ADNe
Ecrevisse de Californie (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	Le Bec (27)	MC - FaD	21/10/2016	FC	2	OUI	NON
	Plan eau ru de la cote St Gilles (27)	MS - FoD	26/10/2016	P	1	OUI	NON
	Etang de la Foulrière (61)	MS - FoD	25/10/2016	FC	2	OUI	NON
	Plan d'eau ru de la Mousse (61)	MS - FoD	21/10/2016	P	2	OUI	NON
Ecrevisse de Louisiane (<i>Procambarus clarkii</i>)	Site 1 (33)	MC - FoD	04/11/2016	FC	2	OUI	NON
	Site 2 (33)	MC - FoD	04/11/2016	FC	2	OUI	NON
	Site 3 (33)	MC - FoD	04/11/2016	FC	2	OUI	OUI
	Moussonvilliers Plan d'eau (61)	MS - FoD	03/11/2016	P	2	OUI	NON
	Plan d'eau de St Denis (61)	MS - FoD	26/10/2016	P	1	OUI	OUI
	Plan d'eau de Ceton (61)	MS - FoD	25/10/2016	P	1	OUI	OUI
Ecrevisse calicot (<i>Orconectes immunis</i>)	Carrière de Kesseldorf (67)	-	13/10/2016	P	1	OUI	NON
	Lauterbourg (67)	-	13/10/2016	P	1	OUI	NON
	Gravière Beinheim (67)	-	13/10/2016	P	1	OUI	NON

➤ Discussion

L'objectif de ce projet de recherche était de tester la faisabilité de la détection des Ecrevisses par l'ADN environnemental en utilisant la méthode ADNe metabarcoding

La faible détection des Ecrevisses peut provenir en premier lieu de la faible quantité de leur ADN disponible dans le milieu. En effet, contrairement à des Batraciens ou des Téléostéens qui sont facilement détectables par leur ADN, les Ecrevisses possèdent une carapace, ce qui limite les échanges de cellules avec l'environnement. De plus, elles vivent sur le fond et sont peu mobiles, ce qui peut limiter la quantité d'ADN qu'elles libèrent dans le milieu et le rend moins disponible.

La faible performance du couple d'amorces universel utilisé pourrait également expliquer ces résultats. En effet, dans une étude menée en parallèle avec l'ARFA, deux méthodes d'analyses différentes étaient testées sur des échantillons prélevés sur des sites positifs à l'Ecrevisse à pattes blanches : les analyses ADNe barcoding spécifiques à cette espèce et les analyses ADNe metabarcoding pour toutes les Ecrevisses. La méthode ADNe barcoding permettait une détection supérieure à la méthode ADNe metabarcoding. Le couple d'amorces universel utilisé pour les Écrevisses, et testé *in situ* pour la première fois dans cette étude, se révèle donc peu efficace. Cela est notamment dû au fait qu'il n'est pas assez spécifique et amplifie l'ADN d'autres Arthropodes. Le signal ADN des Écrevisses, en plus faible quantité, est alors masqué. Les résultats

obtenus confirment que des mises au point sont nécessaires afin d'optimiser la capacité de détection de l'ADN de ce groupe taxonomique. De nouveaux couples d'amorces universels pour les Écrevisses seront ainsi créés et testés dans le cadre de futurs projets pour pallier à ce problème.

De plus, la période d'échantillonnage a été choisie de façon à optimiser la détection de l'Écrevisse à pattes blanches, qui est l'Écrevisse la plus menacée en France. La période de reproduction semble en effet être la période la plus adaptée pour réaliser l'échantillonnage car c'est le moment où les gamètes, et donc de l'ADN, sont libérés dans l'eau. Pour cette raison, la période d'échantillonnage a été choisie de mi-octobre à mi-novembre dans le cadre de cette étude. Cependant cette période correspond bien aux espèces se reproduisant en eaux froides, mais beaucoup moins à celles se reproduisant en eaux chaudes (par exemple l'Écrevisse de Louisiane). Pour certaines des espèces, la période d'échantillonnage choisie amène donc un biais dans leur détectabilité par l'ADN. Il serait intéressant, après avoir créé de nouveaux couples d'amorces universels pour les Écrevisses, de tester pour ces différentes espèces si la période d'échantillonnage influe de manière significative la détection de leur ADN.

6.3 CONCLUSION POUR LES ECREVISSSES

Quelques tissus sont encore nécessaires pour compléter la base de références des Écrevisses, mais l'enjeu réside surtout dans la création d'un nouveau couple d'amorces universel, car en l'état actuel, l'ADNe metabarcoding n'est pas suffisamment performant pour permettre une détection efficace de ces espèces. Une nouvelle étude sera mise en place ces prochaines années pour créer ce nouveau couple d'amorces et le tester.

