



HAL
open science

QuantiFish_Développement de méthodes ADNe quantitatives pour l'étude de la phénologie des poissons en lacs

Marine Vautier, Chloé Goulon, Jean Guillard, Clément Rautureau, Hervé
Rogissart, Isabelle Domaizon

► To cite this version:

Marine Vautier, Chloé Goulon, Jean Guillard, Clément Rautureau, Hervé Rogissart, et al.. QuantiFish_Développement de méthodes ADNe quantitatives pour l'étude de la phénologie des poissons en lacs. INRAE. 2023. <hal-04887692>

HAL Id: hal-04887692

<https://hal.inrae.fr/hal-04887692v1>

Submitted on 15 Jan 2025

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.



HAL Authorization



INRAE



QuantiFish

Développement de méthodes ADNe quantitatives
pour l'étude de la phénologie des poissons en lacs

VAUTIER Marine
GOULON Chloé
GUILLARD Jean
RAUTUREAU Clément
ROGISSART Hervé
& DOMAIZON Isabelle

Pôle R&D ECLA

Site INRAE d'Aix-en-Provence
3275 route Cézanne – 13100 Le Tholonet

<https://professionnels.ofb.fr/fr/pole-ecla-ecosystemes-lacustres>

SOMMAIRE

I.1 L'ADNe pour l'étude de la biodiversité en eau douce	4
I.2 Les étapes de l'analyse ADNe à partir d'échantillons d'eau	5
I.2.1 Approche « metabarcoding »	6
I.2.2 Approche « barcoding » & quantification d'espèces ciblées.....	6
I.3 Les génomes et gènes ciblés pour l'étude des populations de poissons	7
I.4 L'ADNe pour l'étude de la phénologie de la reproduction des poissons	8
II. Objectifs du projet QuantiFish.....	11
III. Matériel et méthodes.....	14
III.1 Site d'étude et espèces ciblées.....	14
III.1.1 Site d'étude	14
III.1.2 Corégone	14
III.1.3 Perche	15
III.1.4 Brochet.....	16
III.1.5 Omble chevalier	18
III.2 Prélèvements et échantillonnage.....	19
III.2.1 Suivis traditionnels	19
III.2.2 Prélèvement de l'eau et filtration.....	20
III.3 Analyses ADNe : de l'extraction à l'échantillonnage.....	22
III.3.1 Extraction de l'ADN à partir d'eau et de tissus	22
III.3.2 Design et test des amorces	22
III.3.3 Analyses ddPCR	24
IV. Résultats et Discussion	28
IV.1 Validation des essais ddPCR	28
IV.1.1 Tests de spécificité	28
IV.1.2 Tests de sensibilité	30
IV.2 Comparaison entre suivis traditionnels et ADNe	32
IV.2.1 Cas du corégone	32
IV.2.2 Cas de la perche.....	34
IV.2.3 Cas du brochet	35
IV.2.4 Cas de l'omble chevalier.....	36
IV.2.5 L'utilisation d'espèces ADNe contrôles	37
IV.3 Cibles génomiques nucléaires et mitochondriales	37
IV.3.1 Cas du corégone	38
IV.3.2 Cas de l'omble chevalier.....	39
IV.3.3 Cas du brochet	39
IV.4 Distribution spatiale et persistance du signal	41
IV.4.1 Variabilité spatiale.....	41
IV.4.2 Distribution verticale du signal ADNe	45
IV.4.3 Persistance temporelle	45
IV.5 Comparaisons méthodologiques	47
IV.5.1 ddPCR vs metabarcoding.....	47
IV.5.2 Filtres ouverts vs filtres encapsulés.....	50
V. Conclusions et perspectives	53
VI. Références bibliographiques.....	58

I

Introduction



Introduction

I.1 L'ADNe pour l'étude de la biodiversité en eau douce

Dans la crise mondiale actuelle de la biodiversité, les habitats d'eau douce ont été classés parmi les écosystèmes les plus vulnérables (Dudgeon et al., 2006 ; WWF, 2020). Il a notamment été démontré que l'augmentation de la température de l'eau et le raccourcissement des hivers peuvent avoir un impact sur la reproduction des poissons, en entraînant par exemple la modification du moment du frai et de la durée d'incubation des œufs (par exemple, Stewart et al., 2021 ; Lyons et al., 2015 ; Starzynski et Lauer, 2015). Afin d'enrayer le déclin de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes des habitats d'eau douce, divers cadres législatifs, tels que la directive-cadre sur l'eau de l'UE (DCE), ont été mis en place, et exigent de solides méthodes d'évaluation de la biodiversité afin d'assurer l'intégrité biologique des systèmes protégés (Birk et al., 2012 ; Bohan et al., 2017 ; Leese et al., 2018).

L'utilisation de l'ADN environnemental (ou ADNe) a révolutionné la façon dont nous assurons le suivi de la biodiversité, et en particulier dans les systèmes aquatiques (Deiner et al., 2017 ; Cristescu & Hebert, 2018 ; Pawlowski et al., 2018 ; Ruppert et al., 2019 ; Beng & Corlett, 2020). L'ADNe est défini comme l'ADN extrait à partir d'un échantillon environnemental sans isoler au préalable aucun organisme cible (Taberlet et al., 2012). L'échantillon peut être de l'eau, du sol, des sédiments, de l'air, des fèces ou des contenus intestinaux ou même des sources anciennes comme des carottes de glace, de sédiments ou de pergélisol (Taberlet et al., 2012 ; Thomsen & Willerslev, 2015). En ce qui concerne les macroorganismes, cet ADN retrouvé dans l'environnement provient de la libération de matériel génétique dans l'environnement, par exemple par la desquamation des cellules de la peau, de poils ou d'écaillés, l'excrétion de fluides corporels, la défécation ou encore la libération de gamètes (Pawlowski et al., 2020) (Figure 1).

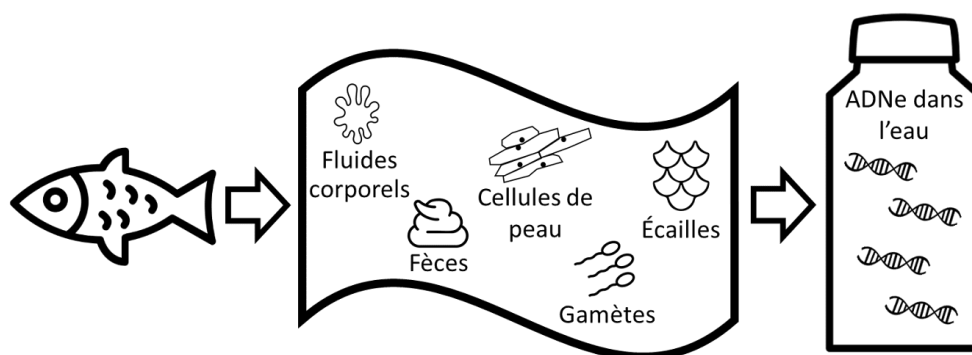


Figure 1 : Schéma représentant les sources d'ADNe libéré par les poissons dans l'environnement (eau).

En eau douce, les avantages majeurs des méthodes basées sur l'ADNe pour le biomonitoring sont, (1) leur caractère non invasif, qui n'entraîne que peu ou pas de perturbations pour les espèces et

les systèmes et notamment lorsqu'elles ciblent les macroorganismes, (2) l'efficacité en termes de temps et de coûts, qui permet de surveiller la biodiversité sur de grandes échelles spatiales et temporelles, (3) la grande sensibilité de détection, qui permet de détecter de manière fiable les espèces rares ou furtives ou les premiers stades des invasions biologiques et (4) l'universalité de l'échantillonnage, qui permet d'évaluer la biodiversité sur une large gamme taxonomique à l'aide du même échantillon d'ADNe (Goldberg et al., 2016 ; Deiner et al., 2017 ; Shaw et al., 2017 ; Pawlowski et al., 2018 ; Beng & Corlett, 2020).

La dynamique de la production, de la distribution spatio-temporelle, de la persistance et de la dégradation de l'ADNe dans le milieu est un sujet sur lequel les recherches se sont concentrées ces dernières années (Turner et al., 2015 ; Eichmiller et al., 2016 ; Tsuji et al., 2017 ; Allan et al., 2020 ; Wood et al., 2020). Cette dynamique est d'une importance décisive pour estimer la robustesse, la sensibilité ainsi que la pertinence des conclusions tirées de toute étude d'ADNe. Par exemple, en fonction de divers facteurs environnementaux, tels que la température, le pH, le rayonnement UV ou la disponibilité de l'oxygène, l'ADNe dans les systèmes aquatiques peut se dégrader en quelques jours jusqu'à devenir indétectable (Barnes et al., 2014 ; Barnes & Turner, 2016 ; Seymour et al., 2018) ou persister jusqu'à des centaines voire des milliers d'années dans un état analysable dans les sédiments des systèmes d'eau douce (par exemple, Giguet-Covex et al., 2019). De même, l'ADNe dans les systèmes lotiques peut être transporté en aval sur quelques centaines de mètres seulement (Jane et al., 2015 ; Wilcox et al., 2016) ou jusqu'à des dizaines de kilomètres (Deiner & Altermatt, 2014 ; Pont et al., 2018). Les facteurs environnementaux à l'origine de cette dynamique sont très variables d'un système à l'autre et nécessitent des évaluations spécifiques de l'habitat (Harper et al., 2019 ; Sales et al., 2021).

Des facteurs biotiques sont également en jeu pour expliquer notamment le taux d'émission de l'ADNe dans l'environnement ; l'émission peut en effet être influencée par l'âge des organismes chez les poissons (Maruyama et al., 2014), leur activité et métabolisme (de Souza et al., 2016 ; Stewart 2019). Ces niveaux d'activité ainsi que l'utilisation de l'espace par les espèces ne sont pas indépendants des facteurs abiotiques (ex. température). La phénologie, les déplacements pour l'utilisation des habitats peuvent varier au cours de l'année (zone refuge pour les juvéniles, lieux de nutrition...) et ainsi induire une répartition variable de l'ADNe dans le milieu d'étude (Ghosal et al., 2018). Les périodes de reproduction en particulier sont a priori des périodes de fort relargage d'ADNe (Di Muri et al. 2022; Tsuji et Shibata 2020).

I.2 Les étapes de l'analyse ADNe à partir d'échantillons d'eau

Dans le cas d'échantillons d'eau, l'ADNe qui est disséminé dans l'eau est concentré par filtration, centrifugation ou précipitation, puis cet ADN est purifié par une étape d'extraction de l'ADN (Shaw et al., 2017 ; Ruppert et al., 2019). L'étape suivante cible spécifiquement l'ADN du taxon, du groupe ou de l'espèce d'intérêt. Le niveau taxonomique peut aller de l'espèce individuelle à des domaines entiers, voire à la "biodiversité totale" (Compson et al., 2020) et dicte également la méthode utilisée pour la

détection de l'ADN ciblé dans un échantillon d'ADNe, le « barcoding » ou le « metabarcoding ».

1.2.1 Approche « metabarcoding »

Le metabarcoding est la méthode la plus couramment appliquée pour caractériser la composition en espèces de communautés biologiques diversifiées (espèces multiples, groupes d'espèces). Dans ce cas, des amorces dites généralistes ou universelles sont utilisées pour amplifier un marqueur cible du groupe à partir de l'extrait d'ADNe. Le marqueur génétique ainsi amplifié est ensuite soumis à une étape de séquençage à haut débit (HTS) qui permet de séquencer en parallèle un grand nombre d'échantillons. Les séquences obtenues sont ensuite comparées à des séquences disponibles dans les bases de référence afin d'identifier la composition en espèces de chaque échantillon séquençé (Taberlet et al., 2012 ; Shaw et al., 2017 ; Ruppert et al., 2019).

1.2.2 Approche « barcoding » & quantification d'espèces ciblées

Cette approche vise à détecter l'ADN d'espèces individuelles. Si la méthode de barcoding peut elle aussi être associée au séquençage pour caractériser l'identité génétique d'une espèce. Cette approche est également largement appliquée pour quantifier la cible d'intérêt. Il peut s'agir dans ce cas d'utiliser l'amplification en chaîne par polymérase en temps réel ou quantitative (qPCR). Pour cela, des amorces spécifiques à l'espèce, qui peuvent être marquées par fluorescence ou associées à des sondes d'hydrolyse, sont utilisées pendant l'amplification par PCR. La présence de l'ADN cible dans l'extrait d'ADNe est déduite par une augmentation du signal de fluorescence pendant la PCR (Logan et al., 2009 ; Doi, Takahara et al., 2015). Au cours des dernières années, la PCR digitale (dPCR), et plus particulièrement la PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) sont apparues comme des méthodes alternatives à la qPCR pour la détection de signaux ADN rares. La ddPCR génère des milliers de gouttelettes de l'ordre du nanolitre pendant la PCR, chacune d'entre elles contenant idéalement une ou aucune copie de l'ADN cible. La PCR est effectuée dans chaque gouttelette en parallèle à l'aide de sondes marquées par fluorescence et la présence de la cible est déduite par une mesure finale du signal de fluorescence dans toutes les gouttelettes en parallèle (Hindson et al., 2011 ; Doi et al., 2015) (Figure 2). La ddPCR a l'avantage d'être quantitative (Nathan et al., 2014) et plus efficace que la qPCR pour détecter les organismes aquatiques rares, y compris les poissons (Wood et al., 2019 ; Brys et al., 2020 ; Doi, Uchii, et al., 2015). En outre, par rapport à la qPCR, la dPCR est plus répétable et reproductible (Pinheiro et al, 2012), plus précise (Sanders et al., 2011), plus rapide, moins coûteuse (Nathan et al., 2014), et plus tolérante à la présence d'inhibiteurs (Doi, Takahara, et al., 2015 ; Hoshino et Inagaki, 2012).

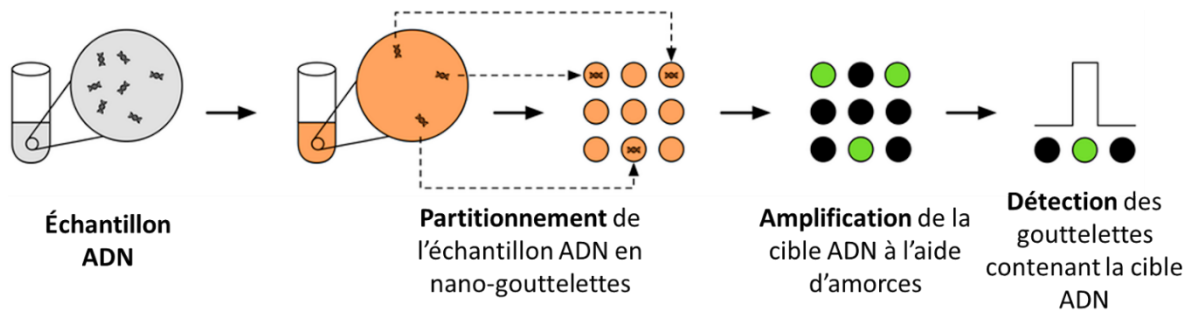


Figure 2 : Schéma représentant les principales étapes d'analyses ADN à l'aide de la technologie de PCR digitale en gouttelettes (ddPCR).

I.3 Les génomes et gènes ciblés pour l'étude des populations de poissons

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est généralement ciblé lors des analyses ADN car les cellules somatiques possèdent de nombreuses mitochondries, et donc de nombreuses copies du génome mitochondrial par cellule. Le génome nucléaire quant à lui, n'est présent qu'en une seule copie par cellule (Figure 3). En ciblant l'ADNmt on a donc un signal qui sera a priori plus fort que celui provenant de l'ADN nucléaire (ADNnu).

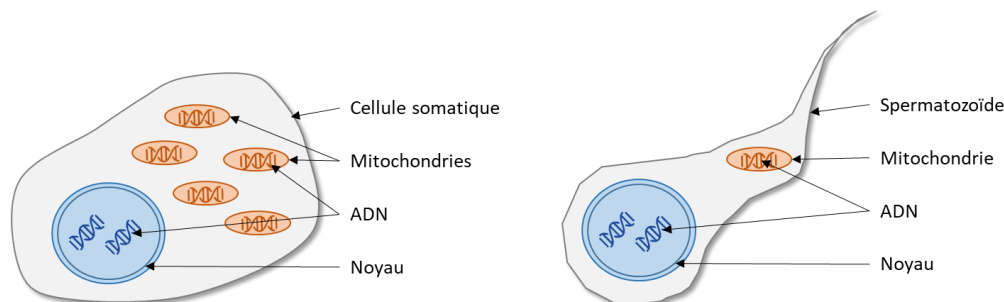


Figure 3 : Schéma représentant les différences de composition en ADN nucléaire et mitochondrial entre les cellules somatiques et les spermatozoïdes.

Les gènes marqueurs couramment utilisés pour les études ADN ciblant les poissons sont donc des gènes mitochondriaux, comme la sous-unité I de la cytochrome c-oxydase (COI) (Bakker et al., 2017, Leray et al., 2013 ; Simpfendorfer et al., 2016 ; Stoeckle et al., 2017), le cytochrome b (Hanfling et al., 2016 ; Jo et al., 2019 ; Lacoursière-Roussel et al., 2016 ; Murakami et al., 2019). Les ARN ribosomiques (ARNr), l'ARNr 16S et l'ARNr 18S, ont été utilisés dans quelques études (Bessey, Jarman et al., 2020 ; Stat et al., 2019), mais ces dernières années, l'ARNr 12S est de plus en plus utilisé dans les études ADN ciblant les poissons (Andruszkiewicz et al., 2017 ; Kelly et al., 2014 ; Lafferty et al., 2020 ; Miya et al., 2015 ; Stoeckle et al., 2017, 2020 ; Thomsen et al., 2016 ; Yamamoto et al., 2017). Les amorces basées sur l'ARNr 12S offrent cependant une résolution taxonomique similaire à celle des amorces basées sur le gène COI (Bylemans et al., 2018).

Que ce soit pour le « metabarcoding » ou le « barcoding », l'existence de bases de données riches en séquences d'intérêt est indispensable pour l'assignation taxonomique des séquences identifiées par séquençage ou pour la création d'amorces spécifiques. Malgré la richesse des données de séquences disponibles, les bases de données axées sur les organismes aquatiques sont moins complètes que pour les organismes terrestres, les organismes aquatiques sont souvent sous-représentés ou absents des bases de données de référence (Iwasaki et al., 2013 ; Wangensteen & Turon, 2017). Parmi les bases de données intégrant des séquences ciblant les poissons, on peut mentionner le Barcode of Life Data System (BOLD), qui contient principalement des séquences COI provenant des règnes animal, végétal, fongique et protiste (Ratnasingham & Hebert, 2007). Le « National Center for Biotechnology Information » (NCBI) maintient des bases de données de séquences nucléotidiques générales comme GenBank et la base de données RefSeq, ainsi que des bases spécialisées comme les ressources génomiques des organelles et les bases de données BLAST de l'ARN ribosomal (Sayers et al., 2019). Actuellement il existe une seule ressource publique spécifique aux poissons : la base de données MitoFish qui regroupe les génomes mitochondriaux complets de plus de 3000 espèces et partiels de plus de 40 000 espèces (Iwasaki et al., 2013 ; Sato et al., 2018, www.mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp, 2023). Les gènes mitochondriaux étant majoritairement ciblés dans les études ADNe, les bases de données disponibles contiennent principalement des séquences mitochondriales, et il est difficile de trouver des séquences nucléaires pour les poissons. Les quelques études qui se sont intéressées à l'ADNe nucléaire chez les poissons ont ciblées le gène « Internal Transcribed Spacer 1 » (ITS1), gène ribosomique nucléaire possédant un taux de mutation élevé et permettant donc une bonne différenciation entre les espèces (Bylemans et al., 2017 ; Wu et al., 2023)

I.4 L'ADNe pour l'étude de la phénologie de la reproduction des poissons

Ces dernières années, l'utilisation des méthodes ADNe pour l'inventaire des espèces de poissons a bénéficié de nombreuses améliorations méthodologiques (Bessey, Keesing et al., 2020 ; Miya et al., 2020, Rourke et al., 2021) et peut offrir une alternative aux outils de suivi conventionnels. Des applications récentes ont également démontré le potentiel de l'ADNe pour suivre les périodes de frai des poissons (Thalinger et al. 2019 ; Bylemans et al. 2017) ce qui est crucial pour étudier les effets des pressions anthropiques et climatiques sur la dynamique des populations de poissons, et in fine proposer des actions de gestion et conservation des espèces de poissons.

Pour suivre l'activité de frai des poissons, les méthodes sont généralement invasives (par exemple, la pêche au filet maillant ou la collecte d'œufs fécondés) ou traumatisantes (par exemple, la pêche électrique ou la télémétrie acoustique), et les méthodes non invasives (par exemple, les inventaires visuels ou les inventaires acoustiques) sont sensibles aux biais des observateurs et aux erreurs d'identification taxonomique (Lefort et al. 2015 ; Bylemans et al. 2017). Les méthodes ADNe pourraient représenter une approche alternative si les protocoles appliqués fournissent une information quantitative suffisamment robuste pour détecter les début, fin et pics d'activité de reproduction des

poissons avec précision. Une corrélation entre la concentration d'ADNe de poisson dans l'eau et son activité de frai a été démontrée dans les rivières pour les espèces de poissons diadromes (Gingera et al., 2016 ; Tillotson et al., 2018 ; Antognazza et al., 2019 ; Bracken et al., 2019) et potamodromes (Thalinger et al., 2019). Pour les espèces de poissons non migrateurs, différentes approches basées sur l'ADNe ont été développées dans les rivières, comme l'étude de l'activité de frai de la perche australienne Macquarie (*Macquaria australasica*), en comparant les ratios d'ADNe nucléaire et mitochondrial (Bylemans et al., 2017) ou la corrélation entre le signal de l'ADNe et la probabilité d'observer des carpes à grosse tête (*Hypophthalmichthys spp.*) dans l'ichtyoplancton (Fritts et al., 2019). Bien que certaines corrélations aient été établies entre le signal de l'ADNe dans l'eau et l'abondance des poissons dans les lacs (par exemple, Nevers et al., 2018 ; Klobucar et al., 2017), une seule approche de « metabarcoding » de l'ADNe a été réalisée pour surveiller les périodes de frai de l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus* L.) dans les lacs (Di Muri et al., 2022).

En raison de la corrélation entre l'abondance d'ADNmt et la biomasse des espèces de poissons, une augmentation des concentrations d'ADNmt pendant la saison du frai pourrait être due à la formation d'agrégations de frai (Takahara et al. 2012 ; Lacoursière-Roussel et al. 2015 ; Yamamoto et al. 2016). Le frai est souvent caractérisé par la libération massive d'ovocytes et de spermatozoïdes dans la colonne d'eau. Alors que les ovocytes sont relativement grands et sont souvent fixés au substrat du fond ou à la végétation aquatique. Les spermatozoïdes sont quant à eux petits, mobiles, plus abondants et généralement distribués de façon plus homogène dans le plan d'eau (Cosson et al. 2008). Les spermatozoïdes sont donc une source majeure d'ADNe pendant le frai. Les spermatozoïdes sont génétiquement très différents des cellules somatiques car ils contiennent un ADN nucléaire (ADNnu) hautement condensé et protégé, alors que le nombre de génomes mitochondriaux est relativement faible. Il a été montré que pendant la période de reproduction, le signal provenant de l'ADNnu augmentait de façon plus importante que celui ciblant l'ADN mitochondrial en rivières (Bylemans et al., 2017) tandis qu'en dehors de la période de reproduction les signaux sont similaires (Figure 4).

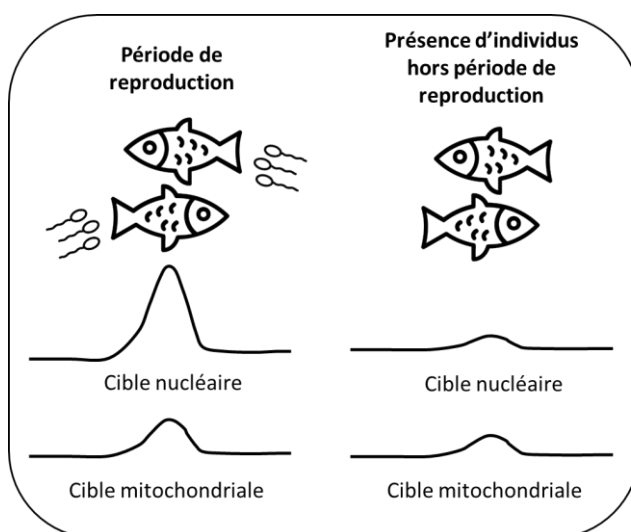


Figure 4 : Schéma représentant l'intensité de la fluctuation du signal ADNe selon le génome ciblé (mitochondrial ou nucléaire) et le cycle de vie du poisson (période de reproduction ou hors période de reproduction).

