



apron

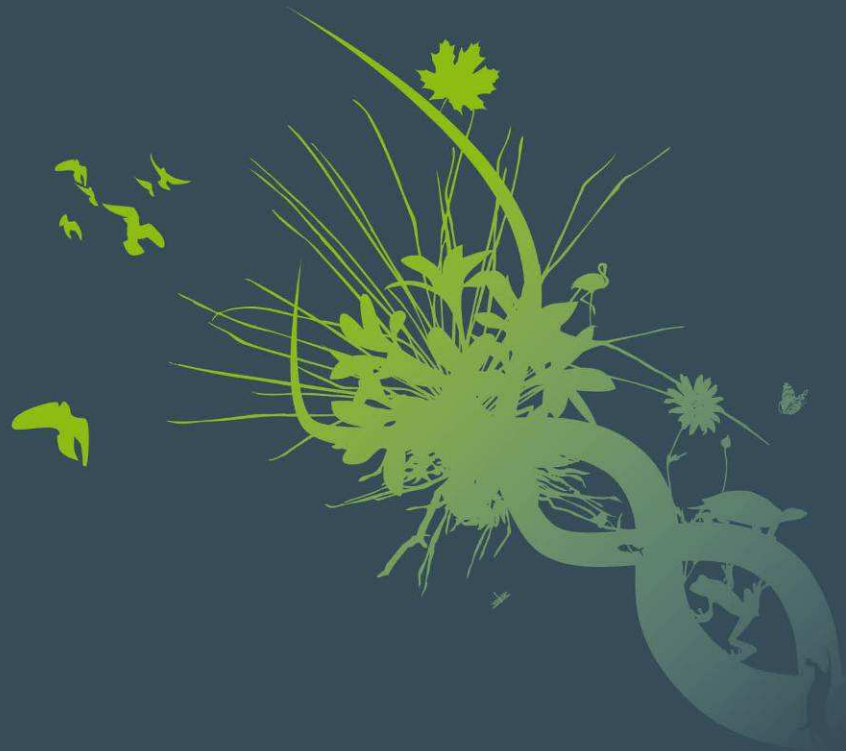
Plan national d'actions en faveur de l'apron du Rhône 2012-2016

Action 3: Etude de faisabilité pour la détection de l'apron du Rhône grâce à l'ADN environnemental

Rapport intermédiaire

SPYGEN, décembre 2012

SPYGEN[®]



**Etude de faisabilité pour la détection de l'Apron
(*Zingel asper*) grâce à l'ADN environnemental**

Rapport intermédiaire - Décembre 2012



1°) Contexte de l'étude :

L'Apron est un poisson de la famille des percidés, endémique du bassin du Rhône, qui a vu ses populations gravement décliner au cours du XX^{ème} siècle. Un premier programme LIFE, piloté par Réserves Naturelles de France de 1998 à 2001, a permis d'acquérir les bases de connaissances de l'espèce indispensables pour définir une stratégie de conservation qui s'est conclue par la rédaction d'un guide de gestion de l'Apron du Rhône. Le second programme LIFE de préservation de l'Apron du Rhône et de ses habitats, porté par le Conservatoire Rhône-Alpes des Espaces Naturels (CREN) de 2004 à 2010 en partenariat avec l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA), a eu pour tâche de mettre en œuvre cette stratégie. Les connaissances, les savoir-faire techniques et les premiers résultats encourageants obtenus dans le cadre de ce programme sont le fruit d'un fort investissement des acteurs du territoire depuis plus de dix ans autour de l'Apron du Rhône. Toutefois, cette espèce emblématique du bassin du Rhône reste une espèce en danger critique d'extinction, en raison de son endémisme, mais aussi parce qu'elle témoigne de la qualité biologique et fonctionnelle de nos cours d'eau.

Ainsi, la responsabilité de la France dans sa conservation a conduit le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement à lancer en 2010 la rédaction d'un Plan National d'Actions (PNA) en faveur de l'Apron du Rhône, avec le soutien de la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Rhône-Alpes. La rédaction de ce plan a été confiée au Conservatoire Rhône-Alpes des Espaces Naturels. Au vu des enjeux et des causes de raréfaction de l'Apron du Rhône, le présent plan d'actions vise à poursuivre les efforts entrepris en passant par l'amélioration des connaissances sur l'espèce pour optimiser sa conservation et sa gestion ainsi que celle de ses habitats, communiquer pour davantage faire connaître ce poisson et pérenniser la dynamique de réseau.