Cette étude montre également la présence de contraintes naturelles limitant la détection de ces espèces, notamment la faible quantité d'ADN disponible dans le milieu liée à leur écologie et leur biologie. Suite à ces résultats, de nouveaux tests sont actuellement en cours, en partenariat avec la FDAAPPMA 33 dans le cadre du Programme de Sauvegarde Aquitain de l'Écrevisse à pattes blanches, et avec l'AFB pour l'Écrevisse de Louisiane et l'Écrevisse à pattes blanches. L'objectif de ces études est de tester de nouvelles capsules d'échantillonnage à porosité plus fine (0.2 μm) pour voir si l'ADN est mieux retenu et si la détectabilité de ces espèces peut ainsi être augmentée. Les résultats de ces nouveaux tests sont attendus pour le premier trimestre 2019.

Ces études permettront d'avoir une meilleure visibilité sur la possibilité d'une utilisation opérationnelle des méthodes ADNe metabarcoding pour inventorier les Écrevisses.

7 BIVALVES

Les enjeux de conservation d'espèces en milieux aquatiques courants sont nombreux. Certaines espèces sont très difficiles à inventorier du fait de leurs conditions de vie et de leur écologie. C'est par exemple le cas des espèces de Bivalves, qui peuvent être difficiles à identifier et à trouver (de par leur petite taille, leur mode de vie benthique et le fait qu'elles peuvent être cachées dans la vase ou s'enterrer). Depuis 2015, des travaux sont menés en collaboration avec Vincent Prié (Biotope / Caracol), un des spécialistes des Bivalves en France, pour créer une base de références pour les Bivalves et pour évaluer l'efficacité de la méthode ADNe metabarcoding pour la détection de ces espèces.

7.1 BASE DE REFERENCES BIVALVES

Au total, 44 espèces ont été séquencées (dans le cadre de ce programme et de projets antérieurs) sur les 45 dont la présence est connue sur le territoire français (Tableau IX). La seule espèce manquante (*Euglesa pulchella*) sera ajoutée prochainement.

Les trois sous-espèces d'*Unio mancus* sont présentes dans la base de références mais ne sont pas différenciables avec le couple d'amorces utilisé. De même dans le genre *Corbicula*, *Corbicula fluminea* et *Corbicula leana* ont la même séquence d'ADN et sont donc identifiées au genre *Corbicula sp.* mais ces deux espèces sont bien distinctes de *Corbicula fluminalis*.

Tableau IX : Liste des espèces présentes dans la base de références ADNe-France Bivalves.

Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Anodonta anatina</i>	Anodonte des rivières
<i>Anodonta cygnea</i>	Anodonte des étangs
<i>Corbicula fluminalis</i>	Corbicule striolée
<i>Corbicula fluminea</i>	Corbicule asiatique
<i>Corbicula leana</i>	Corbicule japonaise
<i>Dreissena polymorpha</i>	Moule zébrée
<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>	Moule quagga
<i>Euglesa casertana</i>	Pisidie robuste
<i>Euglesa compressa</i>	Pisidie d'Amérique
<i>Euglesa globularis</i>	Pisidie globe
<i>Euglesa henslowana</i>	Pisidie des gardons
<i>Euglesa hibernica</i>	Pisidie septentrionale
<i>Euglesa lilljeborgii</i>	Pisidie des lacs
<i>Euglesa milium</i>	Pisidie des rives
<i>Euglesa nitida</i>	Pisidie ubiquie
<i>Euglesa obtusalis</i>	Pisidie de Lamarck
<i>Euglesa personata</i>	Pisidie des sources
<i>Euglesa pseudosphaerium</i>	Pisidie des marais
<i>Euglesa subtruncata</i>	Pisidie chiendent
<i>Euglesa supina</i>	Pisidie des plaines
<i>Margaritifera auricularia</i>	Grande Mulette
<i>Margaritifera margaritifera</i>	Mulette perlière
<i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Moule d'Amérique
<i>Odhneripisidium conventus</i>	Pisidie arctique
<i>Odhneripisidium moitessierianum</i>	Pisidie des rivières
<i>Odhneripisidium tenuilineatum</i>	Petite Pisidie
<i>Pisidium amnicum</i>	Pisidie de vase
<i>Potomida littoralis</i>	Mulette des rivières
<i>Pseudanodonta complanata</i>	Anodonte comprimée
<i>Sinanodonta woodiana</i>	Anodonte chinoise
<i>Sphaerium corneum</i>	Cyclade commune
<i>Sphaerium lacustre</i>	Cyclade de vase
<i>Sphaerium nucleus</i>	Cyclade cerise
<i>Sphaerium ovale</i>	Cyclade ovale
<i>Sphaerium rivicola</i>	Grande Cyclade

Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Sphaerium solidum</i>	Cyclade des fleuves
<i>Sphaerium transversum</i>	Cyclade d'Amérique
<i>Unio crassus courtillieri</i>	Mulette ligérienne
<i>Unio crassus crassus</i>	Mulette épaisse
<i>Unio mancus mancus</i>	Mulette méridionale
<i>Unio mancus requienii</i>	Mulette rhodanienne
<i>Unio mancus turtonii</i>	Mulette corse
<i>Unio pictorum</i>	Mulette des peintres
<i>Unio tumidus</i>	Mulette enflée

7.2 ETUDES PILOTES POUR LES BIVALVES

Des tests ont été réalisés sur environ 150 sites en France de façon à tester différentes conditions environnementales : grands fleuves ou ruisseaux, eaux turbides ou limpides, eaux lotiques ou lenticques, eaux acides ou calcaires (Figure 22). Ces tests ont également permis de vérifier la détection des différentes espèces de Bivalves par l'ADNe. A ce jour, 6 espèces n'ont pas encore été détectées par l'ADNe, car elles vivent en eaux saumâtres (*Mytilopsis leucophaeata*) ou sont rares en France (*Euglesa globularis*, *Euglesa pseudosphaerium*, *Odhneripisidium conventus*, *Sphaerium solidum*, *Sphaerium transversum*).

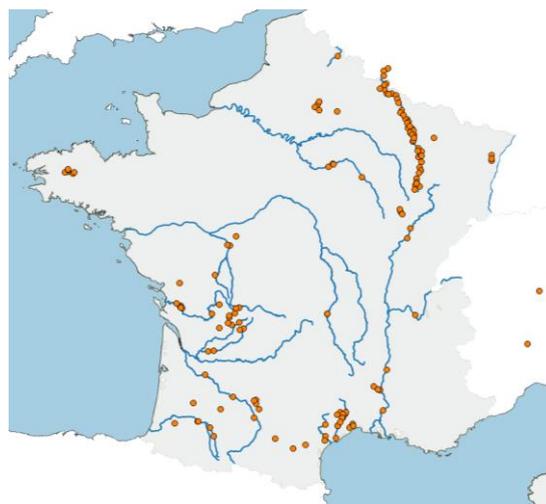


Figure 22 : Répartition des sites testés pour les Bivalves en France.

Ce rapport reprend des données obtenues via des études comparatives en cours d'eau (inventaires classiques versus ADNe), des tests de période d'échantillonnage optimale et des tests de distance de détection. Tous ces résultats sont en cours de publication.

7.2.1 Etudes comparatives sur des cours d'eau français

7.2.1.1 Premiers tests méthodologiques en eau douce

En 2015, une toute première étude a été menée afin de tester l'approche ADNe pour la détection des Bivalves dans des milieux d'eau douce.

Deux couples d'amorces universels ont été développés dans un premier temps afin d'identifier les espèces appartenant aux ordres des Unionidés et des Vénéridés. Ces amorces ont ensuite été validées par

PCR électronique (*in silico*) puis *in situ* sur 7 rivières en France où la présence de Bivalves était préalablement connue. Sur chacune de ces rivières, une à trois filtrations de 30 minutes (1L/min) ont été réalisées à l'aide d'une pompe péristaltique ainsi que des tuyaux et capsules de filtration à usage unique.

Une bonne correspondance a été obtenue entre les espèces attendues de Vénéridés et celles détectées avec l'approche ADNe. Néanmoins, pour les Unionidés, la Grande Mulette (*Margaritifera auricularia*) n'a pas été détectée sur la Creuse alors que sa présence était connue.

Ces premiers tests ont permis de montrer que lors de l'étape d'amplification d'ADN avec le couple d'amorces pour les Unionidés, des amplicons aspécifiques d'environ 1000 paires de bases étaient créés, ce qui empêchait l'amplification des réelles espèces présentes sur les sites, comme par exemple la Grande Mulette. Suite à ces premiers résultats, un nouveau couple d'amorces universel a été développé et de nouveaux tests ont été réalisés à partir de 2016.

7.2.1.2 Etudes comparatives sur 11 sites français

Suite aux premiers tests réalisés en 2015 et à la création d'un nouveau couple d'amorces universel pour les Unionidés, de nouveaux sites où la présence de Bivalves était connue ont été échantillonnés en 2016.

Pour chaque site testé, des inventaires classiques et des inventaires ADNe ont été réalisés. Les inventaires classiques consistaient à identifier les plus grandes espèces via des plongées bouteilles, de l'apnée et des observations au bathyscope et les plus petites espèces (*Sphaeridae* notamment) via du dragage de sédiments. Il est souvent difficile d'avoir des données fiables pour les *Sphaeridae* compte tenu de leur petite taille. Les prélèvements ADNe étaient basés sur des filtrations d'eau comme expliqué dans la partie précédente. Les résultats présentés dans la Figure 23 reprennent les inventaires comparatifs menés sur 4 sites en 2015 et 7 sites en 2016.

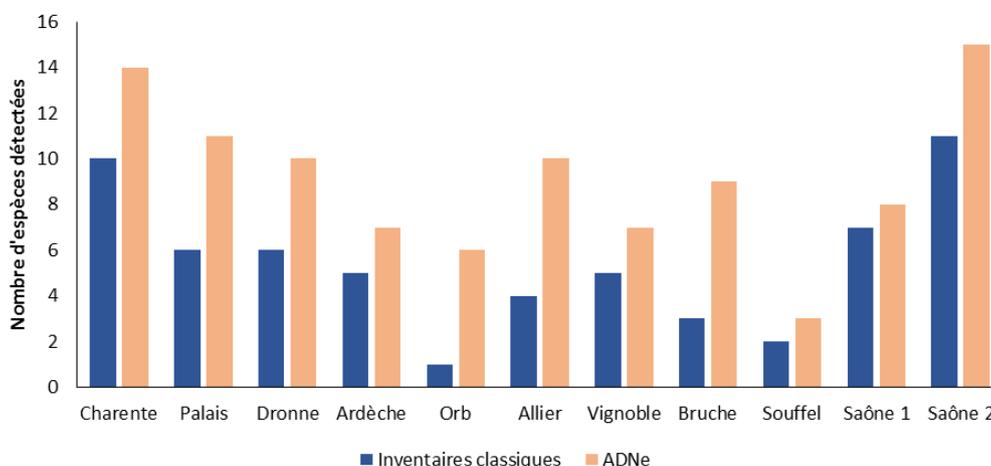


Figure 23 : Comparaisons entre les résultats obtenus par inventaires classiques et par ADNe sur 11 sites français.

Sur tous les sites, le nombre d'espèces détectées est supérieur avec l'ADNe par rapport aux inventaires classiques. Les espèces détectées en plus par l'ADNe sont cohérentes avec leur aire de répartition et les habitats disponibles sur les différents sites. Sur quelques sites (notamment le Vignoble et la Saône 1), des données historiques sont disponibles et indiquent l'identification de plusieurs espèces de coquilles de *Sphaeridae*, non détectées lors des inventaires classiques et des inventaires ADNe présentés ici. Cependant, les identifications par des coquilles vides restent complexes à interpréter car il est possible que l'espèce ne soit plus réellement vivante dans le cours d'eau. L'ADN a par contre l'avantage de ne détecter que les individus qui vont libérer de l'ADN, donc des individus vivants.

Ces comparaisons montrent l'efficacité de la méthode ADNe pour détecter des espèces difficilement identifiables par inventaires classiques.

De plus, malgré le fait qu'il ne soit pas possible de distinguer toutes les espèces de *Corbicula* et les sous espèces de *Unio mancus* avec les amorces utilisées pour les Bivalves, l'ADNe apporte une réelle plus-value pour d'autres espèces. Par exemple, il est possible de différencier les deux sous-espèces *Unio crassus crassus* et *Unio crassus courtillieri*, ce qui apporte un réel enjeu de conservation pour cette espèce protégée en France et notée en Annexe II de la Directive Habitat Faune Flore.

Lors d'études complémentaires, l'ADNe a permis de détecter deux espèces en dehors de leur aire de répartition : la Moule quagga (*Dreissena rostriformis bugensis*) et la Pisidie d'Amérique (*Euglesa compressa*). La Moule quagga a été identifiée en 2016 dans la zone aval du Rhône et en 2017 du côté de Montpellier et dans la Seine du côté de Paris. Ces détections sont en parfait accord avec les voies possibles de colonisation de l'espèce et ont été confirmées par des plongées dans le cas du Rhône (Prié & Fruget, 2017). La Pisidie d'Amérique a quant à elle été détectée en Ardèche par l'ADNe durant l'été 2016 et cette donnée a été confirmée par une publication parue peu de temps après (Mouthon & Forcellini, 2017) qui confirme la présence de cette espèce exotique en France, en particulier dans le bassin du Rhône. Ces détections mettent en évidence la capacité de la méthode ADNe à détecter les espèces de Bivalves, ce qui en fait un outil puissant notamment dans le cadre de suivi des espèces exotiques.

7.2.2 Détection des espèces de Bivalves sur l'année

En 2017, l'association Caracol a prélevé deux échantillons sur une station de l'Orb environ tous les deux mois (Janvier, Avril, Juin, Août, Octobre, Décembre) pour identifier la période d'échantillonnage optimale pour la détection des Bivalves.

Sur ce cours d'eau, la période optimale est le mois d'Avril avec 10 espèces détectées (Figure 24). Les trois taxons majoritaires (*Anodonta anatina*, *Potamida littoralis* et *Corbicula sp.*) sont détectés toute l'année. Neuf autres espèces sont détectées plus aléatoirement au cours de l'année. Ces résultats ne semblent pas concorder avec les pics de reproduction de chaque espèce et sont par conséquent difficilement interprétables.

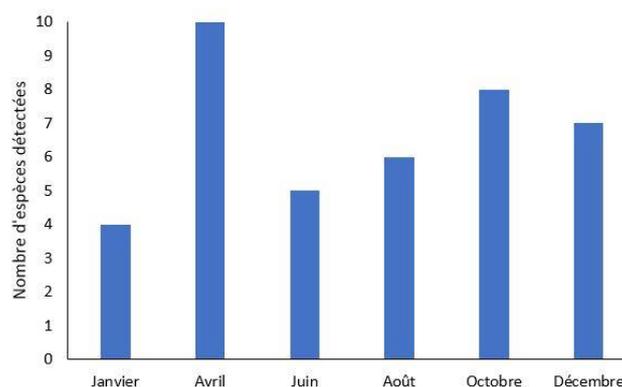


Figure 24 : Nombre d'espèces détectées au cours de l'année sur l'Orb.

Tout comme pour les tests réalisés sur les Téléostéens, il serait intéressant de relier ces résultats avec les paramètres hydrologiques aux différentes périodes d'échantillonnage. Il a par exemple été montré dans d'autres tests sur les Bivalves que des prélèvements en période de crue permettaient de détecter de nouvelles espèces, potentiellement présentes plus à l'amont.

D'après ces résultats la période permettant d'identifier le moins d'espèces est en Janvier. Tout comme pour les autres groupes taxonomiques, il est conseillé d'éviter la période d'échantillonnage hivernale qui n'apporte pas toujours des résultats pertinents. Avant de conclure sur une période d'échantillonnage optimale pour les Bivalves, des tests complémentaires doivent être réalisés sur d'autres cours d'eau. Les résultats en provenance d'autres études et d'autres groupes taxonomiques tendent à indiquer que la meilleure période d'échantillonnage reste la période de reproduction avec un apport important d'ADN via les gamètes.

7.2.3 Distance de détection du signal ADN des Bivalves

En 2016, des tests ont été réalisés pour évaluer la distance du signal ADN pour les Bivalves. Pour cela, trois échantillons ont été prélevés sur la Charente juste en aval d'une zone où les Grandes Mulettes (*Margaritifera auricularia*) sont présentes sur plusieurs kilomètres, puis à plusieurs distances en aval de cette population (Figure 25). Cette station a été choisie car un barrage est présent en aval et produit un envasement important et continu sur tout le lit. Cet envasement progresse vers l'amont jusqu'en limite des populations de Grandes Mulettes, c'est pourquoi l'hypothèse de départ est que, en aval de la population connue, les habitats sont trop défavorables pour la présence de l'espèce.

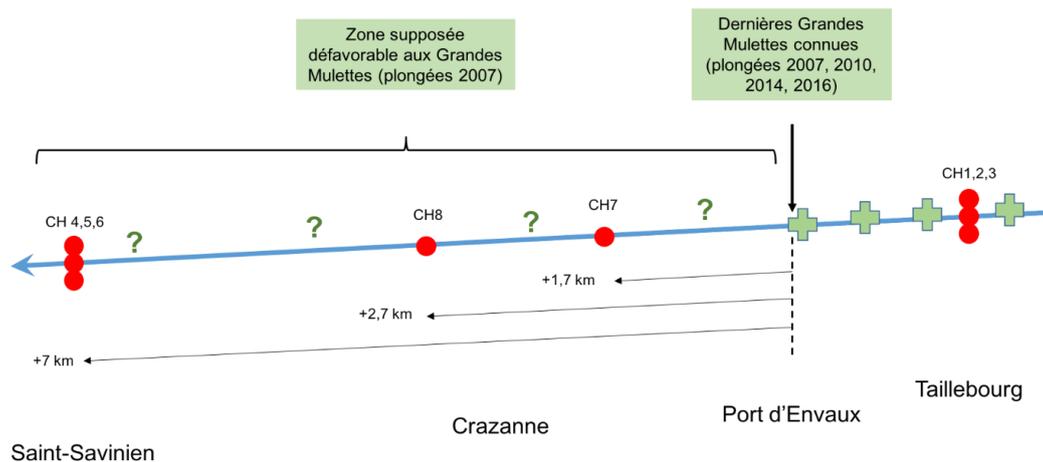


Figure 25 : Schéma de la stratégie d'échantillonnage adoptée pour les tests de distance de détection des Bivalves sur la Charente.

Les espèces détectées par l'ADNe sont cohérentes au regard des connaissances actuelles des espèces présentes sur la Charente. Ces résultats permettent toutefois de confirmer que les espèces observées uniquement sous forme de coquilles vides (*Pseudanodonta complanata*, *Unio pictorum*) vivent toujours dans la Charente. Ces espèces n'ayant jamais été observées vivantes malgré une pression d'observation importante (plongées en équipe en 2007, 2010, 2014 et 2016), les résultats obtenus montrent l'efficacité de la technique par rapport aux inventaires traditionnels.

La Grande mulette a été détectée par l'ADNe sur tout le linéaire concerné (soit 7 kilomètres) malgré le fait que l'espèce ne soit présente qu'en amont des premiers échantillons d'après les inventaires classiques.

Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats :

Premièrement, la distance de détection serait supérieure à 7 km. Cette hypothèse correspondrait aux résultats obtenus pour les Téléostéens (cf. 3.2.4) où la distance de détection est dépendante du caractère

hydrologique du cours d'eau et peut aller de quelques kilométriques pour un petit cours d'eau à plusieurs dizaines de kilomètres pour un grand cours d'eau.

Deuxièmement, il est toujours possible que des poches de milieu favorable pour l'espèce se trouvent au sein de zones globalement défavorables, ce qui rendrait finalement possible la présence de la Grande mulette sur ce linéaire. Seules des plongées ciblées sur les secteurs considérés comme favorables permettraient de le confirmer.

La question de distance du signal a également été posée pour d'autres espèces. Ainsi, sur les mêmes stations que pour la Grande Mulette, la distance de détection a été testée pour l'Anodonte comprimée (*Pseudanodonta complanata*). Cette espèce est détectée dans le prélèvement CH8 mais pas dans les prélèvements CH4, 5 et 6, ce qui indique une distance de détection inférieure à 4 km. Pour cette espèce, les populations sont de faible densité, ce qui pourrait expliquer pourquoi la distance est inférieure à celle trouvée pour la Grande Mulette (si la première hypothèse est vérifiée). De même, sur le bassin versant de l'Hérault où plusieurs échantillonnages ont été réalisés avec au moins 10 km de distance, les communautés de Bivalves détectées se révèlent bien différentes (Figure 26), ce qui laisse penser à une distance de détection inférieure à la dizaine de kilomètres. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en cours d'eau pour les Téléostéens.

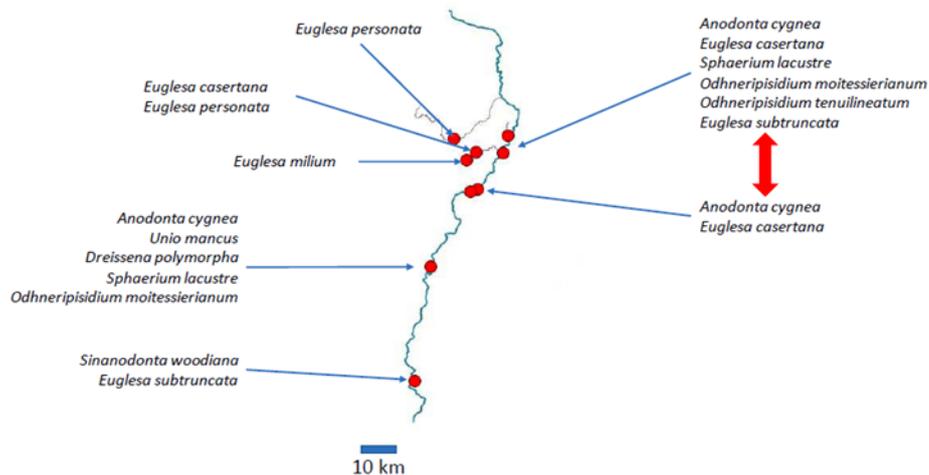


Figure 26 : Etude de la distance de détection sur le bassin versant de l'Hérault ; ©V. Prié.

7.3 CONCLUSION SUR LES BIVALVES

Depuis 2015, les tests menés dans le cadre de ce projet de recherche ont permis de montrer que la méthode ADNe metabarcoding est un outil d'inventaire performant pour le groupe des Bivalves, autant pour la détection d'espèces protégées que d'espèces exotiques.

L'état actuel de la base de références et les amorces utilisées pour les Unionidés et les Vénéridés permettent d'obtenir des résultats fiables et interprétables. Chaque méthode étant perfectible, il pourrait encore être possible de travailler sur les couples d'amorces de façon à éviter que certaines taxons présents régulièrement en très forte densité tels que les genres *Dreissena* ou *Corbicula* ne viennent masquer la présence d'autres espèces de Vénéridés moins représentées. En réalisant un grand nombre d'échantillons sur des cours d'eau tests, il serait également intéressant de voir si le fait d'augmenter l'effort d'échantillonnage donne une information significativement différente sur les communautés présentes (actuellement deux échantillons sont réalisés par site en milieu aquatique courant).