II





Objectifs du projet QuantiFish



II. Objectifs du projet QuantiFish

Les progrès récents dans la quantification des signaux ADN à partir d'échantillons d'eau ouvrent des alternatives à fort potentiel pour remplacer ou compléter efficacement les méthodes traditionnelles de suivis de la reproduction des poissons qui sont invasives, traumatisantes ou sujettes à des biais d'observateurs. L'objectif principal de ce projet est donc de tester notre capacité à suivre le déroulement des périodes de reproduction de plusieurs espèces de poissons à l'aide d'une méthode ADN quantitative, en supposant que, lors du frai, les poissons se rassemblent sur les zones de frai, ont une activité accrue et libèrent leurs gamètes, ce qui conduit à des quantités plus importantes d'ADN libéré dans le milieu environnant. Les espèces choisies pour ce projet sont la perche, le corégone, l'omble chevalier et le brochet. Ces quatre espèces ont toutes un intérêt économique et écologique, mais elles possèdent également des caractéristiques de reproduction différentes (période de reproduction, présence de suivis traditionnels, zones de frai et migration), permettant ainsi de tester l'utilisation de l'ADN pour le suivi de la reproduction des poissons en lacs avec différentes contraintes (Tableau 1).

Tableau 1: Tableau récapitulatif des espèces étudiées dans le projet QuantiFish et de leurs caractéristiques de reproduction (période, présence ou absence de suivis traditionnels, zones de frai et présence ou absence de migration).

				
Nom	Corégone (<i>Coregonus lavaretus</i>)	Perche (<i>Perca fluviatilis</i>)	Omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>)	Brochet (<i>Esox lucius</i>)
Période de reproduction	Hiver (décembre-Janvier)	Printemps (Mai-Juin)	Hiver (Novembre-Décembre)	Printemps (Mars-Avril)
Suivis traditionnels	Oui (Pêches et comptages visuels)	Oui (Collecte d'œufs)	Non	Non
Zones de frai	Littorale (plages de galets)	Littorale (végétation aquatique)	Profonde (gravier dépourvu de sédiments)	Littorale (ports de plaisance)
Migration	Journalière (entre zones profonde et littorale)	Saisonnaire (entre zones profonde et littorale)	Non (déplacement en zone profonde vers les omblières)	Saisonnaire (entre zones profonde et littorale)

Le Léman, lac dans lequel le changement climatique et la réoligotrophisation affectent les populations de percidés et de salmonidés (Gillet et al., 2013 ; Caudron et al., 2014) avec des conséquences sociétales sur l'activité de pêche (Nöges et al., 2018), a été choisi comme site d'étude. Des suivis de la phénologie du frai de deux espèces de poissons importantes pour la pêche récréative et commerciale, à savoir la perche (*Perca fluviatilis*) et le corégone (*Coregonus lavaretus*), ont été mis en place dans ce lac depuis de nombreuses années. Pour la perche, le suivi traditionnel est réalisé à

l'aide de substrats artificiels de frai placés sur un site de référence pour collecter les rubans d'œufs (de début avril à fin juin) (Gillet et al., 2013), tandis que pour le corégone, le suivi traditionnel est basé sur l'utilisation de filets maillants déployés chaque semaine (de fin novembre à fin janvier) dans une zone où le corégone fraie naturellement (Goulon et al., 2022). L'existence de ces suivis traditionnels offre l'opportunité de comparer l'efficacité des suivis ADNe par rapport à ces suivis mis en place de longue date. Pour le brochet (*Esox lucius*) et l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*), aucun suivi n'existe dans le Léman, et nous avons donc comparé les données ADNe à des comptages visuels dans les zones de frai et aux dates présumées de reproduction. Le Léman offre également un avantage d'un point de vue pratique, les suivis devant se faire de façon hebdomadaire, la proximité géographique du lieu d'étude a été déterminante.

Pour atteindre un haut niveau de sensibilité et détecter de petites variations dans la quantité d'ADNe, nous avons choisi d'utiliser une technologie récente, la PCR digitale par gouttelettes (ddPCR). Comme mentionné précédemment, l'approche par PCR digitale (dPCR) a l'avantage d'être quantitative (Nathan et al., 2014) et plus efficace que la qPCR pour détecter les organismes aquatiques rares (Wood et al., 2019 ; Brys et al., 2020 ; Doi, Uchii, et al., 2015). Dans le but de distinguer le signal ADNe basal émis par une espèce de poisson vivant en permanence dans le lac du signal révélant son activité de frai, nous avons également choisi de quantifier systématiquement l'ADNe d'au moins deux espèces en même temps, l'une servant de " contrôle ADNe " pour l'espèce dont nous suivons la phénologie de la reproduction.

Lors des études ADNe le choix du génome ciblé est déterminant, et nous avons choisis ici de comparer des cibles mitochondriales et nucléaires, la première étant plus couramment utilisée, et la seconde potentiellement plus adaptée pour les suivis ADNe de la phénologie de la reproduction. Les amorces ADN utilisées dans cette étude pour cibler le gène mitochondrial de la cytochrome c oxydase I (COI), ont été développées au cours de ce projet pour la perche, l'omble chevalier et le brochet. Pour le corégone, les amorces proposées par Hulley et al. (2019) ont été utilisées. Pour cibler le génome nucléaire, de nouvelles amorces ciblant le gène ITS1, pour chacune des quatre espèces, ont été développées dans cette étude. La compatibilité des amorces avec l'analyse ddPCR a été validée après des tests de spécificité et de sensibilité appropriés.

Pour réaliser ces suivis ADNe, de l'eau a été collectée chaque semaine au plus proche des zones de frai identifiées ou supposées (zone littorale ou profonde selon les espèces) et ce, pendant toute la période de reproduction. La collecte de l'eau s'est effectuée à l'aide de deux stratégies d'échantillonnage différentes : un échantillonnage discret répété et un d'échantillonnage intégré dans le but de lisser l'hétérogénéité locale potentielle du signal ADNe (Sato et al., 2017). La variabilité spatiale du signal ADNe a également été étudiée avec le cas particulier du corégone qui migre quotidiennement durant sa période de reproduction et permettant donc de suivre la persistance locale du signal ADNe à des échelles de temps de l'ordre de quelques heures seulement.

III

Matériel et méthodes



III. Matériel et méthodes

III.1 Site d'étude et espèces ciblées

III.1.1 Site d'étude

Le lac Léman est situé dans les Alpes du Nord (46°27'N, 06°32'E) à une altitude de 372m. La superficie du lac est de 580,03 km², avec une profondeur maximale de 309 m. La perche et le corégone sont les deux espèces de poissons les plus abondantes dans le lac Léman, et leur abondance a fortement varié dans le passé (Anneville et al., 2017). Le suivi de la phénologie de leur frai a permis d'estimer le début, la fin et le pic de la période de frai pour ces deux espèces, afin de guider les acteurs avec des recommandations pour adapter les dates de fermeture de la pêche, mais aussi d'observer d'éventuelles modifications d'une année sur l'autre comme par exemple le nombre de géniteurs, le moment ou la durée du frai (Goulon et al., 2022). Il n'existe pas de suivi annuel de la reproduction pour l'omble chevalier et le brochet. Dans le Léman, la fermeture de la pêche au corégone et à l'omble chevalier a lieu du premier octobre au 15 janvier, pour la perche du 1 mai au 26 mai, et pour le brochet du premier avril au 21 avril (www.peche-leman-apallf.com).

III.1.2 Corégone

Dans le Léman, le frai du corégone a lieu de début décembre à mi-janvier dans la zone littorale (Goulon et al., 2022). Alors que les corégones vivent la majeure partie de l'année dans la zone pélagique, pendant la période de frai, ils migrent quotidiennement vers la zone littorale à la tombée de la nuit pour la reproduction, puis reviennent à plus grande profondeur (zone pélagique) au lever du soleil. Au cours de ce projet, nous avons suivi quatre saisons de frai du corégone pendant quatre hivers successifs (28 nov 2018 au 31 jan 2019 : 64 jours ; 26 nov 2019 au 13 fév 2020 : 90 jours ; 25 nov 2020 au 26 jan 2021 : 72 jours ; 25 nov 2021 au 01 fév 2022 : 68 jours). Le site d'échantillonnage est celui traditionnellement utilisé pour le suivi de la reproduction réalisé annuellement par l'Institut national de recherche sur l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE) (Goulon et al., 2022). Le site est situé le long de la plage de la Ripaille à Thonon-les-Bains (46°22'56.73"N, 06°28'53.648"E) (Figure 5).

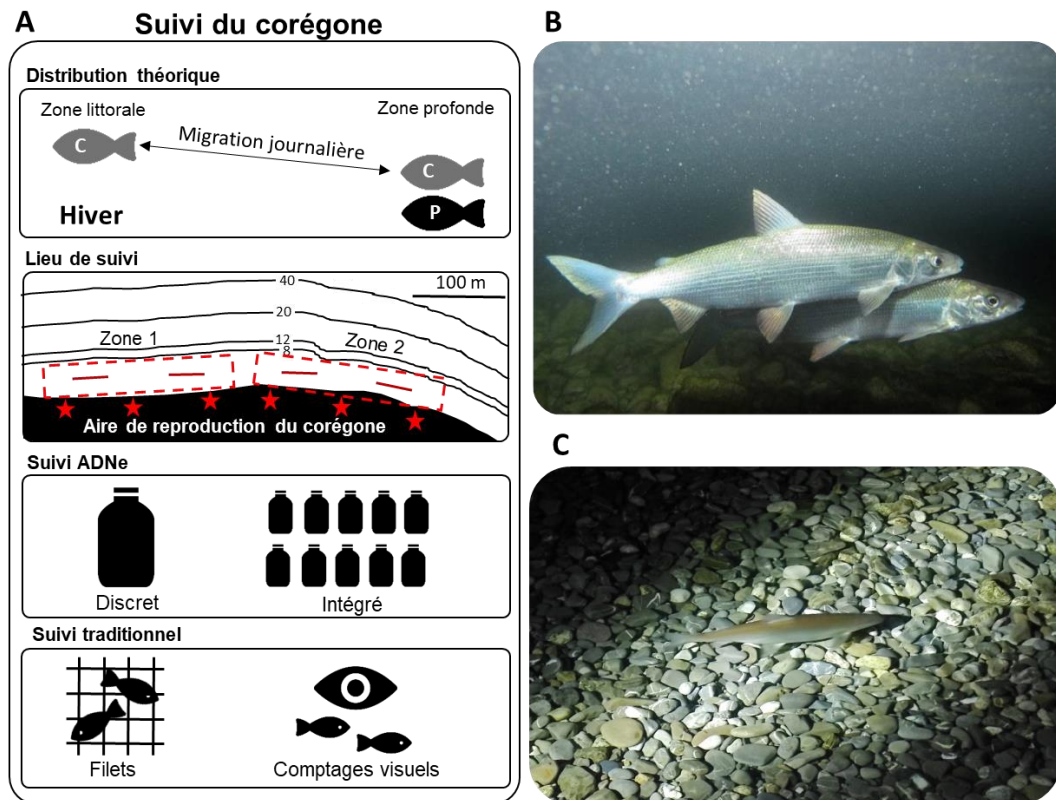


Figure 5 : Caractéristiques des suivis de la reproduction du corégone réalisés au cours du projet QuantiFish. **(A)** Au cours de sa reproduction le corégone effectue une migration journalière, il vient en zone littorale à la tombée du jour tandis qu'il se trouve en zone plus profonde la journée. La perche quant à elle reste en zone profonde en hiver, et elle a donc été choisie comme espèce ADNe contrôle pour le suivi de la reproduction du corégone. Le lieu du suivi se trouve le long de la plage de Ripaille et il est composé d'un suivi ADNe, ainsi que de deux suivis traditionnels, la pose de quatre filets maillants et les comptages visuels réalisés le long de la berge sur six transects. Les prélèvements d'eau se font en sub-surface depuis un bateau, et les échantillons sont soit discrets (1 bouteille de 2L) soit intégrés (10 sous-échantillons de 200 mL). **(B)** Photo de deux corégonnes se rapprochant durant la période de reproduction (Crédit : photothèque INRAE). **(C)** Photo d'un corégone depuis la berge de la plage de Ripaille pendant un comptage visuel (Crédit : Marine Vautier).

III.1.3 Perche

En hiver, les perches se regroupent généralement à des profondeurs d'environ 30-50 m, et migrent au printemps dans la zone littorale peu profonde pour frayer (entre 4 et 10 m) puis restent dans cette zone l'été pour se nourrir. Leur période de frai s'étend dans le Léman de fin avril à début juin (Gillet et al., 2013). Pour la perche, deux années de suivis ont été réalisées au printemps 2019 et 2021 (du 9 avril 2019 au 24 juin 2019 : 76 jours ; du 7 avril 2021 au 8 juin 2021 : 62 jours) ; la campagne de terrain 2020 a dû être annulée en raison des restrictions Covid-19. Le site d'échantillonnage est celui traditionnellement utilisé pour le suivi de la reproduction réalisé annuellement par l'INRAE (Goulon et al., 2022). Le site est situé devant l'INRAE de Thonon-les-Bains (46°22'8.663"N, 06°27'13.946"E) (Figure 6).

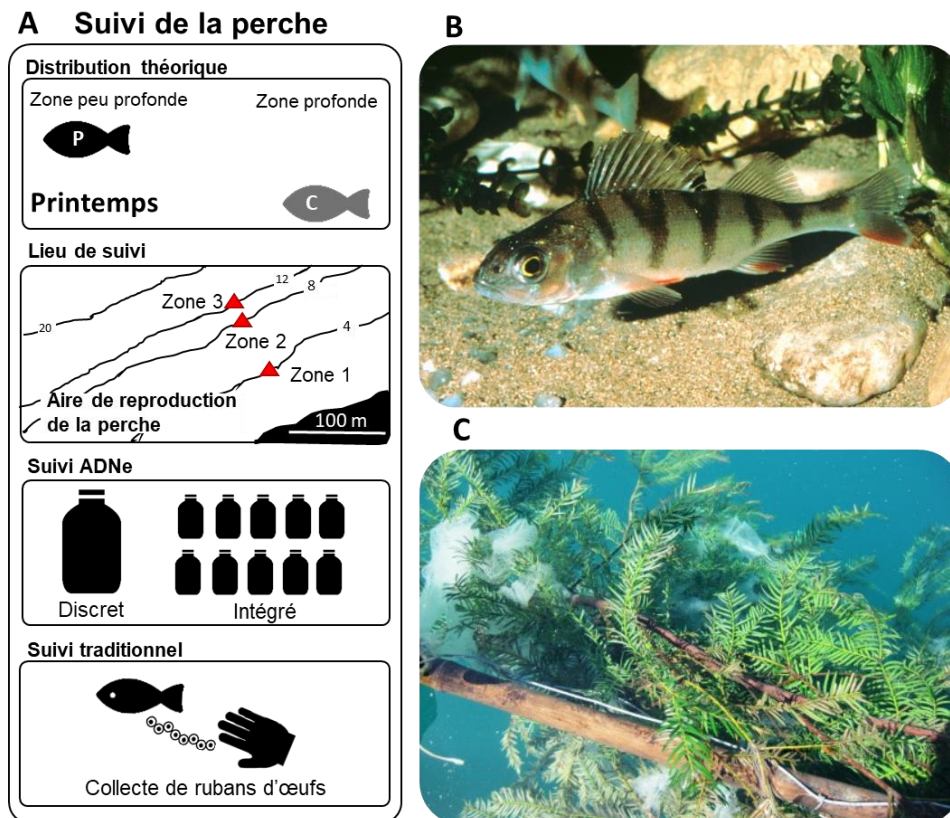


Figure 6 : Caractéristiques des suivis de la reproduction de la perche réalisés au cours du projet QuantiFish. **(A)** La perche effectue une migration saisonnière, se trouvant en zone profonde en hiver, elle vient en zone littorale au printemps pour se reproduire et y reste l'été pour se nourrir. Le corégone étant quant à lui en zone profonde au printemps, il a été choisi comme espèce ADNe contrôle pour le suivi de la reproduction de la perche. Le lieu du suivi se trouve devant l'INRAE de Thonon-les-Bains et il est composé d'un suivi ADNe, ainsi qu'un suivi traditionnel, la collecte de rubans d'œufs sur des frayères artificielles déposées à trois profondeurs (4m, 8m et 12m). Les prélèvements d'eau se font en sub-surface depuis un bateau pour chacune des 3 zones (4,8,12m), et les échantillons sont soit discrets (1 bouteille de 2L) soit intégrés (10 sous-échantillons de 200 mL). **(B)** Photo d'une perche (Crédit : photothèque INRAE). **(C)** Photo de rubans d'œufs de perche déposés sur une frayère artificielle déployée lors du suivi traditionnel annuel (Crédit : photothèque INRAE).

III.1.4 Brochet

En hiver, les brochets se trouvent généralement à des profondeurs de 20-30 m, même s'ils suivent leurs proies et peuvent donc se retrouver à des profondeurs plus ou moins importantes (observation de quelques individus en zone littorale pendant la reproduction du corégone). Au printemps, ils migrent dans la zone littorale peu profonde pour frayer et se nourrir. Leur période de frai peut s'étendre de février à avril, mais dans le Léman elle se concentre de fin mars à fin avril. Il n'existe aucun site de suivi traditionnel, mais des brochets sont observés chaque année, notamment dans des ports, durant la période de reproduction, laissant supposer qu'il s'agit de sites de prédilection pour leur reproduction. Quatre sites d'études ont été sélectionnés : le port de Thonon-les-Bains (46°22'44.695"N, 06°28'49.839"E) où des brochets sont observés chaque année, le port de Nernier (46°21'54.742"N, 06°18'7.333"E) et de l'INRAE (46°22'43.392"N, 06°28'48.971"E) où des brochets sont

observés occasionnellement, et la roselière de Chens-sur-Léman (46°18'38.938"N, 06°15'8.884"E), zone Natura 2000 protégée qui serait potentiellement propice pour la reproduction du brochet même si aucun individu n'a été observé. Au cours de ce projet, nous avons suivi deux saisons de frai du brochet pendant deux printemps successifs (22 mars 2021 au 11 mai 2021 : 50 jours ; 23 mars 2022 au 16 mai 2022 : 54 jours). Lors de la première année nous avons uniquement réalisé notre suivi au niveau du port de Thonon, puis en 2022 il a été déployé dans les quatre sites (Thonon-les-Bains, INRAE, Nernier et Chens-sur-Léman) (Figure 7).

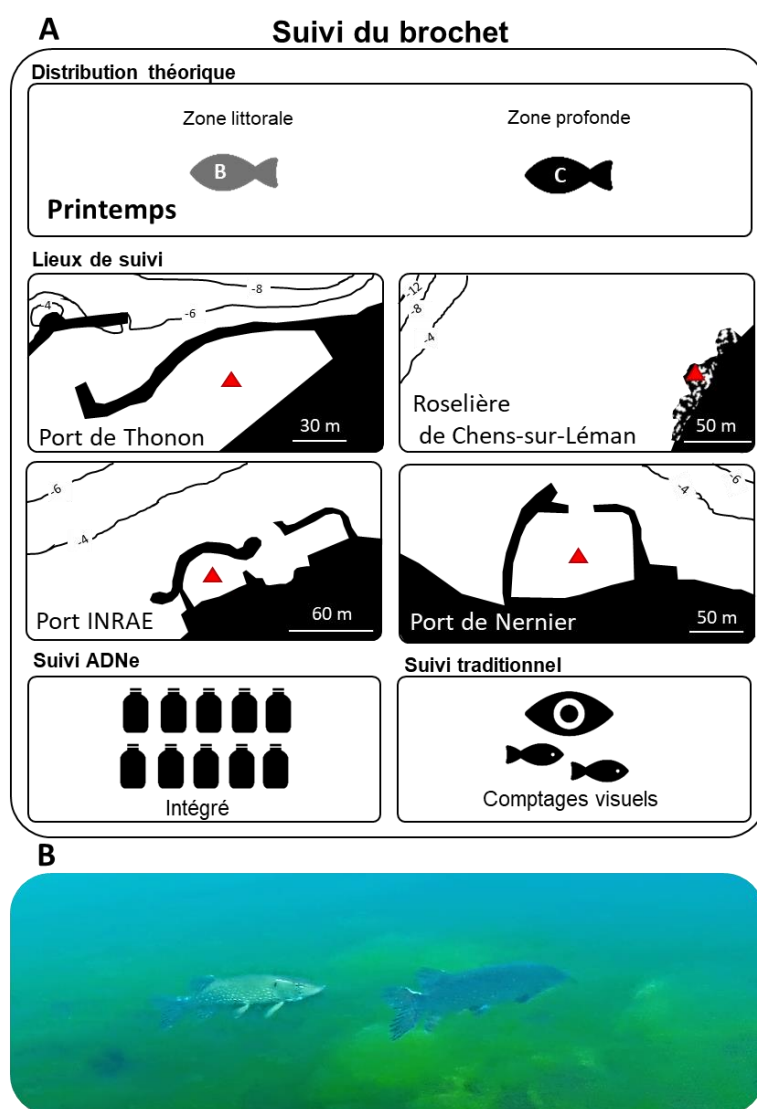


Figure 7 : Caractéristiques des suivis de la reproduction du brochet réalisés au cours du projet QuantiFish. **(A)** Le brochet effectue une migration saisonnière, se trouvant en zone profonde en hiver, il vient en zone littorale au printemps pour se reproduire et y reste l'été pour se nourrir. Le corégone étant quant à lui en zone profonde au printemps, il a été choisi comme espèce ADNe contrôle pour le suivi de la reproduction du brochet. Les suivis ont été fait dans quatre lieux différents : les ports de Thonon-les-Bains, Nernier et de l'INRAE, ainsi que dans la roselière de Chens-sur-Léman. Le suivi traditionnel a consisté en des comptages visuels depuis les lieux de collecte de l'eau pour l'ADNe. Les prélèvements d'eau se sont fait en sub-surface depuis la berge ou les pontons des ports, et les échantillons étaient intégrés (10 sous-échantillons de 200 mL). **(B)** Photo de deux brochets dans le port de Thonon pendant la période de reproduction en avril 2022 (Crédit : Clément Rautureau).

III.1.5 Omble chevalier

Les ombles chevaliers se trouvent toute l'année en zone profonde, y compris durant leur reproduction. L'ensemble des omblières du Léman ont été répertoriées à l'aide d'un sous-marin en 2005, et cette étude a montré qu'elles se situent entre -45 et -120 m de profondeur (Rubin, 2005). Aucun suivi traditionnel de la reproduction de l'omble chevalier n'est réalisé dans le Léman, mais des pêches exceptionnelles sont faites chaque année dans le but de prélever des géniteurs. Ces pêches se font notamment au niveau de l'omblière de Ripaille qui est toujours active, et qui a donc été choisie pour nos suivis. Cette omblière se situe entre -45 et -55 m (46°23'36.481"N, 06°28'55.953"E et 46°23'36.094"N, 06°28'56.100"E) et elle est constituée de coulées de gravier exemptes de sédiments fins à leur surface sur une largeur de quelques mètres (2-5 m) (Rubin, 2005). Au cours de ce projet, nous avons suivi deux saisons de frai de l'omble chevalier pendant deux hivers successifs (05 nov 2021 au 25 jan 2022 : 81 jours ; 05 nov 2021 au 25 jan 2022 : 81 jours) (Figure 8).

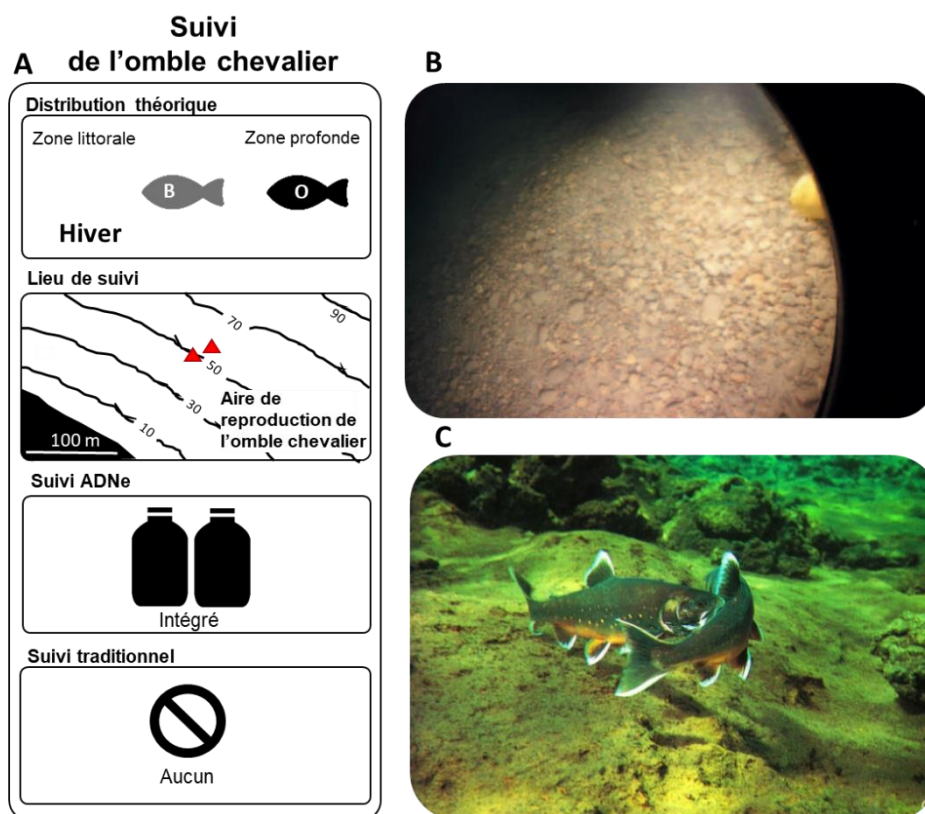


Figure 8 : Caractéristiques des suivis de la reproduction de l'omble chevalier réalisés au cours du projet QuantiFish. **(A)** L'omble chevalier se situe en zone profonde en hiver durant sa période de reproduction, comme le reste de l'année. Le brochet étant quant à lui dans une zone moins profonde que l'omble chevalier en hiver, il a été choisi comme espèce ADNe contrôle pour le suivi de la reproduction de l'omble chevalier. Les suivis ont été faits au niveau de l'omblière de Ripaille qui est connue pour être encore active. Les prélèvements d'eau se sont fait en en profondeur au niveau de l'omblière (1 m au-dessus du fond) et en sub-surface depuis le bateau, et les échantillons étaient intégrés (10 sous-échantillons de 200 mL ou deux échantillons de 1L). Malheureusement aucun suivi traditionnel n'a pu être réalisé malgré des tentatives avec une caméra et un suivi hydroacoustique. **(B)** Omblière de Ripaille

située entre -55 et -45m de profondeur. Observation du 23/05/05. (Crédit : Jean-François Rubin). (C)
Photo de deux ombles chevaliers durant leur période de reproduction (Crédit : Photothèque INRAE).

III.2 Prélèvements et échantillonnage

III.2.1 Suivis traditionnels

Les suivis traditionnels sont considérés ici comme des suivis faisant appel à des méthodes classiques de suivis de la reproduction comme la pêche aux filets maillants, les comptages visuels ou encore la collecte d'œufs fécondés, en opposition à l'approche novatrice qu'est l'approche ADNe.

- Corégone

Pour l'étude de l'activité de frai du corégone, 2 filets maillants benthiques multi-maillages (L : 5 m, h = 2 m, maillage : 19.5, 24, 29, 40, 50 et 60 mm) ont été posés dans chacune des deux zones de frai, à une profondeur d'environ 4 m (Figure 5). Les 4 filets maillants sont posés à la tombée de la nuit et sont retirés le lendemain matin. Les corégones capturés dans les filets sont ensuite comptés et pesés. Durant l'hiver 2018, 9 dates d'échantillonnage ont été réalisées, 11 durant l'hiver 2019 et 8 durant l'hiver 2020 (rapport technique Goulon et al., 2022). Un minimum de 5 jours et un maximum de 16 jours séparaient deux dates d'échantillonnage consécutives, en fonction des conditions météorologiques. Durant l'hiver 2020 et 2021, nous avons effectué un comptage visuel du nombre de corégones présents dans la zone de frai. Une à deux fois par semaine, les corégones ont été comptés visuellement depuis la rive du lac à l'aide d'une lampe torche, après le coucher du soleil (~7pm), pendant 3 minutes par site, 3 fois par zone (zone 1 et 2) et toujours par le même expert. Les poissons n'étaient comptés que s'ils étaient formellement identifiés par l'expert. Durant le suivi hivernal 2020, 12 dates de comptage visuel ont été réalisées ; un minimum de 3 jours et un maximum de 8 jours ont séparé deux dates de comptage consécutives. Pour le suivi hivernal 2021, 14 comptages ont été effectués avec un minimum de 2 jours et un maximum de 7 jours entre deux comptages consécutifs. Les comptages visuels n'ont pas été réalisés les mêmes soirs que les filets maillants afin d'éviter un biais dans le nombre de corégones observés en raison de la présence des filets.

Lors des suivis nycthéméraux, les données ADNe ont été comparées aux données obtenues à l'aide d'une caméra acoustique ARIS Explorer 3000 utilisée en basse fréquence (1.8MHz), afin d'avoir un cône de 16m de long et d'environ 10m au plus large. Le logiciel ARISfish permet de supprimer les séquences sans activités et le logiciel Sonar 5 et son utilitaire Didson pour effectuer le comptage automatique du nombre d'individus sur site en temps réel. La caméra acoustique est fixée au tout début de la zone 1 (Figure 5).

Nous avons considéré à la fois la valeur moyenne obtenue pour toute l'aire de frai (2 zones d'échantillonnage pour le corégone) et chaque valeur séparément afin d'évaluer la variabilité des mesures au sein de chaque zone de frai.

- Perche

Pour l'étude de l'activité de frai des perches, trois frayères artificielles ont été installées à trois profondeurs différentes (4, 8 et 12 m) et, une fois par semaine, les frayères artificielles ont été sorties et les rubans d'œufs de perches ont ensuite été collectés et comptés (Gillet et Dubois, 1995, 2007) (Figure 6). Douze dates d'échantillonnage ont été réalisées au cours du printemps 2019, avec un minimum de 5 jours et un maximum de 9 jours entre deux dates d'échantillonnage consécutives, et pour le printemps 2021, quinze dates d'échantillonnage ont été réalisées, avec un minimum de 2 jours et un maximum de 11 jours entre deux dates d'échantillonnage consécutives (Goulon et al., 2020, 2022). Malheureusement, aucun suivi n'a pu être organisé en 2020 en raison des restrictions de COVID-19.

Nous avons considéré à la fois la valeur moyenne obtenue pour toute l'aire de frai (3 zones d'échantillonnage pour la perche) et chaque valeur séparément afin d'évaluer la variabilité des mesures au sein de chaque zone de frai.

- Brochet

Pour l'étude de l'activité de frai des brochets, des comptages visuels ont été réalisés sur les lieux de frai supposés ou avérés et au même endroit que les collectes d'eau pour l'ADNe (Figure 7). Une fois par semaine, les brochets ont été comptés visuellement depuis les rives du lac ou des pontons, pendant 15 minutes par site, et toujours par le même expert. Les poissons n'étaient comptés que s'ils étaient formellement identifiés par l'expert. Durant le suivi 2021, 8 dates de comptage visuel ont été réalisées ; un minimum de 7 jours et un maximum de 8 jours ont séparé deux dates de comptage consécutives. Pour le suivi de 2022, 8 comptages ont été effectués avec un minimum de 5 jours et un maximum de 9 jours entre deux comptages consécutifs.

- Omble chevalier

Pour l'omble chevalier, les tentatives de mise en place de suivis traditionnels fiables n'ont malheureusement pas été concluantes. Nous avons essayé de réaliser des comptages visuels à l'aide d'une caméra fixée à l'extrémité d'un câble, mais avec la dérive du bateau et l'inclinaison du câble nous avons eu de la difficulté à localiser la frayère qui est de petite taille (2-5m). Nous avons également tenté de localiser la frayère avec un suivi hydroacoustique, mais les ombles chevalier étant proches du fond il a été difficile de les identifier formellement.

III.2.2 Prélèvement de l'eau et filtration

Tous les échantillons d'eau ont été stockés dans des bouteilles décontaminées (lavées avec du H₂O₂ 10% et rincées 3 fois avec de l'eau ultrapure) immédiatement placées dans des glacières et retournées au laboratoire pour être filtrées. La filtration a été effectuée au laboratoire, dans les 2 heures suivant l'échantillonnage, à l'aide d'unités de filtration Sterivex TM MILLIPORE (porosité de 0,45 µm). Pour chaque filtre, entre 1,5 L et 2 L d'eau ont été filtrés. Après filtration, les Sterivex ont été remplis de tampon de conservation (EDTA 40 mM, Tris-HCl (pH 8) 50 mM et saccharose 0,75 M) et stockés à -

20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Pour tous les échantillons, l'échantillonnage et la filtration ont été effectués selon le protocole détaillé de Vautier et al. (2021), accessible sur <https://www.protocols.io/view/fish-edna-water-sampling-and-filtration-through-st-br5rm856>.

Pour les échantillons témoins, des bouteilles décontaminées et remplies d'eau sans ADN ont été ouvertes sur le terrain pendant l'échantillonnage, puis fermées et placées dans une glacière avec les autres échantillons. Les échantillons témoins ont ensuite été traités de la même manière que les autres échantillons d'eau (c'est-à-dire filtration et extraction de l'ADN). Des échantillons témoins ont été réalisés à intervalles réguliers au cours des différentes campagnes d'échantillonnage, avec un total de 28 échantillons témoins.

- Corégone

Au total, 58 échantillons ont été collectés avec la stratégie d'échantillonnage discret pendant les trois hivers (période de frai du corégone) avec 18, 20 et 20 échantillons en 2018, 2019 et 2020 respectivement. Pour chaque échantillon, 2 L d'eau de subsurface a été collecté dans chacune des deux zones (soit deux échantillons par date). L'échantillonnage a été réalisé avant la pose des filets maillants. En outre, une stratégie d'échantillonnage intégrée a été réalisée en 2020 et 2021, permettant de collecter 40 échantillons supplémentaires (10 pour chaque zone et pour chaque année). Dans ce dernier cas, dix échantillons d'eau de subsurface de 200 mL ont été regroupés pour obtenir les 2L à filtrer. Deux échantillons groupés ont donc été collectés à chaque date d'échantillonnage.

Lors des suivis nycthémeraux, des prélèvements d'eau ont été réalisés toutes les 4h pendant 24h à partir de 7h et jusqu'à 7h le lendemain. Ces suivis nycthémeraux ont été fait à trois dates, le 15 décembre et le 21 décembre qui se trouvent pendant la phase très active de la reproduction, et le 13 janvier qui est une date située en fin de période. Les données ADN ont été comparées aux données obtenues à l'aide d'une caméra acoustique. L'eau a été prélevée depuis la berge, en subsurface et à l'aide d'une perche de prélèvement. L'échantillonnage était intégré et composé de sous échantillons de 200 mL. Deux échantillons groupés ont donc été collectés à chaque échantillonnage, soit 42 échantillons au total.

- Perche

Aux printemps 2019 et 2021, 2L d'eau de subsurface ont été collectés une fois par semaine, avant la collecte des rubans d'œufs, à chacune des 3 stations où se trouvaient les frayères artificielles. Pour les 22 dates de ce suivi de printemps, 66 échantillons ont donc été collectés. En plus de ces échantillons discrets, des échantillons intégrés ont été réalisés en 2021 au niveau de la zone 1, c'est-à-dire dix sous-échantillons d'eau de subsurface de 200 mL regroupés pour obtenir les 2L à filtrer. Ajoutant ainsi 12 échantillons intégrés aux 66 discrets.

- Brochet

Des échantillons intégrés ont été réalisés depuis la berge à l'aide d'une perche télescopique, au niveau du port de Thonon-les-Bains en 2021 et au niveau des quatre sites en 2022. Chaque échantillon est composé de dix sous-échantillons d'eau de subsurface de 200 mL regroupés pour

obtenir les 2L à filtrer. Au total 40 échantillons intégrés ont été collectés pour le suivi de la reproduction du brochet.

- Omble chevalier

Pour le suivi de la reproduction de l'omble chevalier, les échantillons ont été réalisés 1 m au-dessus du niveau de l'ombrière, soit à une profondeur d'environ 50 m. Deux échantillons ont été réalisés puis intégrés ensemble. En 2021, en plus de l'échantillonnage de profondeur, des échantillonnages de subsurface ont été réalisés et étaient composés de dix sous-échantillons d'eau de subsurface de 200 mL regroupés pour obtenir les 2L à filtrer. Onze et treize dates d'échantillonnages ont été réalisées respectivement en 2021 et 2022, soit 35 échantillons au total.

III.3 Analyses ADNe : de l'extraction à l'échantillonnage

III.3.1 Extraction de l'ADN à partir d'eau et de tissus

Pour tous les échantillons, l'extraction d'ADN a été réalisée dans un laboratoire dédié aux analyses d'ADNe rare. Les extractions ont été réalisées selon le protocole de Vautier et al. (2020), accessible sur <https://www.protocols.io/view/fish-edna-dna-extraction-from-water-samples-filter-bfk8jkzw>. Ce protocole utilise le kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL) avec des modifications spécifiques adaptées aux cartouches Sterivex et à la préservation avec du tampon. L'ADN a été élué dans 30 µL de tampon SE préchauffé à 55°C, quantifié au Nanodrop (Thermo Scientific) et conservé à -20°C.

Pour tester la spécificité des amorces, l'ADN de 18 espèces de poissons capturés dans le Lac Bourget et le Lac Léman (*Abramis brama*, *Ameiurus melas*, *Barbatula barbatula*, *Barbus barbus*, *Coregonus lavaretus*, *Esox lucius*, *Gobio gobio*, *Gymnocephalus cernuus*, *Lepomis gibbosus*, *Lota lota*, *Perca fluviatilis*, *Rutilus rutilus*, *Salmo trutta*, *Salvelinus alpinus*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Silurus glanis*, *Squalius cephalus* et *Tinca tinca*) a été extrait des tissus avec NucleoSpin® DNA RapidLyse (MACHEREY-NAGEL). L'ADN a été quantifié par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop™, et stocké à -20°C ; ces extraits d'ADN ont été utilisés comme témoins pour tester la spécificité des jeux d'amorces.

III.3.2 Design et test des amorces

La spécificité des amorces et sondes ciblant le gène mitochondrial COI a été testée *in silico* en déterminant le nombre de nucléotides différents entre les séquences des amorces et sonde ciblant l'espèce d'intérêt et les séquences de 33 autres espèces de poissons vivant dans le Léman ou dans les lacs alentours. Leur spécificité a ensuite été testée *in vitro* à l'aide d'analyses qPCR, sur de l'ADN extrait de différents tissus de poissons (17 espèces). Concernant les amorces et sondes ciblant le gène nucléaire ITS1, peu de séquences étant disponibles dans les bases de données, les tests de spécificité

in silico se sont limités aux différences de nucléotides entre les séquences des quatre espèces d'intérêt et de la truite (*Salmo trutta*), mais les tests *in vitro* ont été identiques à ceux utilisés avec les amorces et sondes ciblant le gène mitochondrial COI.

Pour les amorces et la sonde ciblant le gène mitochondrial COI du corégone et proposées par Hulley et al. (2019), nous avons trouvé une spécificité et une bonne efficacité d'amplification. Ces amorces ont donc été utilisées pour des analyses ddPCR afin d'évaluer d'abord leur sensibilité puis de quantifier l'ADNe de corégone pour nos échantillons environnementaux. Pour les amorces ciblant le génome mitochondrial des autres espèces de poissons (perche, brochet et omble chevalier), il n'existait pas d'amorces dans la littérature ou elles n'étaient pas spécifiques dans notre système biologique et de nouvelles amorces ont donc été créées en ciblant le gène mitochondrial COI. Pour les amorces ciblant le génome nucléaire, il n'en existait aucune dans la littérature ciblant nos espèces d'intérêt (corégone, perche, brochet et omble chevalier), et elles ont donc toutes été nouvellement 'designées' dans ce projet, en ciblant le gène nucléaire ITS1 (Tableau 2).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées dans le projet QuantiFish et de leur marquage fluorescent.

	Amorces ciblant le corégone	Amorces ciblant la perche	Amorces ciblant le brochet	Amorces ciblant l'omble chevalier
<i>Génome mitochondrial (gène COI)</i>	FAM et HEX (Hulley et al., 2019)	FAM et HEX (Ce projet)	FAM (Ce projet)	HEX (Ce projet)
<i>Génome nucléaire (gène ITS1)</i>	HEX (Ce projet)	-	HEX (Ce projet)	FAM (Ce projet)

Pour concevoir les nouvelles amorces ciblant le génome mitochondrial, les séquences du gène COI ont été collectées à partir de Barcode of Life Database (BOLD) (<http://www.boldsystems.org/>) pour 34 espèces de poissons identifiées dans les lacs péri-alpins français. Toutes les séquences disponibles ont été conservées, quelle que soit leur origine géographique, afin de tenir compte des variations génétiques intraspécifiques potentielles. Les séquences d'amorces-sondes PCR ont été conçues à l'aide du logiciel Primers3 (Untergasser et al., 2012). Les paramètres suivants ont été appliqués pour concevoir les paires d'amorces : taille minimale et maximale du produit PCR de 60 à 160 respectivement, température de fusion minimale et maximale des amorces de 50 à 65°C avec une différence de température maximale de 3°C entre les amorces "Forward" et "Reverse". De même, les paramètres de sonde correspondants comprenaient une taille minimale et maximale de 18 et 27 nucléotides respectivement, une température de fusion d'amorce minimale et maximale de 60 et 67°C et un contenu GC entre 30 % et 80 %.

Pour l'ensemble des amorces et sondes générées, la spécificité a été déterminée en utilisant les séquences du gène COI de l'ensemble des 33 autres espèces de poissons sélectionnées précédemment. Toutes les séquences ont été alignées à l'aide d'un logiciel d'alignement de séquences

multiples, MEGA7 (Kumar, Stecher et Tamura, 2016). Pour chacun des ensembles d'amorces et sonde, seuls ceux ne présentant pas de correspondance parfaite avec l'une des séquences des 33 autres espèces de poissons ont été sélectionnés. En raison du degré élevé d'homologie entre certaines espèces de poissons, les séquences COI de l'ensemble des 33 espèces de poissons ont été alignées sur les séquences d'amorces et de sondes sélectionnées pour l'espèce d'intérêt, et le nombre de paires de bases non concordantes a été additionné pour sélectionner uniquement les ensembles d'amorces présentant le plus grand nombre de non concordances. La structure secondaire de l'amplicon sélectionné a ensuite été vérifiée à l'aide du programme Mfold (Zuker, 2003), et enfin, des PCR *in silico* ont été réalisées à l'aide de l'outil Primer-BLAST de NCBI (O'Leary et al., 2015) pour vérifier que les jeux d'amorces et sonde ne ciblent que le génome de l'espèce d'intérêt. Concernant les amorces et sondes ciblant le génome nucléaire des espèces d'intérêt, les tests de spécificité *in silico* ont été identiques, mais en ne comparant les amorces et sondes générées qu'avec les séquences des quatre espèces d'intérêt et de la truite (*Salmo trutta*). Les séquences des gènes ITS1 sont issues de la base de donnée « nucleotide » de NCBI (O'Leary et al., 2015).

Pour déterminer la sensibilité relative des tests ddPCR, nous avons réalisé une expérience de dilution en série avec des témoins positifs (ADN extrait de tissus) afin de déterminer la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ). La dilution en série a été réalisée avec un échantillon d'ADN cellulaire total concentré à $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, qui a d'abord été dilué au 1:100 pour obtenir un point de départ pour une série de cinq étapes de dilutions par cinq (1/100, 1/500, 1/2500, 1/12 500, 1/ 62 500 et 1/312 500), et donc six quantités d'ADN différentes (50, 10, 2, 0,4, 0,08 et 0,016 pg) selon les recommandations de Brys et al. (2020). Les séries comprenaient 5 réplicats de chaque dilution et 5 contrôles négatifs (eau sans ADN au lieu d'ADN de poisson). Ces tests de sensibilité n'ont pour l'instant été réalisés que sur les amorces mitochondriales ciblant la perche et le corégone. La dilution de départ de ces séries (1/100 ou 50 pg), mesurée par ddPCR, était de $89,1 \text{ copies.}\mu\text{L}^{-1}$ (S.D. = 4,2) pour *C. lavaretus* et de $74,5 \text{ copies.}\mu\text{L}^{-1}$ (S.D. = 2,0) pour *P. fluviatilis*. Le LOD est défini comme la concentration la plus faible du nombre de copies PCR qui peut être distinguée de manière fiable des contrôles négatifs (Kiselinova et al., 2014 ; recommandation du fournisseur Biorad), et comme aucune amplification n'a été obtenue à partir d'aucun contrôle négatif, le LOD a été déterminé comme la concentration la plus faible à laquelle au moins une détection positive a été mesurée parmi les 5 réplicats. La LOQ est définie comme la concentration la plus faible en nombre de copies PCR pour laquelle la méthode fournit des résultats avec une incertitude acceptable. Nous avons choisi une incertitude de 30 % pour un résultat de mesure obtenu comme une moyenne des cinq mesures répétées, en suivant les recommandations de Deprez et al, 2016.

III.3.3 Analyses ddPCR

Les ddPCR ciblant le génome mitochondrial du corégone ont été réalisées en utilisant les amorces F/5'-TCT CCC TCC ACT TAG CTG GT-3' et R/5'-GCC CAG ACA AAA AGA GGG GT-3' qui amplifient une région de 118 pb du gène COI et la sonde 5'-TTC CTC TAT CTT GGG GGC CGT T-3' (Hulley et al., 2019). Pour cibler les génomes mitochondriaux des trois autres espèces et les génomes

nucléaires des quatre espèces, nous avons utilisé les amorces et les sondes conçues dans cette étude. Les marqueurs fluorescents choisis pour les sondes d'hydrolyse sont soit le FAM (~517nm) ou soit le HEX (~556nm). La ddPCR a été exécutée dans des réactions multiplex avec deux jeux amorce-sonde multiplexés ensemble (génome mitochondrial de l'espèce ciblée et génome mitochondrial de l'espèce 'contrôle') dans le cas des génomes mitochondriaux, et en triplex avec trois jeux amorce-sonde dans le cas des génomes nucléaires (génome mitochondrial et génome nucléaire de l'espèce ciblée, et génome mitochondrial de l'espèce 'contrôle'). Dans le cas des triplex, un des jeux amorce-sonde est marqué en double fluorescence (FAM et HEX) afin de le distinguer des deux autres aisément lors des analyses.

Les extraits d'ADNe obtenus pour chaque date d'échantillonnage ont été analysés indépendamment et ont été regroupés afin de mesurer un signal moyen pour la zone de frai.

Les contrôles négatifs étaient constitués d'eau exempte d'ADN, tandis que de contrôles positifs constitués d'ADN extrait de matériel tissulaire de chacune des espèces cibles.

Les ddPCR ont été réalisées à l'aide du système ddPCR Bio-Rad QX200 (Bio-Rad, Temse, Belgique) dans un volume total de 20 μ L. Chaque réaction contenait 1x Bio-Rad ddPCR supermix pour sondes (sans dUTP), 900 nM de chaque amorce, 250 nM de sonde, entre 2 et 4 μ L d'ADN matrice selon la concentration en ADN des échantillons, de 5 U à 10 U d'enzyme de restriction AflIII selon la concentration d'ADN, complétée par de l'eau de diéthylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich, Overijse, Belgique). Vingt microlitres du mélange PCR ont été pipetés dans les compartiments dédiés aux échantillons des cartouches Droplet Generator DG8 (Bio-Rad, n° de cat. 1864008), et 70 μ L d'huile de génération de gouttelettes pour sondes (Droplet Generation Oil for Probes) (Bio-Rad, n° de cat. 186-4005) ont été ajoutés dans les puits appropriés. Les cartouches ont été recouvertes de joints DG8 (Bio-Rad, n° de cat. 1863009) et placées dans un générateur de gouttelettes QX200 (Bio-Rad). Les gouttelettes ainsi générées (40 μ L) ont ensuite été soigneusement transférées dans une plaque à 96 puits ddPCR (Bio-Rad, n° de cat. 12001925) scellée avec une feuille d'aluminium perçable (Bio-Rad, n° de cat. 181-4040). Les plaques ddPCR 96 puits ont été introduites dans un thermocycleur TProfessional Basic de Biometra Ltd. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 10 minutes à 95 °C, suivies de 40 cycles de dénaturation pendant 30 s à 94 °C et d'extension à 60 °C pendant 1 min, avec une vitesse de rampe de 2 °C s⁻¹, suivis de 10 min à 98 °C et d'un maintien à 4 °C.

Les gouttelettes ont ensuite été lues sur un lecteur de gouttelettes QX200 (Bio-Rad). La fluorescence de toutes les gouttelettes a été vérifiée à l'aide du logiciel QuantaSoft de Bio-Rad, version 1.7.4.0917. Le seuil d'amplitude de fluorescence, qui permet de distinguer les gouttelettes positives des négatives, a été fixé manuellement par l'analyste comme étant le point médian entre l'amplitude de fluorescence moyenne du groupe de gouttelettes positives et négatives. Le même seuil a été appliqué à tous les puits d'une plaque PCR donnée. Le nombre moyen de gouttelettes acceptées était d'environ 17 000.

Pour estimer les concentrations d'ADNe, exprimées en nombre de copies par litre d'eau filtrée, le calcul a été effectué selon la formule suivante, avec un volume de gouttelettes (V_d) fixé à 0,834 nL

$$C_x = \left(\frac{V_e}{V_w \times V_s} \right) \times V_{dd} \times \left(\frac{1}{A \times V_d} \right) \times \frac{\left[\log \left(1 - \frac{P}{A} \right) \right]}{\left[\log \left(1 - \frac{1}{A} \right) \right]} \quad \text{(Corbisier et al., 2015). Où } C_x \text{ est le}$$

nombre de copies d'ADNe cible par litre d'eau, V_e est le volume d'élution de l'extraction, V_s est le volume d'extrait d'ADN utilisé dans la réaction ddPCR, V_w est le volume d'eau filtrée, V_{dd} est le volume de réaction ddPCR (20 μ L), A est le nombre de gouttelettes acceptées, V_d est le volume des gouttelettes et P est le nombre de gouttelettes positives.

IV

Résultats et Discussion



IV. Résultats et Discussion

IV.1 Validation des essais ddPCR

Des tests de spécificité et d'efficacité ont été réalisés sur les amorces utilisées pour les analyses ADNe effectuées durant le projet QuantiFish, qu'elles soient issues d'un article scientifique comme les amorces ciblant le génome mitochondrial du corégone (Hulley et al., 2019), ou nouvellement créées comme toutes les autres amorces utilisées ici.

IV.1.1 Tests de spécificité

Pour les tests *in silico*, tous les jeux d'amorces et de sonde ont montré des différences avec les séquences des autres espèces de poissons avec lesquelles ils ont été comparés. Pour les amorces mitochondriales, un minimum de 7 nucléotides de différence a été constaté entre les amorces ciblant le corégone et les séquences COI de la truite (*Salmo trutta*) et de l'ombre commun (*Thymallus thymallus*), tous trois des salmonidés, et un maximum de 26 nucléotides entre les amorces ciblant le brochet et la séquence COI de la blennie fluviatile (*Salaria fluviatilis*) (Tableau 3). Pour les jeux d'amorces et sonde ciblant les génomes nucléaires, le minimum de différences a été observés entre les amorces ciblant l'omble chevalier et la séquence ITS1 de la truite avec 9 nucléotides de différence, et le maximum entre les amorces ciblant l'omble chevalier et la séquence ITS1 du brochet avec 42 nucléotides de différence (Tableau 4).

Concernant les tests *in vitro*, ils ont tous montré une spécificité pour l'espèce ciblée (amplification uniquement de l'ADN de l'espèce ciblée et pas des 17 autres), mis à part les amorces nucléaires ciblant le gène ITS1 de la perche, pour lesquels une amplification a également été observée pour la brème commune (*Abramis brama*), le gardon (*Rutilus rutilus*), le rotengle (*Scardinius erythrophthalmus*), et le chevesne (*Squalius cephalus*), appartenant tous à la famille des cyprinidés comme la perche (Tableau 3 et 4).

Ces constatations mettent en avant l'intérêt crucial d'effectuer des tests *in silico* de spécificité au cours du processus de création de nouvelles amorces destinées à des usages en ADNe. Ces tests sont cependant dépendants des séquences disponibles dans les bases de données, et si certaines sont très complètes comme celles ciblant le gène COI, d'autres sont quasi vides comme celles ciblant le gène ITS1. Les tests *in vitro* de spécificité sont également indispensables et doivent être fait vis-à-vis du plus grand nombre de génomes différents possibles et surtout les plus proches phylogénétiquement. Nous avons vu avec le cas des amorces ciblant le génome mitochondrial de la perche qu'elles ciblaient également plusieurs autres percidés alors que rien n'était ressorti lors des tests PCR *in silico*, ce qui est sans doute explicable par le fait d'un faible nombre de séquences ITS1 présentes dans les bases de données utilisées.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des tests de spécificité réalisés sur les amorces ciblant les génomes mitochondriaux des quatre espèces d'intérêt, la perche, le corégone, le brochet et l'omble chevalier. Ce tableau montre le nombre de nucléotides de différence entre les amorces-sondes utilisées et les 33 autres espèces de poissons présents dans le Léman et les lacs des alentours, ainsi que les résultats de qPCR réalisées à partir de l'ADN provenant de tissu de l'espèce ciblée et de 17 autres espèces de poissons. Ct = nombre de cycles à partir desquels le signal est détecté. Les * indiquent les espèces pour lesquelles des tests in vitro en qPCR ont été réalisés sur des échantillons ADN extraits à partir de tissus.

<i>Espèces de poissons</i>	Amorces COI corégone (Hulley et al. 2019)		Amorces COI perche (ce projet)		Amorces COI brochet (ce projet)		Amorces COI omble chevalier (ce projet)	
	Différences	Ct	Différences	Ct	Différences	Ct	Différences	Ct
<i>Abramis brama</i> *	15	-	14	-	20	-	14	-
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	18		20		23		20	
<i>Alburnus alburnus</i>	16		13		21		16	
<i>Ameiurus melas</i> *	18	-	19	-	19	-	20	-
<i>Barbatula barbatula</i> *	13	-	15	-	22	-	16	-
<i>Barbus barbus</i> *	18	-	16	-	20	-	16	-
<i>Blicca bjoerkna</i>	14		17		19		15	
<i>Coregonus lavaretus</i> *	0	28.5	18	-	18	-	10	-
<i>Cottus gobio</i>	15		12		15		11	-
<i>Cyprinus carpio</i>	18		13		17		15	
<i>Esox lucius</i> *	18	-	15	-	0	27.3	15	-
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	19		18		17		18	
<i>Gobio gobio</i> *	18	-	13	-	23	-	16	-
<i>Gymnocephalus cernuus</i> *	15	-	14	-	18	-	17	-
<i>Lampetra planeri</i>	16		13		19		17	
<i>Lepomis gibbosus</i> *	17	-	18	-	21	-	16	-
<i>Leuciscus leuciscus</i>	17		16		18		16	
<i>Lota lota</i> *	17	-	15	-	19	-	19	-
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	13		20		18		12	
<i>Perca fluviatilis</i> *	14	-	0	27.7	18	-	20	-
<i>Phoxinus phoxinus</i>	17		18		18		16	
<i>Pseudorasbora parva</i>	19		15		21		17	
<i>Rhodeus amarus</i>	18		18		20		16	
<i>Rutilus rutilus</i> *	16	-	14	-	20	-	13	-
<i>Salaria fluviatilis</i>	13		17		26		17	
<i>Salmo trutta</i> *	7	-	18	-	17	-	10	-
<i>Salvelinus alpinus</i> *	10	-	18	-	17	-	0	30.2
<i>Sander lucioperca</i>	16		14		19		15	
<i>Scardinius erythrophthalmus</i> *	16	-	17	-	19	-	15	-
<i>Silurus glanis</i> *	16	-	18	-	14	-	14	-
<i>Squalius cephalus</i> *	15	-	16	-	19	-	16	-
<i>Telestes souffia</i>	14		16		19		13	
<i>Thymallus thymallus</i>	7		15		13		13	
<i>Tinca tinca</i> *	17	-	11	-	19	-	15	-
<i>Zingel asper</i>	17		12		19		16	

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des tests de spécificité réalisés sur les amorces ciblant les génomes nucléaires des quatre espèces d'intérêt, la perche, le corégone, le brochet et l'omble chevalier. Ce tableau montre le nombre de nucléotides de différence entre les amorces et sondes utilisées et 4 autres espèces de poissons présents dans le Léman, ainsi que les résultats de qPCR réalisées à partir de l'ADN provenant de tissu de l'espèce ciblée et de 17 autres espèces de poissons. Ct = nombre de cycles à partir desquels le signal est détecté. Les * indiquent les espèces pour lesquelles des tests in vitro en qPCR ont été réalisés sur des échantillons ADN extraits à partir de tissus.

<i>Espèces de poissons</i>	Amorces ITS1 corégone (ce projet)		Amorces ITS1 perche (ce projet)		Amorces ITS1 brochet (ce projet)		Amorces ITS1 omble chevalier (ce projet)	
	Différences	Ct	Différences	Ct	Différences	Ct	Différences	Ct
<i>Abramis brama</i>	-	-	-	33.7	-	-	-	-
<i>Ameiurus melas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Barbatula barbatula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Barbus barbus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coregonus lavaretus*</i>	0	25.6	40	-	38	-	17	-
<i>Esox lucius*</i>	41	-	34	-	0	24.0	42	-
<i>Gobio gobio</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gymnocephalus cernuus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lepomis gibbosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lota lota</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Perca fluviatilis*</i>	37	-	0	26.2	35	-	41	-
<i>Rutilus rutilus</i>	-	-	-	35.5	-	-	-	-
<i>Salmo trutta*</i>	16	-	38	-	39	-	9	-
<i>Salvelinus alpinus*</i>	17	-	41	-	38	-	0	25.1
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	-	-	-	35.3	-	-	-	-
<i>Silurus glanis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Squalius cephalus</i>	-	-	-	33.8	-	-	-	-
<i>Tinca tinca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

IV.1.2 Tests de sensibilité

Pour deux jeux d'amorces, ceux ciblant les génomes mitochondriaux de la perche et du corégone, des tests plus poussés ont été réalisés. Des tests de sensibilité ont été réalisés selon les recommandations du MIQE (« Minimum Information for Publication of Digital PCR Experiments») (Huggett et al., 2013), afin de permettre une comparaison robuste des mesures obtenues en dPCR, ainsi que des tests de spécificité supplémentaires afin de s'assurer que la présence d'ADN d'autres espèces n'avait pas d'influence sur la détectabilité de signal ADN de l'espèce cible.

Pour la sensibilité, des tests basés sur des séries de dilution ont montré que la diminution des concentrations mesurées suivait une relation linéaire presque parfaite pour les deux espèces de poissons, avec un coefficient de corrélation $r = 0,998$ (valeur $p < 0,001$) pour le corégone et $r = 0,999$ (valeur $p < 0,001$) pour la perche. Le niveau de dilution le plus élevé (1/312 500), avec une quantité d'ADN de poisson de 0,016 pg, n'a donné lieu à aucune amplification pour aucun des cinq réplicats quelle que soit l'espèce de poisson. Le LOD (c'est-à-dire la plus faible concentration en nombre de copies PCR à laquelle au moins une détection positive est mesurée parmi les 5 réplicats) était de 0,24 copies μl^{-1} (4,80 copies par réaction ddPCR) pour le corégone et de 0,11 copies μl^{-1} (2,20 copies par réaction ddPCR) pour la perche. Cette LOD a été obtenue pour la même dilution (1/62 500) ou quantité

d'ADN de poisson (0,08 pg) pour les 2 espèces. La LOQ (c'est-à-dire la plus faible concentration en nombre de copies PCR pour laquelle la méthode fournit des résultats avec 30 % d'incertitude) était de 0,63 copies μl^{-1} (12,60 copies par réaction ddPCR) pour le corégone et de 0,58 copies μl^{-1} (16,60 copies par réaction ddPCR) pour la perche, et a été obtenue pour la même dilution (1/12 500) ou la même quantité d'ADN de poisson (0,4 pg).

Concernant les tests de spécificité supplémentaires, que ce soit pour les amorces sélectionnées pour la perche ou le corégone, aucune amplification non spécifique n'a pu être détectée sur les 17 autres espèces. Lorsque l'ADN de l'espèce cible était présent, l'amplification s'est avérée efficace pour toutes les répliques et pour toutes les quantités d'ADN, à l'exception de la perche pour laquelle un des deux répliquats n'a pas pu être amplifié avec la plus faible quantité d'ADN (i.e., 0.08 pg, correspondant au LOD). Malgré la présence d'ADN provenant d'autres espèces de poissons, les séries de dilution ont montré que le déclin des concentrations mesurées suivait une relation linéaire presque parfaite pour les deux espèces de poissons ($r = 0,986$ avec une valeur $p < 0,001$ pour le corégone et $r = 0,987$ avec une valeur $p < 0,001$ pour la perche) (Figure 9).

Le calcul de la LOD et de la LOQ a permis de déterminer que le jeu d'amorces ciblant le corégone, initialement désigné pour la qPCR, était efficace en ddPCR, tout comme le jeu d'amorces ciblant la perche conçu dans cette étude, avec une efficacité similaire pour les deux ensembles d'amorces, et ce peu importe la quantité d'ADN cible ou la présence d'ADN d'autres poissons comme dans des échantillons ADNe. Ces calibrations ont été faites uniquement pour les génomes mitochondriaux de la perche et du corégone, mais elles seront également réalisées sur l'ensemble des amorces créées au cours de ce projet. On peut par ailleurs noter que pour le jeu d'amorces ciblant le génome mitochondrial de l'omble chevalier, la Ct à laquelle le signal ADN de l'omble chevalier est plus élevé que pour les autres jeux d'amorces (30,2 contre des valeurs allant de 27,3 à 28,5 pour les autres jeux d'amorces), laissant penser à une efficacité plus faible pour ces amorces et mettant en avant la nécessité de réaliser des tests supplémentaires pour s'en assurer.

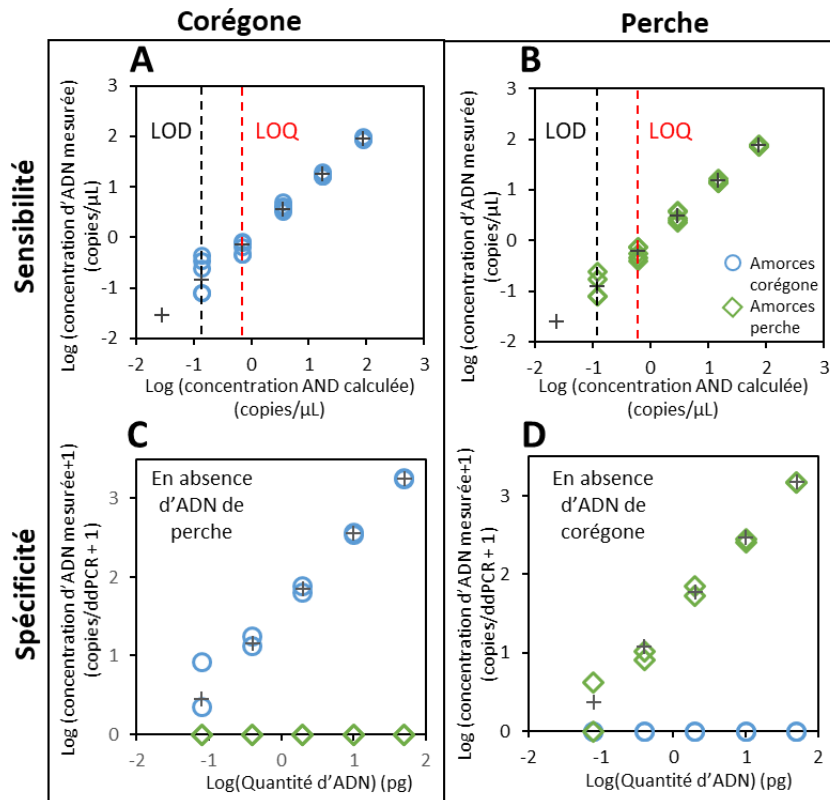


Figure 9 : Sensibilité, limite de détection (LOD), quantification (LOQ) et spécificité des jeux d'amorces. La sensibilité et les limites de détection et de quantification des jeux d'amorces ont été évaluées en utilisant six quantités d'ADN (50, 10, 0,4, 0,08 et 0,016 pg) obtenues à partir de cinq dilutions successives de la quantité d'ADN la plus élevée (50 pg), pour le corégone (A) et la perche (B) avec 5 réplicats chacun. La spécificité des jeux d'amorces a été déterminée avec un pool d'ADN provenant de 18 espèces de poissons (voir Tableau 3) avec du corégone et sans perche (C), avec de la perche et sans corégone (D). Pour chaque espèce, cinq quantités d'ADN (50, 10, 0,4 et 0,08 pg) ont été utilisées et obtenues à partir de cinq dilutions successives de la plus grande quantité d'ADN (50 pg). Croix grise = estimation théorique du nombre de copies du gène cible par puits de ddPCR, basée sur le nombre de copies du gène obtenu à partir de la plus grande quantité d'ADN. Amorces de corégone (cercle bleu), amorces de perche (losange vert).

IV.2 Comparaison entre suivis traditionnels et ADNe

La phénologie de la reproduction de quatre espèces de poissons (corégone, perche, brochet et omble chevalier) a été suivie via des méthodes ADNe dans le Léman, et quand cela a été possible, ces données ont été comparées à des résultats obtenus par des suivis traditionnels (pêche au filet, collecte d'œufs fécondés ou comptages visuels). Les quatre espèces ont été sélectionnées sur différents critères, comme l'intérêt économique et patrimonial des espèces, la capacité à collecter des données de suivis traditionnels, mais également dans le but d'avoir une diversité de caractéristiques associées à la phénologie de la reproduction (périodes, lieux, présence ou non de migration...).

IV.2.1 Cas du corégone

Le corégone est un poisson emblématique du Léman, et sa période de reproduction est suivie depuis de nombreuses années à l'aide de la pose de filets maillants par l'INRAE de Thonon-les-bains

(Goulon et al., 2022). Sa période de reproduction se déroule en hiver, et en zone littorale. Au cours des hivers 2018/2019, 2019/2020 et 2020/2021, nous avons comparé les résultats de pêche aux filets maillants à ceux obtenus avec des prélèvements d'eau discrets (1 prélèvement d'eau de 2 L à deux endroits du linéaire de pose des filets). Pour les trois années de suivi, l'ADNe de corégone a pu être détecté à chaque date d'échantillonnage et pour les deux réplicats de ddPCR. Pour les trois hivers, tant le signal de l'ADNe du corégone que le nombre de corégonnes capturés, permettent d'identifier un début d'activité de reproduction à partir de début décembre, se poursuivant jusqu'à la mi/fin janvier, avec donc une durée totale de 6 à 8 semaines selon l'année. Pour les trois périodes de suivi, et pour les deux méthodes (ADNe et traditionnelle), un pic majeur unique a été atteint entre la mi-décembre et le début janvier. Les pics étaient concomitants pour l'ADNe et le suivi traditionnel au cours des hivers 2018/2019 et 2020/2021. Ce n'est que durant l'hiver 2019 que les pics identifiés avec les deux méthodes n'ont pas été simultanés : le pic d'ADNe a été atteint mi-décembre alors que pour le suivi traditionnel, le nombre maximal de poissons capturés dans les filets maillants a été atteint début janvier (Figure 10).

Au cours de ces trois années de suivis nous avons observé une baisse graduelle du nombre de corégonnes capturés, pour atteindre seulement 5 corégonnes capturés au cours de l'hiver 2020/2021, ce qui rend l'analyse des données de pêche très fragile. Nous avons donc mis en place un nouveau type de suivi traditionnel à partir de l'hiver 2020/2021, suivi consistant en un comptage visuel des individus venant se reproduire le long de la berge. Nous avons également modifié notre façon d'échantillonner l'eau afin de prendre en compte la variabilité spatiale, et nous avons donc réalisé des échantillonnages intégrés (10 sous-échantillons de 200mL rassemblés en un échantillon de 2L). En comparant ces deux nouvelles approches, une excellente corrélation entre le suivi ADNe intégré et les comptages visuels a pu être obtenue concernant les pics de reproduction qui se situent fin décembre pour les deux années. Avec plusieurs dizaines d'individus observés pendant le pic de la reproduction, les comptages visuels représentent une alternative plus robuste que les filets maillants, et ils ont également l'avantage d'être non invasifs. On peut par contre constater qu'en début et en fin de période de reproduction les comptages visuels ne permettent d'observer que très peu d'individus alors que l'ADNe montre une nette augmentation et un net déclin à ces périodes (Figure 10).

Pour le corégone, le suivi hebdomadaire de l'ADNe a donc permis d'estimer le début et la fin de la période de frai. Nous avons globalement observé une bonne cohérence entre les résultats de l'ADNe et les observations faites par les méthodes traditionnelles, avec des pics concomitants, ou presque concomitants. **Globalement, une bonne correspondance est donc observée entre les méthodes traditionnelles et l'ADNe.** La seule exception concerne l'hiver 2019, où un décalage important a été constaté entre le pic d'ADNe et celui trouvé avec les filets maillants, ce qui pourrait facilement s'expliquer par le fait que certains des échantillonnages au filet maillant ont manqué (en raison de mauvaises conditions météorologiques) exactement au moment du pic de frai attendu (fin décembre). De plus, les données quantitatives fournies par l'échantillonnage au filet maillant n'ont pas été considérées comme robustes en raison du nombre total relativement faible de poissons capturés (un total de 5 poissons en 2020/2021, 13 en 2019/2020 et 19 en 2018/2019) alors que, avec 397 corégonnes observés en 2020/2021, le comptage visuel semble plus robuste pour la comparaison avec l'ADNe.

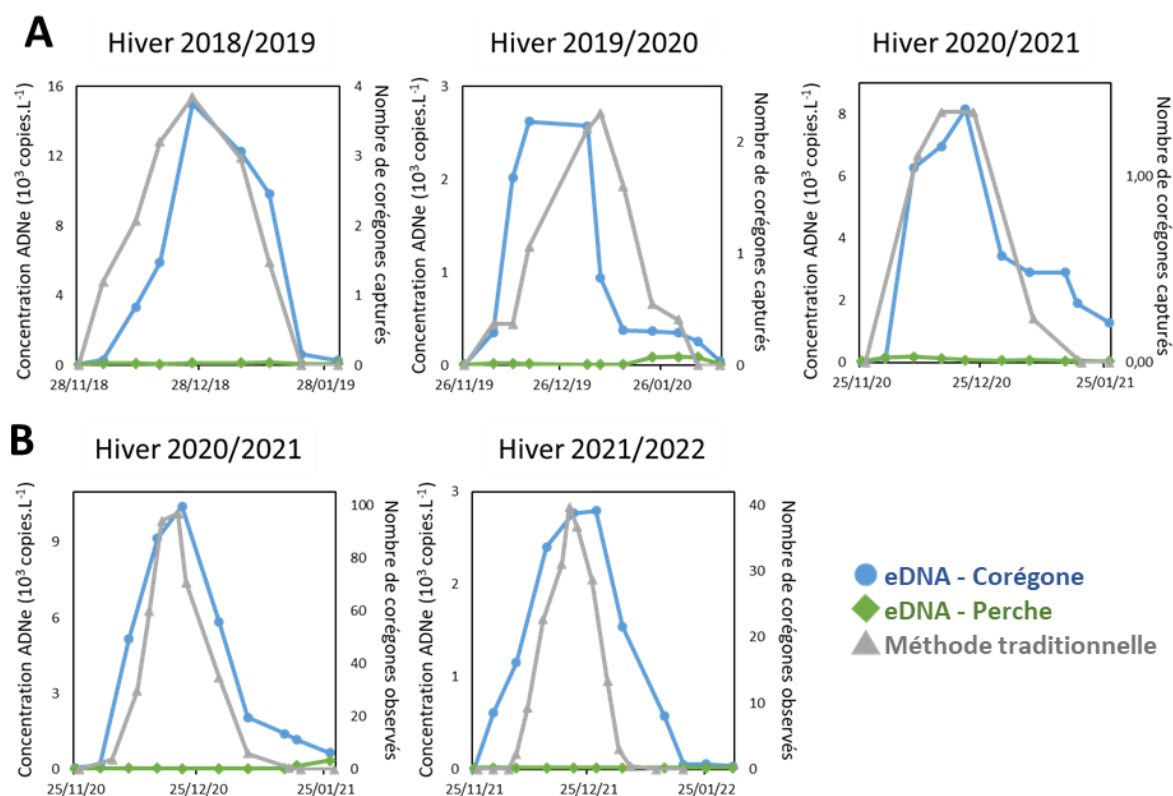


Figure 10 : Comparaison entre méthodes traditionnelles et ADNe pour le suivi de la phénologie de la reproduction du corégone dans le Léman. **A** : Echantillonnage ADNe ponctuel comparé aux données de pêches au filet maillant. **B** : Echantillonnage ADNe intégré comparé aux données de comptages visuels. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes mobiles sur trois dates consécutives.

IV.2.2 Cas de la perche

Le perche est également un poisson emblématique du Léman, poisson exploité par la pêche professionnelle. Sa période de reproduction est suivie depuis de nombreuses années par l'INRAE de Thonon-les-bains à l'aide de collecte œufs fécondés sur des frayères artificielles (Goulon et al., 2022 ; Gillet et al., 2023). Sa période de reproduction se déroule au printemps, et en zone littorale. Au cours des printemps 2019 et 2020 nous avons comparé les résultats de collecte de rubans d'œufs à ceux obtenus avec des prélèvements ADNe d'eau discrets (1 prélèvement d'eau de 2 L au niveau de chacune des frayères). Malheureusement aucun suivi n'a pu être réalisé en 2020 en raison des restrictions liées à la pandémie du COVID-19.

L'ADNe de la perche a pu être détecté à chacune des dates d'échantillonnage pour au moins un des deux réplicats de ddPCR. La dynamique temporelle est similaire pour l'ADNe et les méthodes traditionnelles. Le signal de l'ADNe de la perche et le nombre de rubans d'œufs ont tous deux augmenté à partir de la mi-avril, pour atteindre un pic entre début et mi-mai, et diminuer jusqu'à début juin. Les

deux méthodes ont permis de conclure à une durée de frai équivalente d'environ 8 semaines pour les deux années (Figure 11).

Le suivi hebdomadaire via l'ADNe a permis d'estimer le début et la fin de la période de frai. Nous avons observé une bonne cohérence entre les résultats ADNe et les observations faites par les méthodes traditionnelles, avec des pics concomitants, ou presque concomitants.

De plus, on compare ici l'ADNe à la collecte d'œufs fécondés et lorsque que l'on sait que les perches restent sur site après la période de reproduction, on peut en conclure que l'augmentation du signal ADNe n'est pas liée qu'au regroupement d'individus sur les sites de reproduction, mais également à l'activité de reproduction (gamètes, comportement de reproduction, ...).

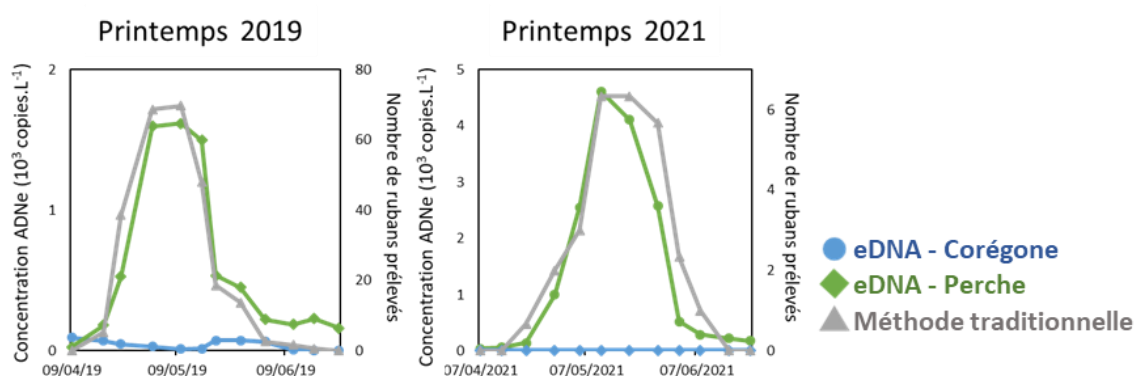


Figure 11 : Comparaison entre les méthodes traditionnelles et ADNe pour le suivi de la phénologie de la reproduction de la perche dans le Léman. Moyenne des résultats des trois zones exprimés sous forme de moyennes mobiles sur trois dates consécutives.

IV.2.3 Cas du brochet

Le brochet est une espèce protégée en France, et en particulier ses sites de reproduction (Puissauve et Poulet, 2015). Le grand brochet fraie au printemps lorsque les eaux peu profondes se réchauffent à 8-12°C. Le substrat optimal pour le frai est une végétation inondée dans une zone peu profonde et abritée du vent et des vagues (Casselman et Lewis, 1996). Dans le Léman sa reproduction n'est pas suivie par une méthode traditionnelle et ses lieux de frai ne sont supposés que par des observations de brochets au moment de la période de la reproduction. Au cours de deux printemps successifs, 2021 et 2022, nous avons donc initié un suivi ADNe complété d'un suivi traditionnel (comptages visuels) dans le port de Thonon-les-Bains où des brochets sont observés chaque printemps. Les dates de fermeture de la pêche au brochet dans le Léman étant du 1 au 21 avril, nous avons débuté nos suivis fin mars (Figure 12).

Au cours de la période de reproduction du brochet on observe une bonne concordance entre les suivis traditionnels et ADNe. Le signal augmente à partir de fin mars les deux années et avec les deux méthodes, on observe un pic entre mi-avril et fin avril, puis une diminution des signaux

entre fin avril et début mai. En 2022 les deux méthodes montrent une évolution temporelle quasi identique, tandis qu'en 2021 on observe un léger décalage entre les deux méthodes, avec une cinétique légèrement plus précoce pour le suivi traditionnel. Ces observations ne sont pas surprenantes car il est largement décrit que les brochets mâles arrivent de façon précoce, puis sont suivis par les femelles, moment à partir duquel la reproduction peut alors débuter (Casselman et Lewis, 1996).

Ces observations laissent supposer que le port de Thonon-les-Bains est bien un site de frai pour le grand brochet, et qu'un suivi ADNe semble efficace pour estimer les dates clefs de sa période de reproduction.

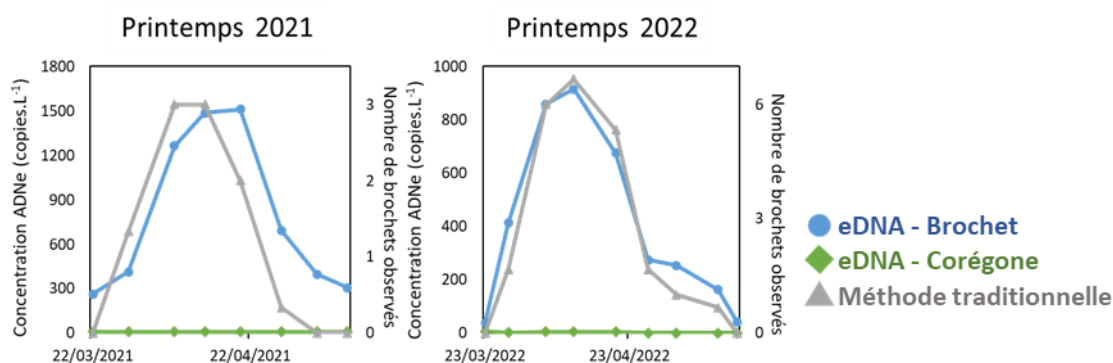


Figure 12 : Comparaison entre les méthodes traditionnelles et ADNe pour le suivi de la phénologie de la reproduction du brochet dans le Léman. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes mobiles sur trois dates consécutives.

IV.2.4 Cas de l'omble chevalier

L'omble chevalier est un poisson emblématique du Léman, mais malgré un intense effort de repeuplement, les captures d'ombles chevaliers dans le Léman sont en forte diminution depuis les années 2000. Un gros travail a été réalisé par Rubin (2005) dans le but de localiser et de caractériser les omblières dans les zones profondes (50 - 120m) du Léman. Mis à part ces observations faites au début des années 2000, aucun suivi traditionnel de la reproduction n'est mis en place sur le Léman concernant l'omble chevalier. Le fait que les omblières soient en profondeur complique la mise en place de ce genre de suivis et nos tentatives se sont révélées infructueuses. Les ombles se reproduisent entre novembre et janvier, lorsque la température de l'eau s'abaisse sous les 7° C, et nous avons donc réalisé des prélèvements d'eau de mi-novembre à fin janvier afin de balayer toute la période potentielle de la reproduction. L'omblière choisie est celle de Ripaille, elle se trouve à une cinquantaine de mètres de profondeur, elle est toujours active et l'eau a été prélevée 1 m au-dessus de l'omblière (Figure 13).

Pour les deux années de suivis, le signal ADNe de l'omble chevalier augmente dès la mi-novembre, le pic se situe fin novembre et le signal décroît jusqu'à début janvier. Au cours de l'hiver 2021/2022 il y a cependant deux dates, mi-décembre, pour lesquelles le signal est très faible, puis il remonte légèrement pour enfin diminuer. **Malgré l'absence de suivi traditionnel pour comparer les données ADNe, les cinétiques des signaux ADNe concordent parfaitement avec les dates supposées de la reproduction de l'omble chevalier et laissent penser qu'un tel suivi**

peut également efficace pour les espèces se reproduisant en profondeur et pour lesquelles il est compliqué de mettre en place un suivi traditionnel.

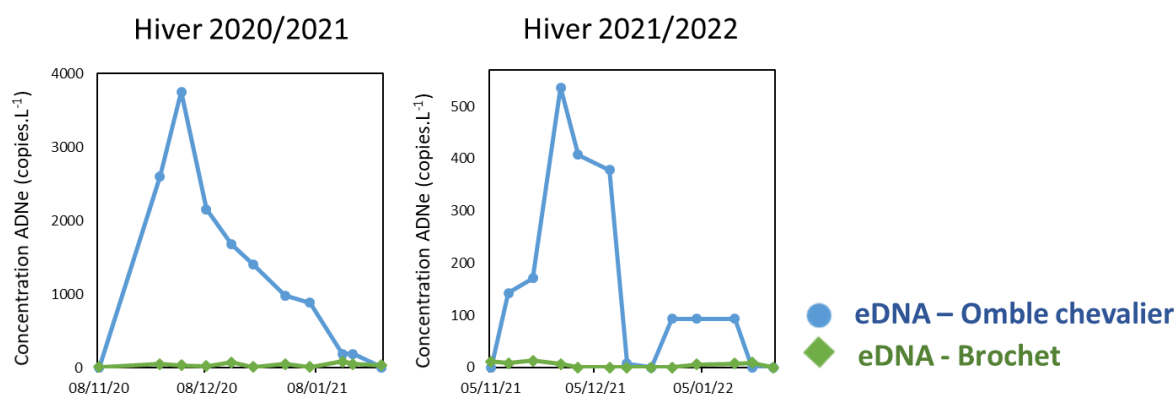


Figure 13 : Suivi de la phénologie de la reproduction de l'omble chevalier dans le Léman, en utilisant une méthode ADNe. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes mobiles sur trois dates consécutives.

IV.2.5 L'utilisation d'espèces ADNe contrôles

Pour s'assurer que les fluctuations du signal ADNe observées lors des suivis de la phénologie de la reproduction n'affectent pas l'ensemble du signal ADNe poisson (par exemple, effet de phénomène hydrodynamiques induisant le déplacement de l'ensemble des signaux ADNe) et sont bien spécifiques à la reproduction, nous avons choisis de mesurer en parallèle le signal ADNe d'une espèce qui ne se reproduit pas à la même période, et que nous appelons espèce ADNe contrôle. Pour la reproduction du corégone, nous avons choisi la perche qui se reproduit au printemps, pour la perche et le brochet qui se reproduisent au printemps c'est le corégone qui a été choisi, et pour l'omble chevalier c'est le brochet qui a été choisi car en hiver les perches peuvent se situer à une cinquantaine de mètres de profondeur et donc à proximité de l'ombrière que nous avons sélectionnée, tandis que le brochet se trouve généralement à des profondeurs moins importante l'hiver. L'espèce contrôle ne doit pas se reproduire à la même période, mais il ne doit également pas y avoir d'interactions entre les deux espèces (ex : prédation des œufs de l'une par l'autre). Pour les suivis réalisés sur les quatre espèces on observe que le signal ADNe de l'espèce contrôle reste systématiquement à un niveau faible, que l'on pourrait appeler basal, avec peu ou pas de fluctuations dans le temps, tandis que pour les espèces se reproduisant nous observons un pic unique et majeur s'étalant sur plusieurs semaines.

IV.3 Cibles génomiques nucléaires et mitochondriales

Le génome mitochondrial est généralement ciblé lors des études ADNe concernant les poissons, car il y a de nombreuses mitochondries, et donc de nombreux génomes mitochondriaux par cellule, et par conséquent potentiellement un signal plus important dans l'environnement. Cibler le

génomique mitochondriale a cependant un inconvénient majeur lors de suivis de la reproduction puisqu'il est quasiment absent des spermatozoïdes. Nous avons donc décidé de comparer les signaux ADN mitochondrial et nucléaire lors de la reproduction de différentes espèces afin de déterminer laquelle des deux cibles était la plus efficace dans ce contexte comme cela a déjà été fait pour la perche Macquarie en rivière en rivières (Bylemans et al, 2017).

IV.3.1 Cas du corégone

Au cours de deux hivers successifs, 2020/2021 et 2021/2022, le génome nucléaire du corégone a été ciblé en plus du génome mitochondrial. Dans les deux cas une amplitude de signal ADN beaucoup plus importante est observée avec le génome nucléaire en comparaison du génome mitochondrial. Le ratio signal nucléaire/signal mitochondrial est de 7 au moment du pic durant l'hiver 2020/2021, et il atteint 59 pour l'hiver 2021/2022. Les pics sont cependant atteints à la même date quels que soient les génomes ciblés. Pour l'hiver 2020/2021, le signal mitochondrial diminue plus rapidement que le signal nucléaire après le pic, laissant supposer un moins grand nombre d'individus, mais un relargage des gamètes toujours important, tandis qu'en 2021/2022 les deux profils sont identiques, suggérant une concomitance entre la présence des individus et le relargage des gamètes (Figure 14). **Le signal basal issu des deux génomes est similaire, mais l'amplitude au cours de la reproduction est bien plus élevée pour le génome nucléaire, en faisant une cible à privilégier lors de suivis ADN de la reproduction, en complément ou non du signal mitochondrial.**

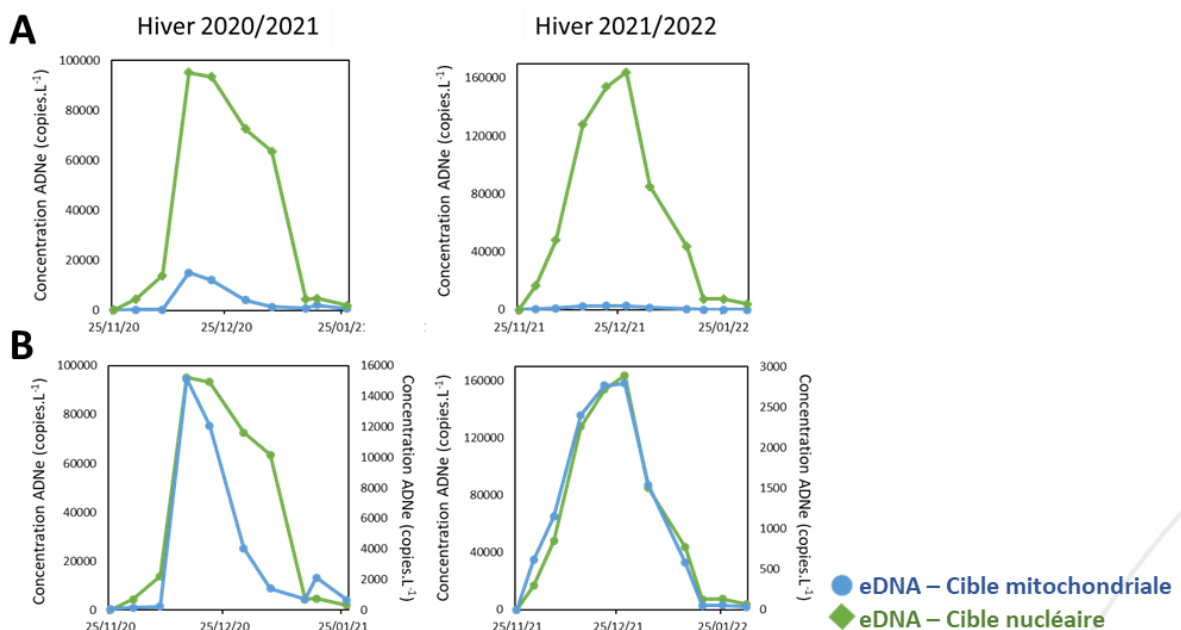


Figure 14 : Comparaison d'une cible nucléaire et mitochondriale pour le suivi ADN de la phénologie de la reproduction du corégone dans le Léman. **A** : Résultats exprimés sur la même échelle de concentration ADN. **B** : Résultats exprimés sur deux échelles de concentration ADN différentes. Les échantillons ADN sont intégrés. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes mobiles sur trois dates consécutives.

IV.3.2 Cas de l'omble chevalier

Dans le cas de l'omble chevalier, le génome nucléaire et mitochondrial ont été ciblés parallèlement au cours d'un hiver de suivi ADNe. Les constatations sont les mêmes que pour le corégone : **le signal nucléaire a une amplitude bien plus importante que le signal mitochondrial**, avec un ratio de quasiment 500 en faveur du nucléaire au moment du pic. Les cinétiques sont cependant également les mêmes, que ce soit pour le début, le pic et la fin de la reproduction supposée de l'omble chevalier (Figure 15).

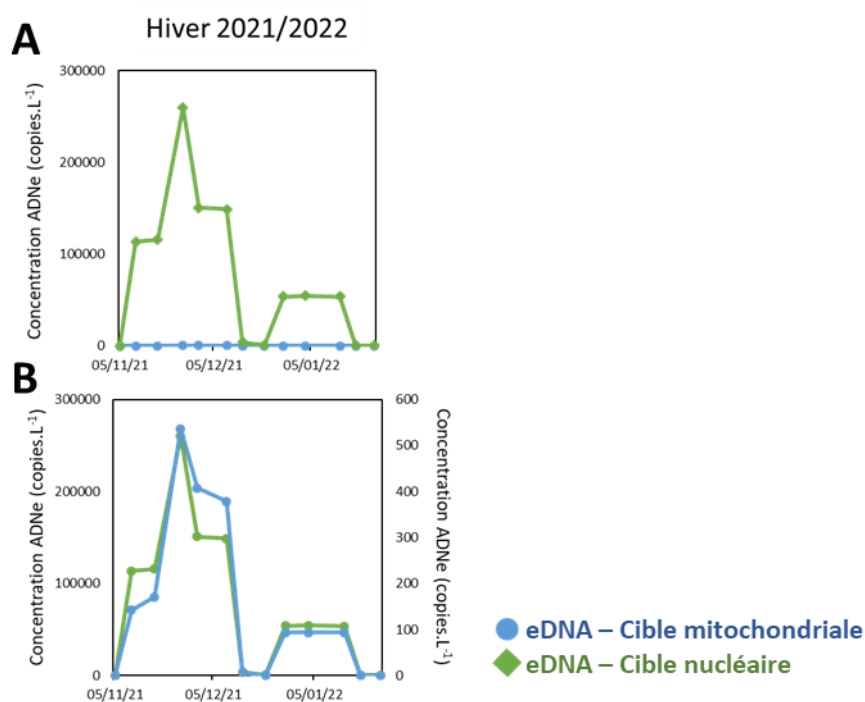


Figure 15 : Comparaison d'une cible nucléaire et mitochondriale pour le suivi ADNe de la phénologie de la reproduction de l'omble chevalier dans le Léman. **A** : Résultats exprimés sur la même échelle de concentration ADNe. **B** : Résultats exprimés sur deux échelles de concentration ADNe différentes. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes mobiles sur trois dates consécutives.

IV.3.3 Cas du brochet

Dans le cas du suivi de la reproduction du brochet, les sites de frai étant peu connus sur le Léman, nous avons réalisé des suivis au niveau de quatre sites différents et mesuré les signaux ADNe nucléaires et mitochondriaux :

- Port de Thonon : Il s'agit du site pour lesquels une activité de reproduction est observée chaque année. Le signal mitochondrial est concordant avec les observations visuelles, et le signal nucléaire, bien plus fort (ratio d'environ 600) que le signal mitochondrial, suit exactement la même dynamique. La fin de la décroissance des signaux nucléaires et mitochondriaux varie quelque peu, avec un petit plateau légèrement plus élevé pour le signal mitochondrial (absent pour le signal nucléaire), laissant penser que les brochets observés sur sites lors de ces dates

tardives (fin avril à début mai) ne libèrent plus de gamètes et que l'activité de reproduction semble donc terminée (Figure 16).

- Roselière de Chens-sur-Léman : Aucun Brochet n'a été observé pendant la période de reproduction, mais un signal ADNe mitochondrial ayant un profil en cloche et faisant penser à un signal ADNe de reproduction est identifié, toutefois celui-ci est de faible intensité (maximum de 24,8 copies par litre d'eau filtré contre 914,9 dans le port de Thonon), tardif par rapport à celui observé dans le port de Thonon-les-Bains (pic observé fin mai à Nernier et mi-avril à Thonon-les-Bains) et à la période supposée de la reproduction (courant avril dans le Léman). Le signal nucléaire quant à lui fluctue peu sur la période étudiée et ne suit ni un profil en cloche, ni la même tendance que le signal mitochondrial (Figure 16). En recoupant les informations obtenues avec les signaux nucléaires et mitochondriaux, on peut raisonnablement écarter l'hypothèse d'une reproduction sur le site de Chens-sur-Léman, et l'augmentation du signal mitochondrial à partir de fin avril peut probablement être attribuée au réchauffement de l'eau du lac et donc à la reprise d'activité des brochets qui sont peu actifs l'hiver (Casselmann et Lewis, 1996).
- Port INRAE : Aucune observation de brochet n'a été faite pendant la période de reproduction et le signal ADNe mitochondrial est nul. Le signal ADNe nucléaire montre par contre un profil en cloche pouvant être relié à de la reproduction, même si un peu plus tardif que celui observé au port de Thonon-les Bains (décalage de 9 jours) et beaucoup plus faible (maximum de 197,8 copies par litre d'eau filtré contre 539260,5 dans le port de Thonon) (Figure 16). A partir de ces observations on pourrait émettre l'hypothèse que le signal nucléaire capté provient de sites de reproduction situés à proximité et que l'on capte peut-être un signal de reproduction secondaire, une absence d'individus et donc de signal mitochondrial, mais la présence d'un faible signal nucléaire ayant les caractéristiques d'un signal de reproduction.
- Port de Nernier : Aucune observation de brochet n'a été faite pendant la période de reproduction mais un signal ADNe mitochondrial de forte intensité (4,5 fois plus fort quand dans le port d Thonon-les-Bains au moment du pic) a été mesuré et il correspondait aux dates et au profil de reproduction identifiés dans le port de Thonon-les-Bains. Le signal nucléaire est quant à lui bien plus élevé que le signal mitochondrial (ratio d'environ 400), mais avec un profil quasiment identique (Figure 16). Malgré l'absence d'observations visuelles, la mesure des signaux ADNe nucléaires et mitochondriaux tend à montrer que le site du port de Nernier est bien un site de frai pour le brochet, et qu'il est même sans doute plus important que celui du port de Thonon-les Bains.

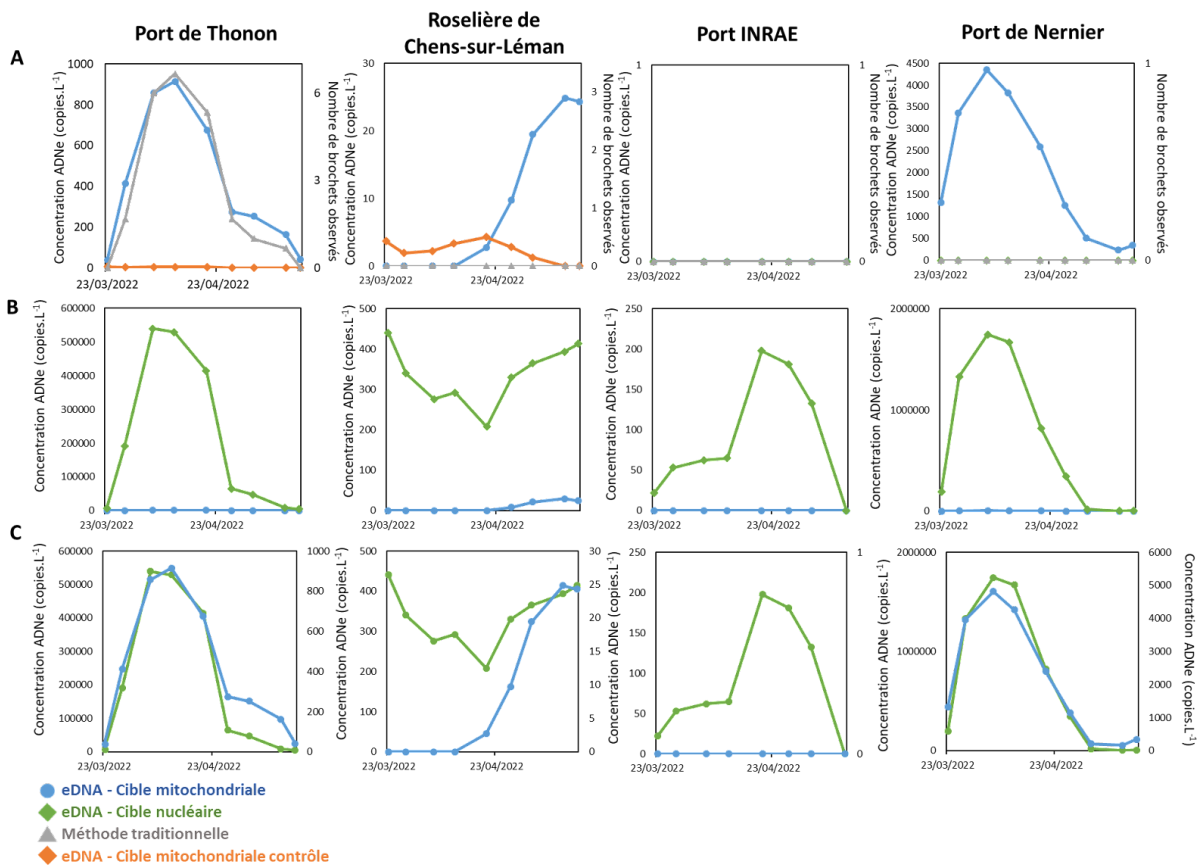


Figure 16 : Comparaison d'une cible nucléaire et mitochondriale pour le suivi ADNe de la phénologie de la reproduction du brochet dans le Léman. **A** : Cibles mitochondriales pour le brochet et l'espèce ADNe contrôle, le corégone, comparées à la méthode traditionnelle, les comptages visuels. **B** : Cibles mitochondriales et nucléaires pour le brochet. Résultats exprimés sur la même échelle de concentration ADNe. **C** : Cibles mitochondriales et nucléaires pour le brochet. Résultats exprimés sur deux échelles de concentration ADNe différentes. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes mobiles sur trois dates consécutives.

IV.4 Distribution spatiale et persistance du signal

IV.4.1 Variabilité spatiale

Ici, nous avons considéré indépendamment les résultats ddPCR obtenus pour chaque zone d'échantillonnage des sites de frai (3 zones pour le suivi de la perche et 2 zones pour le suivi du corégone) afin d'évaluer la variabilité spatiale du signal ADNe entre les différentes zones (au sein d'un même lieu de reproduction).

Les suivis ADNe et traditionnels de la perche ont été réalisés dans trois zones distinctes (les zones 1 et 2 sont distantes de 65 m, et 20 m séparent les zones 2 et 3). Pour les deux approches et pour les trois zones, le pic de ponte a été atteint au début du mois de mai (entre le 2 et le 10 mai), mais l'intensité des pics a varié significativement entre la zone 1 et les deux autres zones. Pour le suivi ADNe, le pic le plus élevé a été observé dans la zone 1 (6 780,3 copies.L⁻¹), et le plus bas dans la zone 3 (2

270,2 copies.L⁻¹). En ce qui concerne le suivi traditionnel, nous avons également observé des variations significatives de l'intensité des pics entre la zone 1 et les deux autres zones, mais le pic le plus élevé a été, dans ce cas, observé dans la zone 2 (77 rubans d'œufs), et le plus bas dans la zone 1 (4 rubans d'œufs) (Figure 17).

On constate donc qu'il existe une importante variabilité spatiale entre des zones séparées de seulement quelques dizaines de mètres, et que cette variabilité ne reflète pas nécessairement la variabilité constatée avec les méthodes traditionnelles.

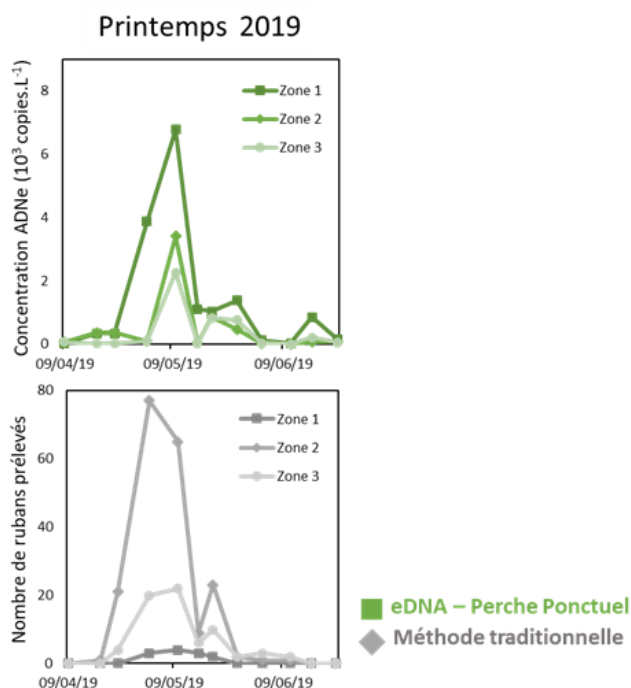


Figure 17 : Variabilité spatiale horizontale au niveau de 3 zones d'échantillonnage lors du suivi de la phénologie de la reproduction de la perche dans le Léman, via des méthodes ADNe ou traditionnelles.

Durant l'hiver 2020/2021, le suivi de la reproduction du corégone a été réalisé dans deux zones distinctes de la frayère (chaque zone fait environ 250m de long et les deux zones sont séparées d'environ 30 mètres), en utilisant deux approches ADNe (échantillonnage discret et intégré) et deux approches traditionnelles (filet maillant et comptage visuel). Pour les quatre approches et les deux zones, le pic de frai a été atteint vers la mi-décembre (entre le 15 et le 22 décembre). Cependant, l'intensité des pics a varié entre les deux zones, avec un signal plus élevé dans la zone 1 pour le suivi de l'ADNe et la pêche au filet maillant, tandis qu'un signal plus élevé a été détecté dans la zone 2 pour le comptage visuel. Pour la méthode ADNe, la stratégie d'échantillonnage intégré semble réduire la variabilité des signaux ADNe par rapport à la stratégie d'échantillonnage discrète. Pour les échantillons intégrés, la différence d'intensité entre les deux pics (18 489,9 copies.L⁻¹ pour la zone 1 et 13 900,4 copies.L⁻¹ pour la zone 2) est modérée, alors que pour les échantillons discrets, le pic de la zone 2 (4 207,0 copies.L⁻¹) est beaucoup plus faible que celui de la zone 1 (14 538,7 copies.L⁻¹). Les valeurs

moyennes d'ADNe obtenues sur l'ensemble de l'étude temporelle étaient similaires dans la zone 1 et dans la zone 2 pour les échantillons intégrés (moyenne de 3 878,0 copies.L⁻¹ et 3 483,9 copies.L⁻¹, dans les zones 1 et 2, respectivement), alors qu'une différence importante entre la zone 1 (moyenne de 2 765,0 copies.L⁻¹) et la zone 2 (moyenne de 781,6 copies.L⁻¹) a été trouvée avec les échantillons discrets. Concernant le suivi traditionnel, pour le filet maillant, le nombre total de corégones capturés était très faible (3 dans la zone 1 et 2 dans la zone 2), alors qu'avec le comptage visuel, le nombre de corégones observés était significativement plus élevé dans la zone 2 (280 au total, avec un pic atteignant 72) que dans la zone 1 (117 au total, avec un pic à 40) (Figure 18).

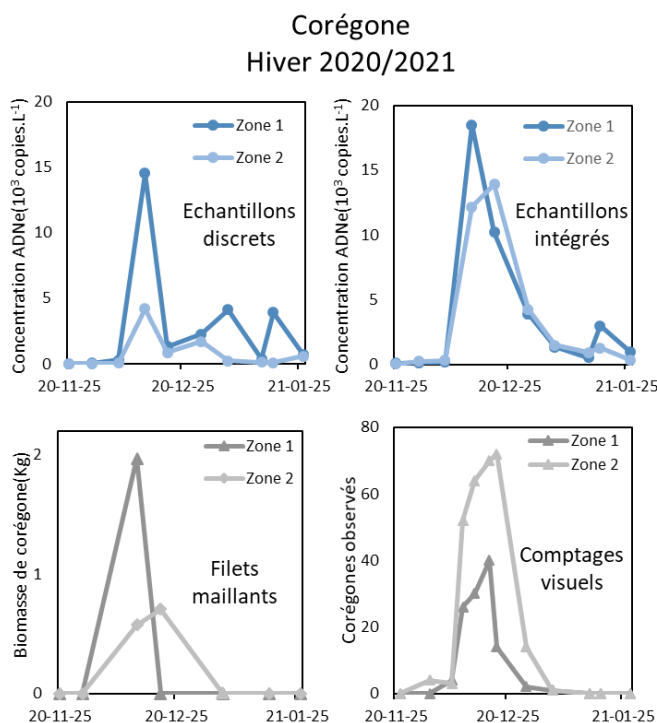


Figure 18 : Variabilité spatiale horizontale au niveau de deux zones d'échantillonnage lors du suivi de la phénologie de la reproduction du corégone dans le Léman, via des méthodes ADNe (échantillonnage discret ou intégré) ou traditionnelles (filets maillants ou comptages visuels).

En comparant les stratégies d'échantillonnage discrètes et intégrées lors du suivi ADNe de la reproduction de la perche et du corégone, on peut observer que les tendances sont les mêmes pour les dates de début, de fin et de pic de la période de reproduction, mais le signal ADNe est globalement plus fort pendant la période de reproduction, alors qu'en dehors de celle-ci il est similaire à celui de la stratégie discrète (Figure 19). **Nous émettons donc l'hypothèse qu'en intégrant des sous-échantillons (dix sous-échantillons de 200 mL) au lieu de réaliser un échantillon discret (un échantillon de 2 L), nous parvenons à augmenter l'intensité du signal ADNe réparti de façon hétérogène dans le milieu, en plus de lisser la variabilité spatiale horizontale du signal ADNe observée entre les différentes zones de prélèvement.**

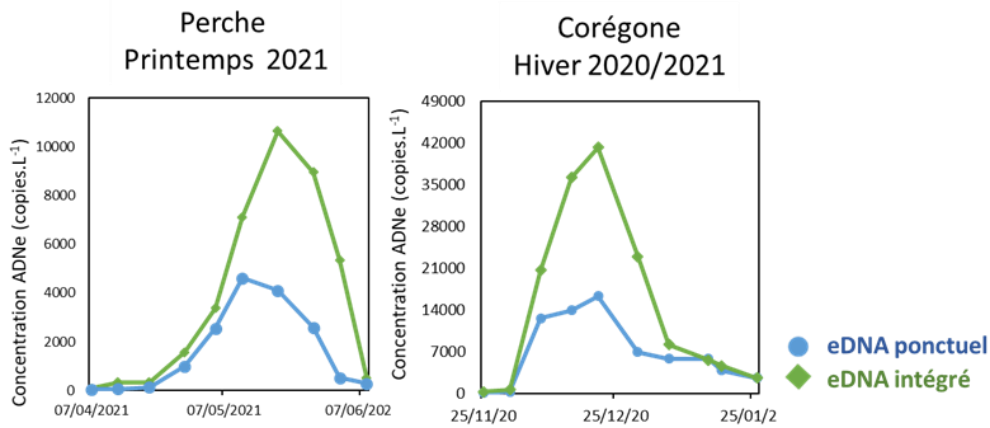


Figure 19 : Comparaison des stratégies d'échantillonnage intégrées et ponctuelles lors du suivi ADNe de la phénologie de la reproduction de la perche et du corégone dans le Léman.

Quelle que soit la stratégie d'échantillonnage de l'ADNe que nous avons appliquée (échantillons d'eau discrets ou intégrés), nous avons pu identifier les périodes de frai des poissons étudiés et le pic de reproduction. Cependant, avec la stratégie d'échantillonnage discrète, nous avons observé une variabilité spatiale du signal ADNe, c'est-à-dire une variabilité pour les échantillons collectés à seulement quelques dizaines de mètres de distance dans la zone de frai, tant pour le suivi de la perche que pour celui du corégone. Il a déjà été démontré que l'ADNe est distribué de manière hétérogène dans les étangs ou les lacs et que le signal de l'ADNe diminue sur de courtes distances allant de quelques mètres à quelques centaines de mètres (Pilliod et al., 2013 ; Eichmiller et al., 2014, Lawson Handley et al., 2019). Cependant, **nous soulignons ici que même pendant l'activité de frai des poissons, alors que d'énormes quantités d'ADNe sont libérées, le signal n'est pas uniformément distribué sur toute la zone de frai, et qu'il existe un risque de sous-estimer ou de surestimer le signal de frai via l'ADNe, et en particulier si la stratégie d'échantillonnage est basée sur un seul échantillon discret.** L'endroit exact où le plus grand nombre de rubans d'œufs a été observé n'était pas nécessairement l'endroit où la plus grande quantité d'ADNe de perche a été trouvée avec des échantillons discrets. L'échantillonnage est une étape cruciale pour les approches d'ADNe, et nous soulignons ici la nécessité de prendre en compte la variabilité spatiale potentielle de l'ADNe dans la zone de frai. Une stratégie d'échantillonnage intégrée peut aider à lisser l'hétérogénéité potentielle du signal ADNe, par exemple en utilisant le regroupement d'échantillons multiples (ou éventuellement d'autres méthodes pour réaliser échantillonnage intégré ; par exemple l'échantillonnage utilisé par Civade et al. (2016)). Nous avons montré que l'intégration de plusieurs sous-échantillons à partir de la même station d'échantillonnage a permis d'obtenir un timing très constant pour les pics d'activité de frai dans les deux zones suivies (également cohérent avec le suivi traditionnel), et a en outre permis d'obtenir un signal d'ADNe plus fort par rapport à la stratégie discrète. Même s'il a été démontré qu'intégrer des échantillons multiples diminue la probabilité de détecter des signaux ADNe rares (Sato et al., 2017), elle peut réduire la variabilité du signal ADNe fort émis pendant l'activité de frai. Par conséquent, **nous recommandons d'utiliser l'approche d'échantillonnage intégré pour suivre l'ADNe libéré pendant le frai des poissons.**

IV.4.2 Distribution verticale du signal ADNe

La répartition du signal ADNe n'est pas à prendre en compte uniquement sur un plan horizontal, mais également sur un plan vertical. Pour l'omble chevalier qui se reproduit en profondeur (50m pour l'ombrière de Ripaille qui est notre site d'étude), on pourrait s'attendre à capter le signal ADNe en surface sachant que le site de frai est situé à 50 m et que le signal ADNe émis lors de la période de reproduction est très important. Ce n'est pourtant pas ce qui a été observé, puisqu'on observe une absence de fluctuation significative du signal ADNe ciblant l'omble chevalier dans l'échantillonnage de surface (valeurs comprises entre 3,5 et 17,0 copies.L⁻¹), tandis qu'en profondeur, au plus proche de l'ombrière, le signal débute à 6,0 copies.L⁻¹ augmente pour atteindre 3751,9 copies.L⁻¹ , puis décroît pour revenir à des valeurs proches de son niveau de départ, 5,26 copies.L⁻¹ (Figure 20). **Ces observations renforcent l'idée de l'importance cruciale de prélever les échantillons d'eau au plus proche des sites de frai, et cela même sur un plan vertical.**

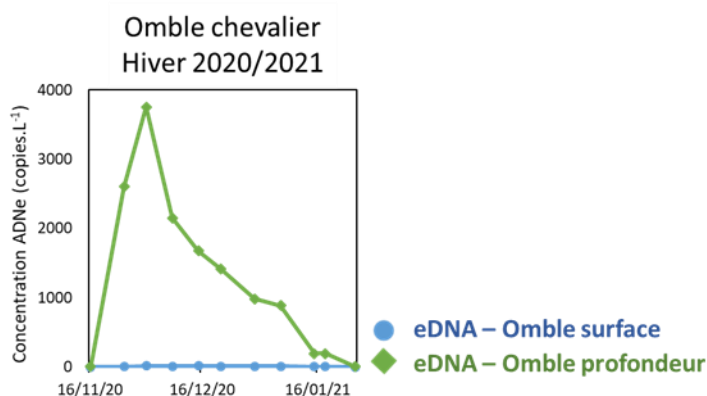


Figure 20 : Comparaison des stratégies d'échantillonnage en profondeur et en surface lors du suivi ADNe de la phénologie de la reproduction de l'omble chevalier dans le Léman.

IV.4.3 Persistance temporelle

Malgré le fait que nous étudions un milieu lentique, et donc caractérisé par de faibles mouvements d'eau, nous avons émis l'hypothèse que le signal ADNe libéré lors de l'activité de reproduction des poissons pouvait fluctuer à de courtes échelles de temps. Pour vérifier cette hypothèse nous avons utilisé le suivi de la reproduction du corégone, qui a pour particularité d'effectuer une migration quotidienne vers la zone littorale à la tombée de la nuit où il vient se reproduire, pour repartir ensuite vers des zones plus profondes au cours de la nuit ou au matin. Un suivi ADNe a été réalisé pendant l'hiver 2021/2022 avec des prélèvements réalisés toutes les 4h pendant 24h à partir de 7h et jusqu'à 7h le lendemain. Ces suivis nycthémeraux ont été fait à trois dates, le 15 décembre et le 21 décembre qui se trouvent pendant la phase très active de la reproduction, et le 13 janvier qui est une date située en fin de période. Les données ADNe ont été comparées aux données obtenues à l'aide d'une caméra acoustique.

Il existe globalement une bonne concordance entre les données de la caméra et les données ADNe, qu'elles ciblent le génome mitochondrial ou nucléaire. **Les données ADNe et de la caméra confirment les résultats attendus, avec une augmentation de l'activité de reproduction après la tombée de la nuit (à partir du prélèvement de 19h) pour les trois dates, tandis que la journée, l'activité de reproduction est beaucoup plus faible (prélèvements de 11h et de 15h).** Pour le prélèvement de 7h du matin les tendances varient, suggérant une activité non systématique le matin, mais la concordance entre les signaux ADNe et les observations est toujours présente. On peut tout de même noter une différence, avec un pic plus précoce de 4h avec l'ADNe mitochondrial et nucléaire par rapport aux observations faites le 21 décembre 2021 (pic à 23h alors qu'avec les observations à 3h). En comparant les signaux mitochondriaux et nucléaires, on constate également quelques différences, comme une diminution peu prononcée la journée du 15 décembre avec l'ADNe nucléaire, alors que celle-ci est nette avec les observations à la caméra et avec l'ADNe mitochondrial. On peut émettre l'hypothèse que ce signal nucléaire persistant la journée pourrait être lié à la présence de spermatozoïdes issus de l'activité de reproduction du matin (signal très fort avec toutes les méthodes à 7h). On note également des intensités de signaux ADNe différentes, le signal nucléaire est systématiquement plus fort que le signal mitochondrial (entre 5 et 200 fois plus fort), et si le pic de signal ADNe mitochondrial est plus élevé le 15 décembre par rapport au 21 décembre (ratio de 7), c'est l'inverse pour le signal nucléaire qui est plus élevé le 21 décembre (ratio 3). On peut attribuer ces résultats à la présence des gamètes mâles uniquement mesurée avec l'ADN nucléaire, et suggérant que le relargage des spermatozoïdes, et donc une activité de reproduction plus importante le 21 décembre par rapport au 15 décembre, ce qui est cohérent avec les suivis ADNe et les comptages visuels qui suggère un maximum d'activité entre le 20 et le 27 décembre (Figure 21).

Ces suivis nycthémeraux nous ont donc permis de constater que malgré le fait que nous étudions un milieu lentique, la persistance du signal ADNe (à de fortes concentrations) est très limitée dans le temps, puisqu'entre deux prélèvements séparés de 4h nous avons observé une importante fluctuation du signal. Ces variations du signal ADNe étant cohérentes avec la présence ou l'absence d'individus, **l'ADNe semble pouvoir permettre un suivi quasiment en temps réel des mouvements des poissons, et ce même en lacs. Les cibles mitochondriales et nucléaires sont une fois encore complémentaires, puisque la cible mitochondriale quantifie très bien les poissons présents sur le site, tandis que la cible nucléaire nous renseigne sur l'intensité du relargage des gamètes mâles et éventuellement leur persistance dans le temps même une fois que les poissons ne sont plus sur site.**

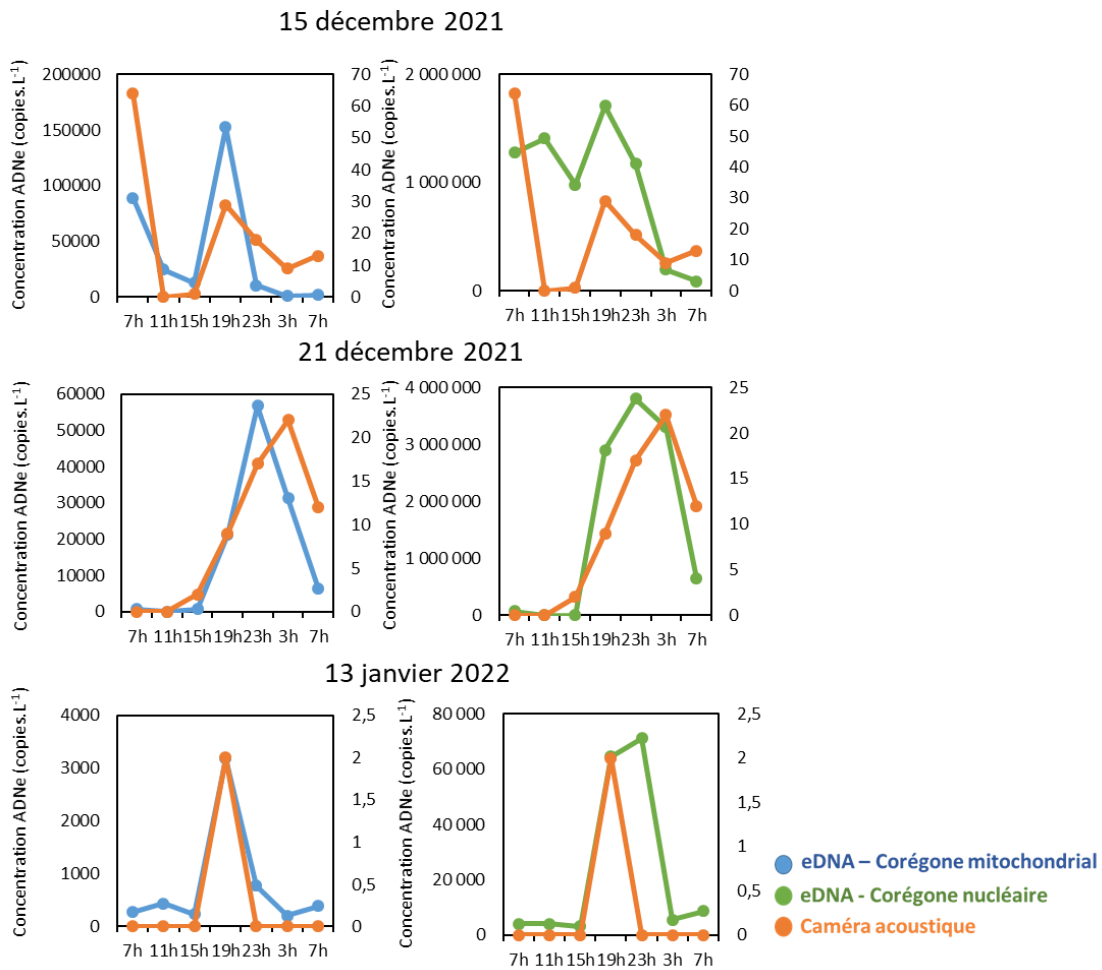


Figure 21 : Suivis nycthémeraux ADNe, ciblant les génomes mitochondriaux et nucléaires, comparés aux observations en caméra acoustique. Échantillonnages réalisés toutes les 4 h pendant 24 h et dans le cône d’observation de la caméra acoustique.

IV.5 Comparaisons méthodologiques

IV.5.1 ddPCR vs metabarcoding

L’analyse de l’ADNe est souvent associée au metabarcoding, notamment quand elle est appliquée aux poissons, que ce soit pour réaliser des inventaires (ex: Civade et al., 2016) ou encore estimer la biomasse relative (ex: Takahara et al., 2012). Cependant, depuis quelques années la dPCR est une technologie de plus en plus mise en avant pour ses performances en termes de quantification du signal ADNe, avec des applications dans l’estimation de la biomasse et de l’abondance en poissons (ex: Doi, Uchii et al., 2015) ou le suivi de leur migration (ex: Thalinger et al., 2019). Pour le projet QuantiFish nous avons choisi la dPCR car l’objectif du projet est de développer des outils ADNe

quantitatifs, mais nous avons tout de même souhaiter comparer les données obtenues par dPCR à des données de séquençage. Les analyses metabarcoding ont été réalisées à l'aide des amorces MiFish ciblant l'ensemble des espèces de poissons, développées par Miya et al. (2015). Nous avons testé ces deux approches sur deux échantillons ADNe, un pendant la période de reproduction et un en dehors, et lors de deux suivis différents, celui du corégone (hiver 2021/2022) et celui du brochet (printemps 2022).

Pour les résultats metabarcoding du suivi corégone, on observe 8 fois plus de reads corégones pendant la période de production en comparaison de la période qui la précède, tout comme pour l'approche dPCR, mais dans ce cas le signal est 470 fois plus important pendant la reproduction. Cependant, lorsque l'on regarde le signal de la perche qui est l'espèce ADNe contrôle lors du suivi hivernal, on constate une fluctuation importante du signal ADNe avec l'approche metabarcoding, avec 85402 reads avant la reproduction et 1547 pendant (ratio de 55), tandis que pour l'approche dPCR le signal perche reste systématiquement beaucoup plus faible que le signal corégone et ses fluctuations sont très modérées (ratio de 1,4) (Figure 22 et tableau 5).

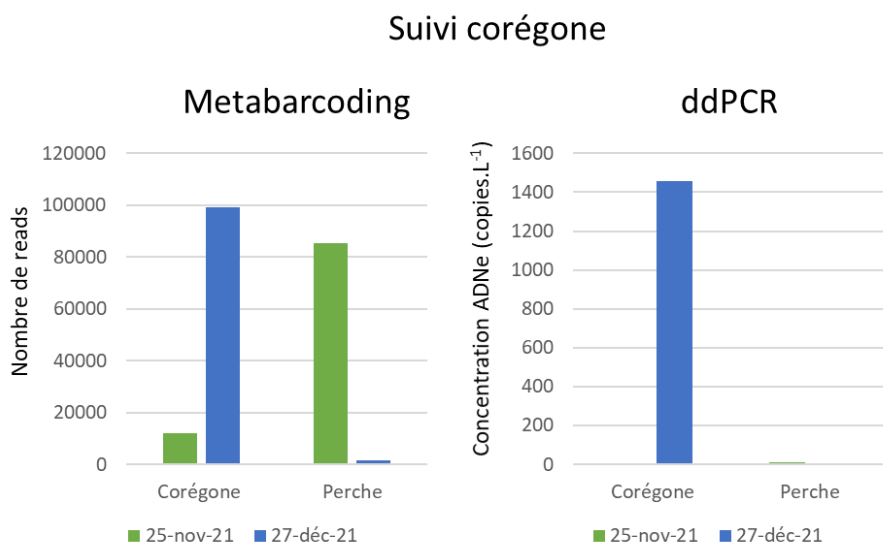


Figure 22 : Comparaison des approches metabarcoding et ddPCR au cours du suivi ADNe de la reproduction du corégone. La comparaison s'est faite sur deux dates, une avant la période de reproduction (25 novembre 2021) et une pendant la période de reproduction (27 décembre 2021), et en ciblant deux espèces, la perche et le corégone.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats metabarcoding et ddPCR obtenus au cours du suivi ADNe de la reproduction du corégone. La comparaison s'est faite sur deux dates, une avant la période de reproduction (25 novembre 2021) et une pendant la période de reproduction (27 décembre 2021), et en ciblant deux espèces, la perche et le corégone. La concentration en ADNe est exprimée en nombre de copies par litre d'eau filtrée.

	Avant la reproduction (25 novembre 2021)			Pendant la reproduction (27 décembre 2021)		
	Nombre de reads	% de reads	eDNA concentration	Nombre de reads	% de reads	eDNA concentration
Corégone	11871	9,5	3,1	99169	86,1	1456,0
Perche	85402	68,6	9,7	1547	1,3	7,2
Total	124530	100	-	115179	100	-

Dans le cas du suivi ADNe brochet, les profils obtenus avec les deux approches sont plus similaires avec un signal plus fort pour le brochet pendant sa période de reproduction, et des signaux plus faibles après celle-ci, et en tout temps pour l'espèce ADNe contrôle qui est le corégone. Les amplitudes diffèrent cependant, avec un signal 4,5 plus fort pendant la reproduction pour le metabarcoding, alors qu'il est 33 fois plus fort avec l'approche dPCR (Figure 23 et tableau 6).

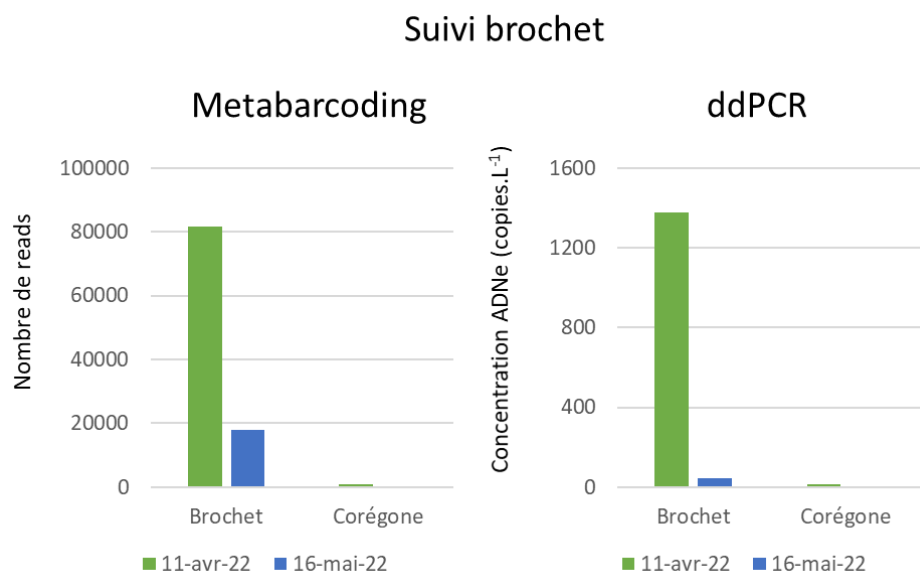


Figure 23 : Comparaison des approches metabarcoding et ddPCR au cours du suivi ADNe de la reproduction du brochet. La comparaison s'est faite sur deux dates, une pendant la période de reproduction (11 avril 2022) et une après la période de reproduction (16 mai 2022), et en ciblant deux espèces, le brochet et le corégone.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats metabarcoding et ddPCR obtenus au cours du suivi ADNe de la reproduction du brochet. La comparaison s'est faite sur deux dates, une pendant la période de reproduction (11 avril 2022) et une après la période de reproduction (16 mai 2022), et en ciblant deux espèces, le brochet et le corégone. La concentration en ADNe est exprimée en nombre de copies par litre d'eau filtrée.

	Pendant la reproduction (11 avril 2022)			Après la reproduction (16 mai 2022)		
	Nombre de reads	% de reads	eDNA concentration	Nombre de reads	% de reads	eDNA concentration
Brochet	81558	58,8	1375,3	17884	10,1	42,0
Corégone	724	0,5	11,6	0	0,0	0,0
Total	138646	100	-	176630	100	-

Ces comparaisons entre approche metabarcoding et approche dPCR nous permettent de confirmer que **l'approche dPCR semble la plus performante pour l'étude de la phénologie de la reproduction des poissons en lacs, avec une amplitude de signal plus importante et un signal basal (signal ADNe en absence de reproduction) qui est plus stable à comparer au metabarcoding.** On peut par ailleurs noter que la dPCR a aussi l'avantage d'être moins onéreuse

(environ 5,5€ par échantillon en dPCR et environ 25€ en metabarcoding dans notre cas) et moins longue et complexe en termes d'analyses. Cependant, ces résultats confirment ce qui avait été déjà observé dans d'autres analyses metabarcoding ciblant les poissons, soit le fait qu'il est possible d'identifier les périodes de reproduction de poissons via des approches metabarcoding (ex: Di Muri et al., 2022).

IV.5.2 Filtres ouverts vs filtres encapsulés

Dans le projet QuantiFish nous avons fait le choix d'utiliser des filtres encapsulés (Sterivex) afin de limiter les risques de contaminations qui sont augmentés lors de la manipulation des filtres ouverts. Lors du suivi 2021/2022 nous avons tout de même comparé ces deux approches, en filtrant le même volume d'eau sur filtre simple (acétate cellulose 0,45µm) et sur filtre encapsulé (Sterivex 0,45µm), et en réalisant par la suite les analyses de façon identique.

En comparant les concentrations ADN obtenues à partir des échantillons issus des différents filtres on constate des différences importantes, avec des concentrations plus importantes avec les filtres ouverts par rapport aux filtres encapsulés (moyenne de 179,1 ng/µL et 25,9 ng/µL respectivement). La concentration en ADN est entre 2 et 13 fois plus importante avec les filtres ouverts par rapport aux filtres encapsulés (Figure 24). Ces différences peuvent être expliquées par le fait que le filtre encapsulé reste dans sa capsule et que seul le lysat est récupéré, tandis que pour les filtres ouverts, l'extraction se fait directement à partir du filtre.

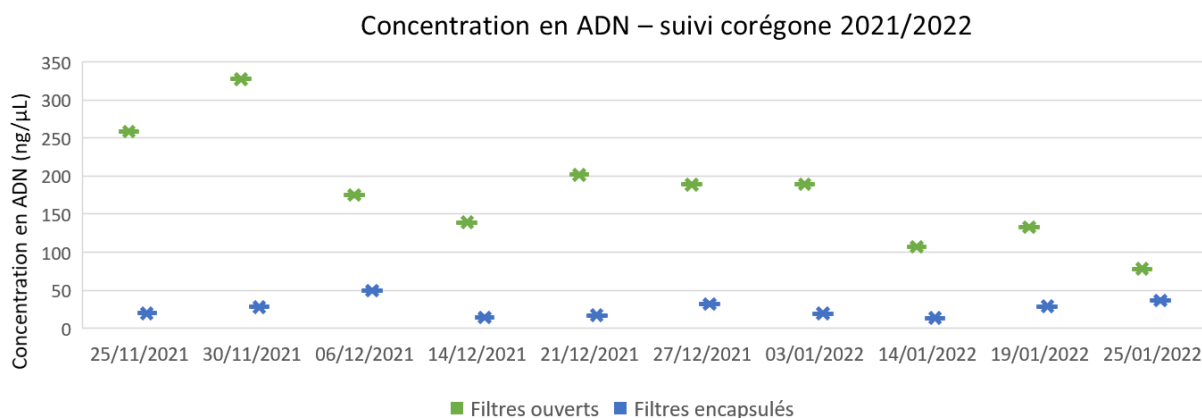


Figure 24 : Comparaison des concentrations en ADN obtenues après l'utilisation de filtres ouverts et de filtres encapsulés pour la filtration de l'eau lors du suivi ADNe de la reproduction du corégone effectué au cours de l'hiver 2021/2022.

Lorsque l'on regarde les concentrations en ADNe, le signal issu des filtres ouverts est lui aussi plus important par rapport aux filtres encapsulés, mais les différences sont moins marquées, avec des ratios allant de 1 à 2,8. De plus, pour les valeurs de début et de fin de suivis qui sont les plus faibles, l'efficacité des deux méthodes de filtration est similaire. Dans les deux cas, les profils ADNe générés sont similaires, avec les mêmes débuts et fin de période de reproduction, mais un pic plus tardif d'une semaine avec les filtres encapsulés (Figure 25). Les filtres ouverts semblent donc un peu moins efficaces pour les signaux abondants, mais tout aussi efficaces pour les signaux rares.

Suivi corégone Hiver 2021/2022

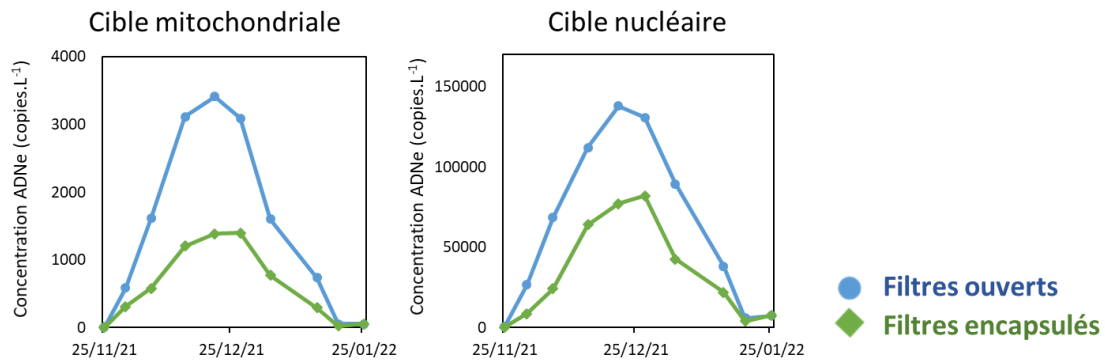


Figure 25 : Comparaison du signal ADNe obtenu après l'utilisation de filtres ouverts et de filtres encapsulés pour la filtration de l'eau lors du suivi ADNe de la reproduction du corégone effectué au cours de l'hiver 2021/2022. Les génomes nucléaires et mitochondriaux ciblés sont ceux du corégone.

L'utilisation de filtres ouverts ou encapsulés a permis dans les deux cas de caractériser de façon quasiment identique la période de reproduction du corégone. Les filtres ouverts montrent cependant une meilleure efficacité au niveau du rendement d'extraction d'ADN, ainsi que pour les signaux ADNe abondants, mais les signaux rares sont aussi bien mesurés avec les deux approches. **Les deux types de filtres sont donc efficaces et peuvent être utilisés, avec l'avantage d'un meilleur rendement ADN pour les filtres ouverts, et celui d'une meilleure prévention contre les contaminations pour les filtres encapsulés.**

V






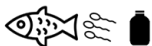



Conclusions et perspectives



V. Conclusions et perspectives

Le projet QuantiFish nous a permis d'explorer les possibilités qu'offrent l'ADNe pour le suivi de la phénologie des poissons en lacs, mais également ses limites, et les précautions qui doivent être prises pour maximiser les chances de capter de signal de reproduction, ainsi que pour s'assurer de générer des données fiables et robustes (Tableau 7).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des recommandations proposées par le projet QuantiFish pour mettre en place un suivi ADNe de la phénologie de la reproduction de poissons en lacs.

	Recommandations	Avantages
	Utiliser la PCR digitale pour quantifier l'ADNe	Méthode quantitative, efficace pour les signaux faibles et peu sensible aux inhibiteurs
	Tester la spécificité et la sensibilité des amorces	Eviter les faux positifs et permettre des mesures comparables
	Cibler les génomes mitochondriaux et nucléaires	Distinguer le signal lié au relargage des spermatozoïdes de celui lié au regroupement des poissons
	Utiliser une espèce ADNe contrôle	S'assurer que les fluctuations mesurées n'affectent pas l'ensemble du signal ADNe poisson
	Stratégie d'échantillonnage intégrée localement sur la zone de reproduction (si connue)	Lisser la variabilité spatiale du signal ADNe
	Echantillonnage au plus proche du site de frai	Eviter de manquer le signal lié à la reproduction
	Echantillonner au moment de la journée où l'activité de frai est la plus importante	Eviter de manquer le signal lié à la reproduction
	Réaliser un suivi ADNe au moins hebdomadaire	Eviter de manquer le signal lié à la reproduction
	Réaliser un suivi ADNe assez long pour caractériser le signal basal de l'espèce étudiée	Bien distinguer le signal basal du signal lié à la reproduction

Sur un plan méthodologique, nous avons tout d'abord mis en avant l'intérêt crucial d'effectuer des tests *in silico* de spécificité au cours du processus de création de nouvelles amorces destinées à des usages en ADNe (ou pour valider l'utilisation d'amorces existantes mais nouvellement appliquées dans nos milieux d'intérêt). La robustesse de ces tests dépend de la complétude des bases de données, et nous avons constaté que pour l'étude des poissons certaines de ces bases sont quasiment

inexistantes, comme pour le gène nucléaire ITS1 qui semble pourtant très pertinent pour le suivi ADNe de la reproduction des espèces de poissons.

Les tests *in vitro* de spécificité sont également indispensables et doivent être fait vis-à-vis du plus grand nombre de génomes différents possibles et surtout les plus proches phylogénétiquement. Nous avons vu avec le cas des amorces ciblant le génome mitochondrial de la perche qu'elles ciblaient également plusieurs autres percidés alors que ces spécificités n'avaient pas pu être détectées lors des tests PCR *in silico*. Dans notre cas nous avons utilisé « uniquement » 17 espèces sur la trentaine identifiées dans le Léman et idéalement il faudrait toutes pouvoir les tester individuellement pour valider les amorces de la façon la plus robuste possible.

L'utilisation de la dPCR s'est révélée tout à fait adaptée au suivi de la phénologie de la reproduction des poissons en lacs, et nous recommandons son utilisation pour obtenir un signal quantitatif, répétable et permettant de discriminer de faibles variations. Bien que la dPCR soit connue pour fournir des mesures précises sans avoir besoin de calibration (White et al., 2009), les tests de sensibilité (calcul de la LOD et de la LOQ) (Huggett et al., 2013), ainsi que les tests de spécificité supplémentaires que nous avons effectués, permettent de s'assurer que les mesures effectuées en dPCR sont robustes et comparables, et que la présence d'ADN d'autres espèces, comme c'est le cas dans des échantillons, n'altère pas cette efficacité; nous recommandons de les effectuer pour toutes amorces devant servir à des analyses ADNe via l'utilisation de la dPCR. Nous avons par ailleurs illustré, via quelques échantillons sélectionnés, que l'utilisation de méthodes metabarcoding semble moins adaptée au suivi de la reproduction de poissons, et ce, notamment par son aspect semi-quantitatif, et non quantitatif comme la dPCR.

Le travail mené ici a conduit à la formalisation de protocoles (prélèvement, extraction) mis en "open access" et ré-applicables. Concernant les types de filtres utilisés pour la concentration de l'ADNe à partir de l'eau, les filtres ouverts ou encapsulés peuvent être utilisés pour les suivis de la phénologie de la reproduction des poissons via l'ADNe, avec l'avantage d'un meilleur rendement (concentration en ADNe) pour les filtres ouverts, et celui d'une meilleure prévention contre les contaminations pour les filtres encapsulés.

La mise en application de ces protocoles, a permis de vérifier que pour toutes les espèces étudiées, la dynamique temporelle des signaux ADNe sont concordants avec ceux des suivis traditionnels, que ce soit des captures ou des observations d'individus ou bien la collecte d'œufs fécondés. Le fait de pouvoir prendre en considération différentes espèces, avec des caractéristiques différentes de frai (migration ou non), a permis de confirmer que les pics de concentrations en ADNe sont expliqués à la fois par le regroupement des individus sur site, leur état d'activité et le relargage des gamètes. Ceci est vrai en particulier dans le cas de la perche et du brochet qui restent sur site après la période de reproduction.

Nos résultats mettent également en évidence l'atout représenté par les approches ADNe pour mettre en place une surveillance de l'activité de reproduction dans des cas difficiles tel que celui de l'omble chevalier (reproduction en zone profonde compliquée à suivre par des méthodes traditionnelles)

ou dans une approche exploratoire pour rechercher des sites potentiels de frai (par exemple cas du Brochet pour lequel une activité de reproduction a pu être détectée dans plusieurs zones du Léman).

Pour tous les suivis ADNe réalisés, nous avons quantifié le signal ADNe d'une espèce qui ne se reproduit pas et que nous avons appelé une espèce ADNe contrôle. Le signal ADNe de cette espèce reste systématiquement à un niveau faible, que l'on pourrait appeler basal, avec peu ou pas de fluctuations dans le temps, tandis que, pour les espèces en cours de reproduction, nous observons un pic unique et majeur s'étalant sur plusieurs semaines. L'utilisation d'une espèce ADNe contrôle permet de s'assurer que les fluctuations du signal ADNe observées lors des suivis sont bien spécifiques à la reproduction, et qu'il ne s'agit pas de fluctuations qui affectent l'ensemble du signal ADNe poisson (par exemple des conditions environnementales particulières qui influencent l'ensemble du signal ADNe et induisent des pics de concentration artefactuels pour toutes les espèces présentes dans le lac). L'utilisation d'une espèce ADNe contrôle doit toujours s'accompagner d'un suivi de la reproduction assez long pour permettre de couvrir le début et la fin de la reproduction sur plusieurs dates et donc de bien caractériser le signal basal de l'espèce et de le distinguer du 'signal de reproduction'. Dans notre cas, nous avons commencé les suivis quelques semaines avant la période de reproduction supposée et nous les avons terminés trois semaines après la dernière observation, collecte ou capture selon la méthode traditionnelle utilisée.

Au cours de ce projet nous avons également exploré l'utilisation du génome nucléaire en complément du génome mitochondrial qui a l'inconvénient de mal refléter le signal lié au relargage des spermatozoïdes. Le signal ADNe basal (hors période de reproduction) issu des génomes mitochondriaux et nucléaires est similaire, mais l'amplitude d'augmentation au cours de la reproduction est bien plus élevée pour le génome nucléaire, en faisant une cible à privilégier lors de suivis ADNe de la reproduction. Il est cependant intéressant de cibler le génome mitochondrial en parallèle car il informe sur la présence des individus à proximité du site de prélèvement, permettant ainsi de différencier la présence des individus, du relargage des gamètes mâles, et donc de la reproduction réelle. En ciblant les deux génomes et en comparant les profils, on peut également attester de la présence d'une activité de frai. Schématiquement, si l'on a à la fois la présence d'individus sur site et un relargage de gamètes, on s'attend à ce que les deux profils (mitochondriaux et nucléaires) suivent la même tendance. Tandis que, dans le cas où les individus sont présents mais pas en activité de reproduction, ou, dans le cas où des gamètes sont entraînés dans l'eau sans que les individus soient présents exactement sur le site d'échantillonnage, alors, les deux signaux seront découplés. Les cibles mitochondriales et nucléaires sont donc complémentaires, l'une quantifiant très bien les poissons présents sur le site, l'autre renseignant sur l'intensité du relargage des gamètes mâles et éventuellement leur persistance dans le temps même une fois que les poissons ne sont plus sur site.

Au cours de ces travaux nous avons également exploré la variabilité spatiale et temporelle des signaux ADNe à un échelle assez locale (sites de reproduction). Durant l'activité de frai des poissons, alors que d'énormes quantités d'ADNe sont libérées, nous avons constaté que le signal n'est pas uniformément distribué sur toute la zone de frai. Il existe donc un risque de sous-estimer ou de surestimer le signal de frai via l'ADNe en raison de la variabilité spatiale horizontale du signal ADNe, et

en particulier si la stratégie d'échantillonnage est basée sur un seul échantillon discret. Nous recommandons donc d'utiliser l'approche d'échantillonnage intégrée pour suivre l'ADNe libéré pendant le frai des poissons. On peut noter que lors de nos études, l'échantillonnage intégré a permis d'augmenter l'intensité du signal ADNe mesuré pour les poissons étudiés. En plus de cette variabilité spatiale horizontale du signal ADNe, il faut prendre en compte la dispersion verticale du signal ADNe. Nous avons en effet constaté que l'activité de reproduction mesurée sur un site de frai se trouvant à 50 m de profondeur n'était pas détectable en surface avec nos protocoles, et que la dispersion verticale du signal ADNe est donc assez limitée. Ces observations confirment l'importance cruciale de prélever les échantillons d'eau au plus proche des sites de frai, et cela même sur un plan vertical. La persistance d'un signal ADNe fort (concentration élevée) sur le site de frai semble très limitée dans le temps, mais cohérente avec la présence ou l'absence d'individus, et l'ADNe semble donc pouvoir permettre un suivi quasiment en temps réel des mouvements des poissons, et ce même en lacs.

L'ensemble de ces résultats permettent de valider les approches formalisées pour de futurs déploiements dans d'autres lacs, avec néanmoins les ajustements inhérents à la spécificité des espèces et / ou des lacs. Si le niveau d'applicabilité de cette approche est déjà très bon, il n'en reste pas moins que des optimisations et perspectives peuvent toutefois être proposées pour consolider ce travail. La suite du projet QuantiFish explore d'autres possibilités qu'offrent les outils quantitatifs appliqués à l'ADNe. Il s'agit notamment de tester l'application de ces outils à des phénomènes complexes à caractériser via des méthodes traditionnelles, comme l'identification de la période d'éclosion des œufs ou encore la différenciation des mâles et des femelles, ou encore la capacité à suivre quasiment en temps réel des mouvements des poissons. Le projet vise également à explorer l'utilisation de l'ARNe pour le suivi de la reproduction des poissons en lacs. L'ARNe s'étant révélé être aussi sensible que l'ADNe, mais avec une meilleure corrélation avec l'abondance des poissons (Miyata et al. 2021). L'ARNe devrait donc permettre une meilleure estimation du nombre de poissons qui fraient ou de la quantité de gamètes libérés. Comme l'ARNe a une durée de vie plus courte que l'ADNe dans l'environnement (Marshall et al. 2021), l'utilisation du ratio ARNe/ADNe pourrait également être utilisée pour améliorer l'interprétation des détections de l'activité de frai. Les rapports ARNe/ADNe les plus élevés devraient révéler un signal fraîchement libéré dans l'environnement, réduisant ainsi l'erreur potentielle due à un signal ADN plus ancien.

Le projet QuantiFish a également mis en avant des lacunes qui pourraient permettre de consolider les approches ADNe quantitatives appliquées aux poissons en lacs, comme le développement de méthodes permettant l'intégration du signal ADNe dans le temps (capteurs, systèmes de concentration...), ou encore la création de bases de données ADN ciblant des portions de génomes pertinentes pour des approches quantitatives, mais jusqu'ici peu utilisées (comme le gène nucléaire ITS1 qui a montré une très grande efficacité pour le suivi de la reproduction des poissons en lacs), ainsi que des banques ADN avec toutes les espèces de poissons vivant dans les milieux lenticques français afin de tester des amorces ADNe qui pourraient alors être utilisées partout en France et permettre des analyses plus robustes et comparables.

VI

**Références
bibliographiques**



VI. Références bibliographiques

Allan, E. A., A. F. Govindarajan, W. G. Zhang & A. C. Lavery, 2020. Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>.

Anneville, O., Vogel, C., Lobry, J., & Guillard, J. (2017). Fish communities in the Anthropocene: detecting drivers of changes in the deep peri-alpine Lake Geneva. In *Inland Waters* (Vol. 7, Issue 1, pp. 65–76). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/20442041.2017.1294350>

Andruszkiewicz, E. A., Sassoubre, L. M., & Boehm, A. B. (2017). Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLoS One*, 12(9), e0185043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185043>

Antognazza, C. M., Britton, J. R., Potter, C., Franklin, E., Hardouin, E. A., Gutmann Roberts, C., Aprahamian, M., & Andreou, D. (2019). Environmental DNA as a non-invasive sampling tool to detect the spawning distribution of European anadromous shads (*Alosa* spp.). In *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* (Vol. 29, Issue 1, pp. 148–152). Wiley. <https://doi.org/10.1002/aqc.3010>

Bakker, J., Wangenstein, O. S., Chapman, D. D., Boussarie, G., Buddo, D., Guttridge, T. L., Hertler, H., Mouillot, D., Vigliola, L., & Mariani, S. (2017). Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact. *Scientific Reports*, 7(1), 16886. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17150-2>

Barnes, M. A. & C. R. Turner, 2016. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics* 17: 1–17.

Barnes, M. A., C. R. Turner, C. L. Jerde, M. A. Renshaw, W. L. Chadderton & D. M. Lodge, 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science and Technology* 48: 1819–1827.

Beng, K. C. & R. T. Corlett, 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation* 29: 2089–2121.

Bessey, C., Jarman, S. N., Berry, O., Olsen, Y. S., Bunce, M., Simpson, T., Power, M., McLaughlin, J., Edgar, G. J., & Keesing, J. (2020). Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 2(4), 493–504. <https://doi.org/10.1002/edn3.74>

Bessey, C., Keesing, J. K., McLaughlin, J., Rees, M., Tonks, M., Kendrick, G. A., & Olsen, Y. S. (2020). Teleost community composition and the role of herbivory on the intertidal reef of a small isolated island in north-west Australia. In *Marine and Freshwater Research* (Vol. 71, Issue 6, p. 684). CSIRO Publishing. <https://doi.org/10.1071/mf19066>

Birk, S., W. Bonne, A. Borja, S. Brucet, A. Courrat, S. Poikane, A. Solimini, W. Van De Bund, N. Zampoukas & D. Hering, 2012. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators* 18: 31–41.

Bohan, D. A., C. Vacher, A. Tamaddon-Nezhad, A. Raybould, A. J. Dumbrell, & G. Woodward, 2017. Next-generation global biomonitoring: large-scale, automated reconstruction of ecological networks. *Trends in Ecology & Evolution* 32: 477–487

Brys, R., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Mauvisseau, Q., Auwerx, J., Sweet, M., & Mergeay, J. (2020). Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). In

Journal of Fish Biology (Vol. 98, Issue 2, pp. 399–414). Wiley. <https://doi.org/10.1111/jfb.14315>

Bylemans, J., Furlan, E. M., Hardy, C. M., McGuffie, P., Lintermans, M., & Gleeson, D. M. (2017). An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: A case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 646–655.

Bylemans, J., Gleeson, D. M., Hardy, C. M., & Furlan, E. (2018). Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray-Darling Basin (Australia). *Ecology and Evolution*, 8(17), 8697–8712. <https://doi.org/10.1002/ece3.4387>

Casselman J.M., Lewis C.A., 1996. Habitat requirements of northern pike (*Esox lucius*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 161–174.

Caudron, A., Lasne, E., Gillet, C., Guillard, J., & Champigneulle, A. (2014). Thirty years of reoligotrophication do not contribute to restore self-sustaining fisheries of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, in Lake Geneva. In *Fisheries Research* (Vol. 154, pp. 165–171). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2014.01.023>

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. In C. Garcia de Leaniz (Ed.), *PLOS ONE* (Vol. 11, Issue 6, p. e0157366). Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157366>

Compson, Z. G., B. McClenaghan, G. A. C. Singer, N. A. Fahner & M. Hajibabaei, 2020. Metabarcoding from microbes to mammals: comprehensive bioassessment on a global scale. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8: 1–19.

Corbisier, P., Pinheiro, L., Mazoua, S., Kortekaas, A.-M., Chung, P. Y. J., Gerganova, T., Roebben, G., Emons, H., & Emslie, K. (2015). DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 407, Issue 7, pp. 1831–1840). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8458-z>

Cosson, J., Groison, A.L., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C. & Billard, R. (2008) Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction*, 136, 277–294.

Cristescu, M. E. & P. D. N. Hebert, 2018. Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49: 209–230.

Deiner, K. & F. Altermatt, 2014. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>.

Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender & L. Bernatchez, 2017. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26: 5872–5895.

Deprez, L., Corbisier, P., Kortekaas, A.-M., Mazoua, S., Beaz Hidalgo, R., Trapmann, S., & Emons, H. (2016). Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material. In *Biomolecular Detection and Quantification* (Vol. 9, pp. 29–39). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.08.002>

de Souza, L.S., Godwin, J.C., Renshaw, M.A., Larson, E., 2016. Environmental DNA (eDNA) detection probability is influenced by seasonal activity of organisms. *PLoS ONE* 11, e0165273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165273>

Di Muri, C., Lawson Handley, L., Bean, C. W., Benucci, M., Harper, L. R., James, B., Li, J., Winfield, I. J., & Hänfling, B. (2022). Spatio-temporal monitoring of lake fish spawning activity using environmental DNA metabarcoding. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/2022.02.07.478003>

Doi, H., T. Takahara, T. Minamoto, S. Matsushashi, K. Uchii & H. Yamanaka, 2015. Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA

from an invasive fish species. *Environmental Science and Technology* 49: 5601–5608.

Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. In A. R. Mahon (Ed.), *PLOS ONE* (Vol. 10, Issue 3, p. e0122763). Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122763>

Dudgeon, D., A. H. Arthington, M. O. Gessner, Z. I. Kawabata, D. J. Knowler, C. Lévêque, R. J. Naiman, A. H. Prieur-Richard, D. Soto, M. L. J. Stiassny & C. A. Sullivan, 2006. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 81: 163–182.

Eichmiller, J. J., Bajer, P. G., & Sorensen, P. W. (2014). The Relationship between the Distribution of Common Carp and Their Environmental DNA in a Small Lake. In A. C. Anil (Ed.), *PLoS ONE* (Vol. 9, Issue 11, p. e112611). Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112611>

Eichmiller, J. J., S. E. Best & P. W. Sorensen, 2016. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental Science and Technology* 50: 1859–1867.

Fritts, A. K., Knights, B. C., Larson, J. H., Amberg, J. J., Merkes, C. M., Tajjioui, T., Butler, S. E., Diana, M. J., Wahl, D. H., Weber, M. J., & Waters, J. D. (2018). Development of a quantitative PCR method for screening ichthyoplankton samples for bigheaded carps. In *Biological Invasions* (Vol. 21, Issue 4, pp. 1143–1153). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1887-9>

Ghosal, Ratna, Jessica J. Eichmiller, Bruce A. Witthuhn, et Peter W. Sorensen. 2018. « Attracting Common Carp to a Bait Site with Food Reveals Strong Positive Relationships between Fish Density, Feeding Activity, Environmental DNA, and Sex Pheromone Release That Could Be Used in Invasive Fish Management ». *Ecology and Evolution* 8 (13): 6714-27. <https://doi.org/10.1002/ece3.4169>.

Giguët-Covex, C., G. F. Ficetola, K. Walsh, J. Poulenard, M. Bajard, L. Fouinat, P. Sabatier, L. Gielly, E. Messenger, A. L. Develle, F. David, P. Taberlet, E. Brisset, F. Guiter, R. Sinet & F. Arnaud, 2019. New insights on lake sediment DNA from the catchment: importance of taphonomic and analytical issues on the record quality. *Scientific Reports* 9: 14676

Gillet, C., & Dubois, J. P. (1995). A survey of the spawning of perch (*Perca fluviatilis*), pike (*Esox lucius*), and roach (*Rutilus rutilus*), using artificial spawning substrates in lakes. In *Hydrobiologia* (Vols. 300–301, Issue 1, pp. 409–415). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/bf00024482>

Gillet, C., & Dubois, J. P. (2007). Effect of water temperature and size of females on the timing of spawning of perch *Perca fluviatilis* L. in Lake Geneva from 1984 to 2003. In *Journal of Fish Biology* (Vol. 70, Issue 4, pp. 1001–1014). Wiley. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01359.x>

Gillet, C., Lang, C., & Dubois, J. P. (2013). Fluctuations of perch populations in Lake Geneva from 1984 to 2011 estimated from the number and size of egg strands collected in two locations exposed to different fishing practices. In *Fisheries Management and Ecology* (Vol. 20, Issue 6, pp. 484–493). Wiley. <https://doi.org/10.1111/fme.12037>

Gingera, T. D., Steeves, T. B., Boguski, D. A., Whyard, S., Li, W., & Docker, M. F. (2016). Detection and identification of lampreys in Great Lakes streams using environmental DNA. In *Journal of Great Lakes Research* (Vol. 42, Issue 3, pp. 649–659). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.017>

Goldberg, C. S., C. R. Turner, K. Deiner, K. E. Klymus, P. F. Thomsen, M. A. Murphy, S. F. Spear, A. McKee, S. J. Oyler-McCance, R. S. Cornman, M. B. Laramie, A. R. Mahon, R. F. Lance, D. S. Pilliod, K. M. Strickler, L. P. Waits, A. K. Fremier, T. Takahara, J. E. Herder & P. Taberlet, 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* 7: 1299–1307.

Goulon, C., Vautier, M., Rautureau, C., Domaizon, I., & Guillard, J. (2022) Whitefish (*Coregonus lavaretus*) and perch (*Perca fluviatilis*) spawning in Lake Geneva. *Rapp. Comm. int. prot. eaux Léman contre pollut.*, Campagne 2021, 111- 125, ISSSN 1010 – 8432, Ed CIPEL 244pp.

Hänfling, B., Lawson Handley, L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., Oliver, A., & Winfield, I. J. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 25(13), 3101–3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660>

Harper, L. R., A. S. Buxton, H. C. Rees, K. Bruce, R. Brys, D. Halfmaerten, D. S. Read, H. V. Watson, C. D. Sayer, E. P. Jones, V. Priestley, E. Mächler, C. Múrria, S. Garcés-Pastor, C. Medupin, K. Burgess, G. Benson, N. Boonham, R. A. Griffiths, L. Lawson Handley & B. Hänfling, 2019. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia* 826: 25–41.

Hindson, B. J., K. D. Ness, D. A. Masquelier, P. Belgrader, N. J. Heredia, A. J. Makarewicz, I. J. Bright, M. Y. Lucero, A. L. Hiddessen, T. C. Legler, T. K. Kitano, M. R. Hodel, J. F. Petersen, P. W. Wyatt, E. R. Steenblock, P. H. Shah, L. J. Bousse, C. B. Troup, J. C. Mellen, D. K. Wittmann, N. G. Erndt, T. H. Cauley, R. T. Koehler, A. P. So, S. Dube, K. A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D. P. Stumbo, S. P. Hodges, S. Romine, F. P. Milanovich, H. E. White, J. F. Regan, G. A. Karlin-Neumann, C. M. Hindson, S. Saxonov, & B. W. Colston, 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry American Chemical Society* 83: 8604–8610.

Hoshino, T., & Inagaki, F. (2012). Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. In *Systematic and Applied Microbiology* (Vol. 35, Issue 6, pp. 390–395). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.06.006>

Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., Hellemans, J., Kubista, M., Mueller, R. D., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T., & Bustin, S. A. (2013). The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. In *Clinical Chemistry* (Vol. 59, Issue 6, pp. 892–902). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375>

Hulley, E. N., Tharmalingam, S., Zarnke, A., & Boreham, D. R. (2019). Development and validation of probe-based multiplex real-time PCR assays for the rapid and accurate detection of freshwater fish species. In R. Kalendar (Ed.), *PLOS ONE* (Vol. 14, Issue 1, p. e0210165). Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210165>

Hunter, M. E., R. M. Dorazio, J. S. S. Butterfield, G. Meigs-Friend, L. G. Nico & J. A. Ferrante, 2017. Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence–absence surveys of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* 17: 221–229.

Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, T. P., Sado, T., Mabuchi, K., Takeshima, H., Miya, M., & Nishida, M. (2013). MitoFish and MitoAnnotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2531–2540. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst141>

Jane, S. F., T. M. Wilcox, K. S. Mckelvey, M. K. Young, M. K. Schwartz, W. H. Lowe, B. H. Letcher & A. R. Whiteley, 2015. Distance, flow and PCR inhibition: EDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources* 15: 216–227.

Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019). Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution*, 9(3), 1135–1146. <https://doi.org/10.1002/ece3.4802>

Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., & Crowder, L. B. (2014). Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS One*, 9(1), e86175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086175>

Kiselinova, M., Pasternak, A. O., De Spiegelare, W., Vogelaers, D., Berkhout, B., & Vandekerckhove, L. (2014). Comparison of Droplet Digital PCR and Seminested Real-Time PCR for Quantification of Cell-Associated HIV-1 RNA. In P. R. Harrigan (Ed.), *PLoS ONE* (Vol. 9, Issue 1, p. e85999). Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085999>

Klobucar, S. L., Rodgers, T. W., & Budy, P. (2017). At the forefront: evidence of the applicability of using

environmental DNA to quantify the abundance of fish populations in natural lentic waters with additional sampling considerations. In *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* (Vol. 74, Issue 12, pp. 2030–2034). Canadian Science Publishing. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0114>

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. In *Molecular Biology and Evolution* (Vol. 33, Issue 7, pp. 1870–1874). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Lacoursière-Roussel, A., Côté, G., Leclerc, V. & Bernatchez, L. (2015) Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*, 53, 1148– 1157.

Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. (2016). Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 16(6), 1401–1414. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12522>

Lafferty, K. D., Garcia-Vedrenne, A. E., McLaughlin, J. P., Childress, J. N., Morse, M. F., & Jerde, C. L. (2020). At Palmyra Atoll, the fish-community environmental DNA signal changes across habitats but not with tides. *Journal of Fish Biology*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfb.14403>

Lawson Handley, L., Read, D. S., Winfield, I. J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., Hahn, C., Blackman, R., Wilcox, R., Donnelly, R., Szitenberg, A., & Hänfling, B. (2019). Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England's largest lake. In *Environmental DNA* (Vol. 1, Issue 1, pp. 26–39). Wiley. <https://doi.org/10.1002/edn3.5>

Leese, F., A. Bouchez, K. Abarenkov, F. Altermatt, Á. Borja, K. Bruce, T. Ekrem, F. Čiampor, Z. Čiamporová-Zaťovičová, F. O. Costa, S. Duarte, V. Elbrecht, D. Fontaneto, A. Franc, M. F. Geiger, D. Hering, M. Kahlert, B. Kalamujić Stroil, M. Kelly, E. Keskin, I. Liska, P. Mergen, K. Meissner, J. Pawlowski, L. Penev, Y. Reyjol, A. Rotter, D. Steinke, B. van der Wal, S. Vitecek, J. Zimmermann & A. M. Weigand, 2018. Why we need sustainable networks bridging countries, disciplines, cultures and generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: a perspective derived from the DNAqua-Net COST action. *Advances in Ecological Research* 58: 63–99.

Lefort, M.-C., Boyer, S., Barun, A., Emami Khoyi, A., Ridden, J., Smith, V. R., Sprague, R., Waterhouse, B. R., & Cruickshank, R. H. (2015). Blood, sweat and tears: non-invasive vs. non-disruptive DNA sampling for experimental biology. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.655v3>

Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J. T., & Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: Application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10, 34. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34>

Logan, J., J. M. J. Logan, K. J. Edwards, & N. A. Saunders, 2009. *Real-time PCR: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press, <https://books.google.at/books?id=YxGKpOg8TuQC>.

Lyons, J., Rypel, A. L., Rasmussen, P. W., Burzynski, T. E., Eggold, B. T., Myers, J. T., Paoli, T. J., & McIntyre, P. B. (2015). Trends in the Reproductive Phenology of two Great Lakes Fishes. In *Transactions of the American Fisheries Society* (Vol. 144, Issue 6, pp. 1263–1274). Wiley. <https://doi.org/10.1080/00028487.2015.1082502>.

Marshall, N. T., Vanderploeg, H. A., & Chaganti, S. R. (2021). Environmental (e)RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. In *Scientific Reports* (Vol. 11, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82205-4>

Maruyama, Atsushi, Keisuke Nakamura, Hiroki Yamanaka, Michio Kondoh, et Toshifumi Minamoto. 2014. « The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish ». Édité par Matthias Stöck. *PLoS ONE* 9 (12): e114639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114639>.

Miya, M., Gotoh, R. O., & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. In *Fisheries Science* (Vol. 86, Issue 6, pp. 939–970). Springer Science and Business Media LLC.

<https://doi.org/10.1007/s12562-020-01461-x>

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., & Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>

Miyata, K., Inoue, Y., Amano, Y., Nishioka, T., Yamane, M., Kawaguchi, T., Morita, O., & Honda, H. (2021). Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity. In *Ecological Indicators* (Vol. 128, p. 107796). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107796>

Murakami, H., Yoon, S., Kasai, A., Minamoto, T., Yamamoto, S., Sakata, M. K., Horiuchi, T., Sawada, H., Kondoh, M., Yamashita, Y., & Masuda, R. (2019). Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries Science*, 85(2), 327–337. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1282-6>

Nathan, L. M., Simmons, M., Wegleitner, B. J., Jerde, C. L., & Mahon, A. R. (2014). Quantifying Environmental DNA Signals for Aquatic Invasive Species Across Multiple Detection Platforms. In *Environmental Science & Technology* (Vol. 48, Issue 21, pp. 12800–12806). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/es5034052>

Nevers, M. B., Byappanahalli, M. N., Morris, C. C., Shively, D., Przybyla-Kelly, K., Spoljaric, A. M., Dickey, J., & Roseman, E. F. (2018). Environmental DNA (eDNA): A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). In H. Doi (Ed.), *PLOS ONE* (Vol. 13, Issue 1, p. e0191720). Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191720>

Nöges, T., Anneville, O., Guillard, J., Haberman, J., Järvalt, A., Manca, M., Morabito, G., Rogora, M., Thackeray, S. J., Volta, P., Winfield, I. J., & Nöges, P. (2017). Fisheries impacts on lake ecosystem structure in the context of a changing climate and trophic state. In *Journal of Limnology*. PAGEPress Publications. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1640>

O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., ... Pruitt, K. D. (2015). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 44, Issue D1, pp. D733–D745). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>

Pawlowski, J., L. Apothéoz-Perret-Gentil & F. Altermatt, 2020. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology* 29: 4258–4264.

Pawlowski, J., M. Kelly-Quinn, F. Altermatt, L. Apothéoz-Perret-Gentil, P. Beja, A. Boggero, A. Borja, A. Bouchez, T. Cordier, I. Domaizon, M. J. Feio, A. F. Filipe, R. Fornaroli, W. Graf, J. Herder, B. van der Hoorn, J. Iwan Jones, M. Sagova-Mareckova, C. Moritz, J. Barquín, J. J. Piggott, M. Pinna, F. Rimet, B. Rinkevich, C. Sousa-Santos, V. Specchia, R. Trobajo, V. Vasselon, S. Vitecek, J. Zimmerman, A. Weigand, F. Leese & M. Kahlert, 2018. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 637–638: 1295–1310.

Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2013). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. In *Molecular Ecology Resources* (Vol. 14, Issue 1, pp. 109–116). Wiley. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159>

Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S., & Emslie, K. R. (2011). Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. In *Analytical Chemistry* (Vol. 84, Issue 2, pp. 1003–1011). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/ac202578x>

Pont, D., M. Rocle, A. Valentini, R. Civade, P. Jean, A. Maire, N. Roset, M. Schabuss, H. Zornig & T. Dejean, 2018. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite

its downstream transportation. *Scientific Reports* 8: 1–13.

Puissauve R. & Poulet N. 2015. Fiches d'information sur les espèces aquatiques protégées : Brochet, *Esox lucius* Linnaeus, 1758. Service du patrimoine naturel du MNHN & Onema.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>

Rourke, M. L., Fowler, A. M., Hughes, J. M., Broadhurst, M. K., DiBattista, J. D., Fielder, S., Wilkes Walburn, J., & Furlan, E. M. (2021). Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. In *Environmental DNA* (Vol. 4, Issue 1, pp. 9–33). Wiley. <https://doi.org/10.1002/edn3.185>

Rubin, J. F. (2005). Evolution of the spawning grounds of the Arctic char in Lake Geneva from 1981 to 2005. *Arch.Sci.* 58: 201-230.

Ruppert, K. M., R. J. Kline & M. S. Rahman, 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17: 1–29.

Sales, N., O. Wangensteen, D. Carvalho, K. Deiner, K. Præbel, I. Coscia, A. D. Mcdevitt & S. Mariani, 2021. Space-time dynamics in monitoring neotropical fish communities using eDNA metabarcoding. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142096>.

Sanders, R., Huggett, J. F., Bushell, C. A., Cowen, S., Scott, D. J., & Foy, C. A. (2011). Evaluation of Digital PCR for Absolute DNA Quantification. In *Analytical Chemistry* (Vol. 83, Issue 17, pp. 6474–6484). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/ac103230c>

Sato, Y., Miya, M., Fukunaga, T., Sado, T., & Iwasaki, W. (2018). MitoFish and MiFish pipeline: A mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1553–1555. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy074>

Sato, H., Sogo, Y., Doi, H., & Yamanaka, H. (2017). Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities. In *Scientific Reports* (Vol. 7, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14978-6>

Sayers, E. W., Agarwala, R., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Clark, K., Connor, R., Fiorini, N., Funk, K., Hefferon, T., Holmes, J. B., Kim, S., Kimchi, A., Kitts, P. A., Lathrop, S., Lu, Z., Madden, T. L., Marchler-Bauer, A., Phan, L., ... Ostell, J. (2019). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D23–D28. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1069>

Seymour, M., I. Durance, B. J. Cosby, E. Ransom-Jones, K. Deiner, S. J. Ormerod, J. K. Colbourne, G. Wilgar, G. R. Carvalho, M. de Bruyn, F. Edwards, B. A. Emmett, H. M. Bik & S. Creer, 2018. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology* Springer, US 1: 1–8.

Shaw, J. L. A., L. Weyrich & A. Cooper, 2017. Using environmental (e)DNA sequencing for aquatic biodiversity surveys: a beginner's guide. *Marine and Freshwater Research* 68: 20–33.

Simpfendorfer, C. A., Kyne, P. M., Noble, T. H., Goldsbury, J., Basiita, R. K., Lindsay, R., Shields, A., Perry, C., & Jerry, D. R. (2016). Environmental DNA detects critically endangered largemouth sawfish in the wild. *Endangered Species Research*, 30, 109–116. <https://doi.org/10.3354/esr00731>

Starzynski, D., & Lauer, T. E. (2014). How temperature affects timing and duration of yellow perch spawning in the Indiana waters of Lake Michigan. In *Journal of Freshwater Ecology* (Vol. 30, Issue 3, pp. 445–453). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/02705060.2014.988761>

Stat, M., John, J., DiBattista, J. D., Newman, S. J., Bunce, M., & Harvey, E. S. (2019). Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity. *Conservation*

Biology, 33(1), 196–205. <https://doi.org/10.1111/cobi.13183>

Stewart, Kathryn A. 2019. « Understanding the Effects of Biotic and Abiotic Factors on Sources of Aquatic Environmental DNA ». *Biodiversity and Conservation* 28 (5): 983-1001. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01709-8>.

Stewart, T. R., Mäkinen, M., Goulon, C., Guillard, J., Marjomäki, T. J., Lasne, E., Karjalainen, J., & Stockwell, J. D. (2021). Influence of warming temperatures on coregonine embryogenesis within and among species. In *Hydrobiologia* (Vol. 848, Issue 18, pp. 4363–4385). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04648-0>

Stoeckle, B. C., Beggel, S., Cerwenka, A. F., Motivans, E., Kuehn, R., & Geist, J. (2017). A systematic approach to evaluate the influence of environmental conditions on eDNA detection success in aquatic ecosystems. *PLoS One*, 12(12), e0189119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189119>

Stoeckle, M. Y., Das Mishu, M., & Charlop-Powers, Z. (2020). Improved environmental DNA reference library detects overlooked marine fishes in New Jersey, United States. *Frontiers in Marine Science*, 7(226), <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00226>

Taberlet, P., E. Coissac, M. Hajibabaei, & L. H. Rieseberg, 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 1789–1793

Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. & Kawabata, Z. (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE*, 7, e35868.

Thalinger, B., Wolf, E., Traugott, M., & Wanzenböck, J. (2019). Monitoring spawning migrations of potamodromous fish species via eDNA. In *Scientific Reports* (Vol. 9, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51398-0>

Thomsen, P. F., Møller, P. R., Sigsgaard, E. E., Knudsen, S. W., Jørgensen, O. A., & Willerslev, E. (2016). Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS One*, 11(11), e0165252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165252>

Thomsen, P. F. & E. Willerslev, 2015. Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183: 4–18.

Tillotson, M. D., Kelly, R. P., Duda, J. J., Hoy, M., Kralj, J., & Quinn, T. P. (2018). Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. In *Biological Conservation* (Vol. 220, pp. 1–11). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.01.030>

Tsuji, Satsuki, Hiroaki Murakami, et Reiji Masuda. 2022. « Analysis of the Persistence and Particle Size Distributional Shift of Sperm-Derived Environmental DNA to Monitor Jack Mackerel Spawning Activity ». *Environmental Science & Technology* 56 (15): 10754-63. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01904>.

Tsuji, S., M. Ushio, S. Sakurai, T. Minamoto & H. Yamanaka, 2017. Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176608>.

Turner, C. R., K. L. Uy & R. C. Everhart, 2015. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation* 183: 93–102.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 40, Issue 15, pp. e115–e115). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

Vautier, M., Chardon, C., & Domaizon, I. (2020). Fish eDNA: DNA extraction from water samples filtered through Sterivex filter unit and preserved in buffer v1. ZappyLab, Inc. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bfk8jkzw>

Vautier, M., Chardon, C., & Domaizon, I. (2021). Fish eDNA: water sampling and filtration through Sterivex filter unit v1. ZappyLab, Inc. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.br5rm856>

Wangensteen, O. S., & Turon, X. (2017). Metabarcoding techniques for assessing biodiversity of marine animal forests. In S. Rossi, L. Bramanti, A. Gori, & C. Orejas (Eds.), *Marine animal forests: The ecology of benthic biodiversity hotspots* (pp. 445–473). Springer International Publishing.

White, R. A., III, Blainey, P. C., Fan, H. C., & Quake, S. R. (2009). Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. In *BMC Genomics* (Vol. 10, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-116>

Wilcox, T. M., K. S. McKelvey, M. K. Young, A. J. Sepulveda, B. B. Shepard, S. F. Jane, A. R. Whiteley, W. H. Lowe & M. K. Schwartz, 2016. Understanding environmental DNA detection probabilities: a case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation* 194: 209–216.

Wood, S. A., L. Biessy, J. L. Latchford, A. Zaiko, U. von Ammon, F. Audrezet, M. E. Cristescu & X. Pochon, 2020. Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.13531>.

Wood, SA, Pochon, X, Laroche, O, von Ammon, U, Adamson, J, Zaiko, A. A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and metabarcoding for species-specific detection in environmental DNA. *Mol Ecol Resour.* (2019); 19: 1407– 1419. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13055>

Wu, L., Wu, Q., Inagawa, T., Okitsu, J., Sakamoto, S., & Minamoto, T. (2023). Estimating the spawning activity of fish species using nuclear and mitochondrial environmental DNA concentrations and their ratios. *Freshwater Biology*, 68, 103– 114. <https://doi.org/10.1111/fwb.14012>

WWF, 2020. *Living Planet Report 2020 – bending the curve of biodiversity loss*. Gland, Switzerland.
Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., Minamoto, T., & Miya, M. (2017). Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports*, 7, 40368. <https://doi.org/10.1038/srep40368>

Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K. et al. (2016) Environmental DNA as a ‘Snapshot’ of fish distribution: a case study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, sea of Japan. *PLoS ONE*, 11, e0149786.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 31, Issue 13, pp. 3406–3415). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