Dans le cadre de ce Plan National d'Actions, le CREN Rhône-Alpes a sollicité le laboratoire SPYGEN pour mettre en place une étude de faisabilité pour la détection de l'Apron du Rhône grâce à l'ADN environnemental (ADNe). La première phase de ce projet vise à étudier la faisabilité de détection de l'Apron du Rhône par l'ADNe dans des conditions non limitantes (plusieurs individus dans un cours d'eau de petite taille). Cette première étape va permettre notamment de mieux appréhender la quantité d'ADN d'Apron du Rhône pouvant être détectée dans le milieu et d'identifier la meilleure période d'échantillonnage (jour vs nuit). La seconde phase de ce projet vise à étudier la détectabilité de l'Apron du Rhône dans un cours d'eau de plus grande taille (La Leysse / Savoie) avec 3 quantités différentes d'Apron placés dans le milieu (2, 10 et 20 individus). Dans ce rapport intermédiaire, nous présentons le protocole d'étude mis en place pour la phase 1 et les résultats obtenus.

2°) Protocole d'étude pour la Phase 1 :

Les expérimentations ont été menées sur le ruisseau du Bondat, affluent de l'Albanne, Savoie (Débit estimé : 0.3 m³/s). Une nasse, équipée de 5 tubes PVC servant de cache pour les Aprons (Figure 1), a été installée dans le cours d'eau le 31 Octobre 2012. Le 5 Novembre, 5 Aprons du Rhône provenant de l'Aquarium de Besançon ont été placés dans la nasse (Figure 2). Une station de pompage mobile, composée d'une pompe péristaltique (débit : 2 L /min), de tuyaux stériles (changés entre chaque série de pompage) et d'une capsule de filtration à usage unique (0.45 µm), a été installée le 7 Novembre sur le cours d'eau, à 50 mètres à l'aval de la nasse (Figure 3).



Figures 1, 2 & 3 : Dispositifs mis en place dans le cadre de la Phase 1 de l'étude (nasse et système de pompage)

Six pompages successifs ont été réalisés à l'aval de la nasse contenant les Aprons (3 pompages de nuit et 3 de jour) (Tableau I). Lors de chaque pompage, 100 litres d'eau ont été filtrés. Un pompage a également été réalisé à l'amont de la nasse (Témoignage négatif).

Tableau I : Informations relatives aux différents pompages réalisés dans le cadre de la Phase 1 de l'étude (date, heure, T°C)

	Date	Heure début pompage	Température air	Température eau	Commentaires
1	07/10/12	18 h	7 °C	10 °C	Aprons en dehors des tubes PVC
2	07/10/12	19 h 30	6 °C	10 °C	Aprons en dehors des tubes PVC
3	07/10/12	21 h	5 °C	10 °C	Aprons en dehors des tubes PVC
4	08/10/12	8 h	2 °C	10 °C	Aprons cachés dans les tubes PVC
5	08/10/12	9 h	4 °C	10 °C	Aprons cachés dans les tubes PVC
6	08/10/12	11 h	7 °C	10 °C	Aprons cachés dans les tubes PVC
Témoignage	08/10/12	10 h	7 °C	10 °C	-

Les extractions d'ADN ont été réalisées dans une salle dédiée à l'ADN rare ou dégradé. Des contrôles négatifs ont été analysés simultanément, à chaque étape du protocole, afin de contrôler la pureté des consommables utilisés et de détecter d'éventuelles contaminations croisées au cours de la manipulation. L'amplification de l'ADN, par PCR quantitative (qPCR), a été effectuée avec un couple d'amorces spécifiques pour l'Apron du Rhône (8 réplicats par échantillon). La spécificité de ces amorces a été validée préalablement à l'aide d'outils bio-informatiques et sur des tissus de différentes espèces de poissons.

3°) Résultats :

Les premières amplifications réalisées sur les 7 extraits d'ADN n'ont pas permis de détecter la présence de l'Apron du Rhône. Compte tenu des résultats obtenus dans le cadre de tests similaires (sur le même site avec un Esturgeon sibérien (*Acipenser baerii*)), une absence de détection de l'Apron était relativement surprenante. Des tests complémentaires ont donc été réalisés. Dans un premier temps, une quantité connue d'un gène de synthèse (spygene) a été mélangé avec les extraits ADN. Une PCR quantitative a ensuite été réalisée avec un couple d'amorces spécifique pour ce gène synthétique. La quantité d'ADN obtenue suite à cette étape d'amplification était dix fois inférieure à la quantité attendue. Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'une forte concentration en inhibiteurs de PCR dans les extraits ADN (tanins notamment). Des tests de dilution ont donc été effectués avec les 7 extraits ADN afin de déterminer la dilution optimale permettant de limiter l'effet des inhibiteurs, tout en évitant de trop diluer l'ADN. Suite à cette étape, les 7 extraits d'ADN ont été dilués 100 fois avant d'être à nouveau amplifiés. De l'ADN d'Apron du Rhône a été détecté dans l'ensemble des échantillons prélevés à l'aval de la cage (Tableau II).