Les tests déjà réalisés sur la période d'échantillonnage optimale et la distance de détection donnent des premiers éléments de réponse. Le nombre d'espèces maximum est détecté en Avril alors que le minimum est en période hivernale, en Janvier. Des tests complémentaires sur de nouveaux cours d'eau permettraient de valider ces tendances. Pour ce qui est de la distance de détection, elle semble dépendante de la taille du cours d'eau (au même titre que pour les Poissons), allant de quelques kilomètres pour les plus petits à plus de 7 kilomètres pour des plus grands. Des analyses sont en cours sur une centaine de sites répartis sur la Meuse (étude menée avec la DREAL Grand Est et le LECA) et le Rhône (étude menée avec la CNR) et permettront d'acquérir de nouvelles informations sur les distances de détection dans le cas de grands d'eau.

8 CONCLUSION GENERALE

Depuis 2014 et le début de la convention entre SPYGEN et l'AFB, de nombreuses études ont été menées sur les Téléostéens, les Batraciens, les Odonates, les Ecrevisses et les Bivalves. La méthode ADNe metabarcoding a révélé ses forces et ses faiblesses, avec une très bonne détectabilité des espèces dans le cas des Batraciens, des Téléostéens et des Bivalves et des résultats plus mitigés sur les Ecrevisses et les Odonates. La performance de la méthode est grandement dépendante de l'écologie des espèces. Certaines espèces vont ainsi naturellement libérer plus d'ADN dans le milieu, via leur mode de vie (par exemple les Bivalves sont des filtreurs, les Poissons sont très mobiles dans leur environnement) et leurs caractéristiques morphologiques (surfaces d'échange importantes au niveau des branchies pour les Poissons et les Bivalves ainsi que de la peau pour les Amphibiens, contrairement aux Ecrevisses et aux Odonates).

La méthode ADNe ne peut cependant pas répondre à toutes les questions, il est donc important de l'utiliser dans un contexte adapté. A ce jour, la méthode ADNe metabarcoding permet d'inventorier les espèces mais elle ne peut par exemple pas donner d'informations sur la taille des populations, l'âge et le sexe des individus. Cette méthode reste donc complémentaire des méthodes d'inventaires classiques et peut être utilisée en première étape pour identifier les espèces présentes sur un secteur donné, avant d'utiliser les méthodes classiques pour en apprendre plus sur certaines espèces à une échelle plus locale.

Dans tous les cas, il est nécessaire d'avoir un regard critique d'écologue sur toute l'expertise de façon à localiser dès le début de l'étude les meilleurs endroits où réaliser les échantillonnages et par la suite interpréter de façon fiable les résultats, en prenant en compte le territoire (connexions possibles via des affluents ou des étangs, présence de stations d'épuration ou d'élevage à proximité,...) et l'écologie des espèces (période de reproduction, habitats préférentiels,...).

Il est également important de noter que la performance de la méthode ADNe metabarcoding dépend de la bonne mise en œuvre de nombreuses étapes : échantillonnage, extraction d'ADN, amplification d'ADN, séquençage nouvelle génération, analyses bio-informatiques. Afin d'avoir des résultats interprétables et comparables, notamment lors de suivis temporels ou spatiaux, il est donc essentiel de standardiser toutes ces étapes.

La présente convention a permis de développer des bases de références et de réaliser les premiers tests de détection pour plusieurs groupes taxonomiques. Les travaux de recherche vont maintenant continuer à travers de nouveaux projets, comme notamment le projet READ-FISH mis en place pour les grands milieux stagnants en collaboration avec IRSTEA, l'AFB et l'INRA et à plus large échelle le projet ALIVE (All Life Inventory using eDNA). Le projet ALIVE (2018-2020), financé dans la cadre du Programme d'Investissements d'Avenir (PIA), a pour objectifs de standardiser les méthodes ADNe pour le suivi de la biodiversité globale et de créer une plateforme web de cartographie pour favoriser le partage et le traitement de ces données génétiques. Il vise également à concevoir de nouveaux indicateurs de biodiversité permettant d'évaluer

efficacement l'état de santé des écosystèmes à l'échelle mondiale et de suivre leur évolution au cours du temps (Figure 27).

L'AFB et de nombreux acteurs publics et privés internationaux (WWF US, Université de Montpellier, CNRS, etc.) seront associés à ce projet et à la mise en place d'un Observatoire mondial de la biodiversité par l'ADNe.

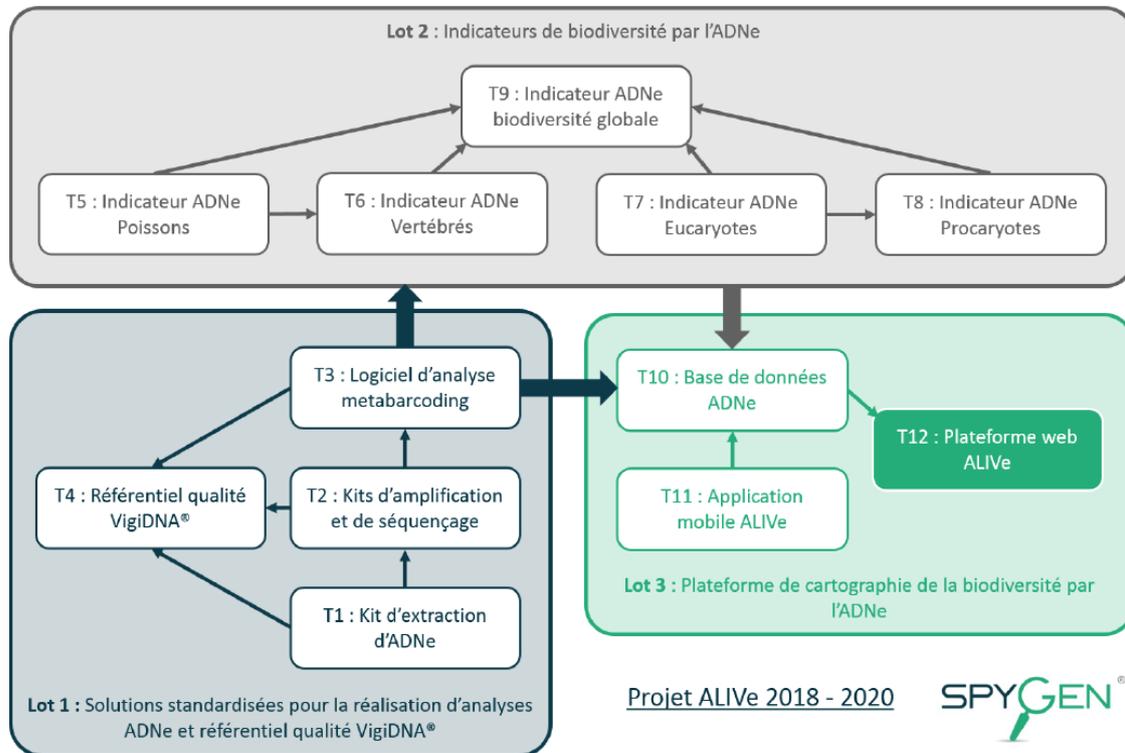


Figure 27 : Les différentes étapes du projet ALIVE.

9 PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES LIEES A CE PROGRAMME

Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J.-C., Bonin, A., Taberlet, P., Pont, D. 2016. Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. PLoS ONE 11(6): e0157366.

Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civade, R., Jean, P., Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H., Dejean, T. 2018. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. SCI Reports 8: 10361.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P., Bellemain, E., Besnard, A., Croissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P. R., Willerslev, E., Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. Molecular Ecology 25, 929-942.

10 AUTRES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Arntzen, J.W., Recuero, E., Canestrelli, D., Martínez-Solano, I. 2013. How complex is the *Bufo bufo* species group? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69 (3), 1203-1208.

Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R.A., Foster, J., Wilkinson, J.W., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P., Dunn, F. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183, 19-28.

Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C. 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoSOne* 6 (8), 1-4.

Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., Miaud, C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* 49 (4), 953-960.

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4, 423-425.

Lopes, C. M., Sasso, T., Valentini, A., Dejean, T., Martins, M., Zamudio, K. R., Haddad C. F. B., 2017. eDNA metabarcoding: a promising method for anuran surveys in highly diverse tropical forests. *Molecular Ecology Resources* 17, 904-914.

Mouthon, J., Forcellini, M., 2017. Genetic evidence of the presence in France of the North American species *Euglesa compressa* Prime, 1852 (Bivalvia, Sphaeriidae). *BioInvasions Records* 6 (3), 225-231.

Prié, V., Fruget J.-F., 2017. Heading south: new records of the invasive quagga mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in France and further perspectives. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 418 (37).

Secondi, J., Dejean, T., Valentini, A., Audebaud, B., Miaud, C. 2016. Detection of a global aquatic invasive amphibian, *Xenopus laevis*, using environmental DNA. *Amphibia-Reptilia* 37, 131-136.

Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., Coissac, E., 2018. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. 10.1093/oso/9780198767220.001.0001.

Zucca M., Meunier C., 2018. De l'ADN pour l'inventaire des mares. *Biodiversitaire* 6, 94-100.

11 ANNEXES

L'Annexe 1 est fournie sous format Excel et est composée de deux feuilles :

- la feuille 1 correspond à la liste des 120 espèces de Téléostéens présentes en France, aux actuels tissus présents dans la base de références génétiques pour chaque espèce en fonction des pays de provenance (France, Autriche, Belgique, Pays-Bas) et aux tissus demandés pour compléter la base de références.

- la feuille 2 reprend les informations sur les différents tissus et ADN provenant de France actuellement présents dans la base de références Téléostéens.



Tél. : +33 (0)4 79 26 15 83
contact@spygen.com

SPYGEN S.A.S.
Savoie Technolac - BP274
17, rue du Lac Saint-André
73375 Le Bourget du Lac Cedex
FRANCE

www.spygen.com