Tableau II : Résultats obtenus lors de l'amplification des échantillons avec le couple d'amorces spécifique *Zingel Asper*

N° échantillon	Détection Apron du Rhône	Nombre de réplicas positifs	Quantité moyenne d'ADN en ng	Nombre moyen de molécules
1	Non	0/8	-	-
2	Non	0/8	-	-
3	Non	0/8	-	-
4	Non	0/8	-	-
5	Non	0/8	-	-
6	Non	0/8	-	-
7	Non	0/8	-	-
1 dilué 100X	Oui	8/8	4.42E-06	3,47E+04
2 dilué 100X	Oui	8/8	6.07E-06	4,77E+04
3 dilué 100X	Oui	8/8	1.28E-06	1,00E+04
4 dilué 100X	Oui	7/8	8.67E-07	6,81E+03
5 dilué 100X	Oui	4/8	5.38E-07	4,22E+03
6 dilué 100X	Oui	8/8	5.41E-07	4,25E+03
7 dilué 100 X	Non	0/8	-	-

La quantité d'ADN d'Apron du Rhône détectée dans les échantillons prélevés pendant la nuit est en moyenne 6 fois supérieure à celle des échantillons prélevés de jour (p -value = $9.45e-06$; Figure 4).

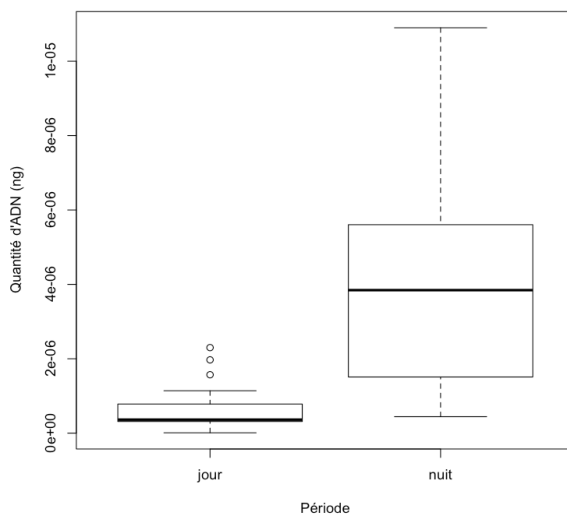


Figure 4 : Comparaison de la quantité d'ADN d'Apron du Rhône détectée en fonction de la période d'échantillonnage

4°) Discussion :

Afin d'optimiser la détection de cette espèce rare, une filtration de nuit semble nécessaire. De plus, pour limiter la présence d'inhibiteurs (liée notamment à la décomposition de la matière organique végétale) et la dilution de l'ADN dans le milieu, un prélèvement durant l'été serait optimal.

Le laboratoire SPYGEN, en partenariat avec l'ONEMA et l'IRSTEA d'Antony, développe actuellement des systèmes de capteurs passifs d'ADN. Ces capteurs, qui seront positionnés dans le milieu pendant plusieurs jours (environ 15 jours), pourraient permettre d'optimiser la détection de l'espèce sur les sites où elle est présente en très faible densité. Nous proposons de tester au cours du premier semestre 2013 ces capteurs passifs sur l'Apron du Rhône, dans des conditions similaires aux tests réalisés pendant la Phase 1, afin de sélectionner pour la Phase 2, le dispositif d'échantillonnage le mieux adapté pour la détection de cette espèce emblématique.



SPYGEN®

12, Allée du Lac de Garde
Bâtiment House Boat n°7
Savoie Technolac - BP274
73375 LE BOURGET-DU-LAC Cedex

Tél. / Fax : +33 (0)4 79 26 15 83
Email : contact@spygen.fr



Etude s'inscrivant dans le cadre du PNA Apron, animé par le



Et coordonné par la DREAL Rhône-Alpes



Partenaires financiers du PNA:

