



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 (Phase 5)**

SPYGEN, décembre 2016

SPYGEN[®]



RAPPORT D'ETUDE

Etude de faisabilité pour la détection de l'Apron du Rhône grâce à l'ADN environnemental (Phase 5)

Conservatoire d'espaces naturels Rhône-Alpes – Décembre 2016



1°) Introduction

L'Apron du Rhône (*Zingel asper*) 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. Au vu des enjeux et des causes de raréfaction de cette espèce, le Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement a mis en place en 2012 un Plan National d'Action (PNA) en faveur de l'Apron du Rhône. Ce PNA, porté par le Conservatoire d'Espaces Naturels Rhône-Alpes (CEN RA), a pour principal objectif d'améliorer les connaissances sur l'espèce (biologie, répartition, etc.) afin d'optimiser sa gestion ainsi que celle de ses habitats. En 2012, le CEN 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, réalisée en 2012, a consisté 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) et à identifier la meilleure période d'échantillonnage (jour vs nuit). Ces premières expérimentations ont permis de détecter l'Apron dans l'ensemble des échantillons prélevés et de mettre en évidence que la quantité d'ADN libérée par l'espèce dans le milieu est plus importante la nuit (cf. rapport phase 1).

La deuxième phase de l'étude, menée en 2013, a permis de tester la détectabilité de l'espèce dans un cours d'eau de plus grande taille (La Leysse / Savoie) avec des Aprons placés dans une nasse (5 individus puis 17 individus). Sur les 18 prélèvements effectués, à différentes distances de la nasse (8 m, 50 m & 200 m), l'espèce a été détectée dans seulement 3 échantillons. Il n'a cependant pas été possible de conclure si cette faible détectabilité était liée à une limite de la méthode (densité de l'espèce trop faible) ou aux conditions d'expérimentation peu favorables. En effet, lors de la réalisation des prélèvements, le débit de la Leysse était important (suite à une période pluvieuse), les Aprons du Rhône utilisés pour l'expérimentation étaient de petite taille (juvéniles de l'année – pas d'adultes disponibles) et ils n'ont pu être placés dans la Leysse que 24 h avant la réalisation des prélèvements d'eau (cf. rapport phase 2).

La troisième phase de l'étude, menée en 2014 sur des cours d'eau où l'espèce est naturellement présente, a permis de comparer la détectabilité de l'Apron du Rhône en fonction de la méthode d'analyse mise en oeuvre (Barcoding ADNe vs Metabarcoding ADNe), de la période de prélèvement (jour vs nuit) et de la stratégie d'échantillonnage (position par rapport à la tête de radier et profondeur). Sur les 24 échantillons analysés, l'espèce a été détectée dans 92 % des cas avec la méthode de Barcoding ADNe (recherche spécifique de l'Apron du Rhône) et dans 96 % des cas avec l'approche de Metabarcoding ADNe (recherche des espèces piscicoles présentes sur le site). De plus, contrairement aux tests réalisés au cours de la phase 1 de l'étude, la différence de détectabilité entre les prélèvements de jour et de nuit ne s'est pas révélée significative. Les prélèvements de jour ont cependant été réalisés entre 10h et 13h, ce qui ne permet pas de conclure sur la détectabilité de l'espèce à d'autres heures de la journée. Enfin, les tests sur la stratégie d'échantillonnage ont permis de montrer qu'il n'y a pas de différence significative de détectabilité de l'espèce entre des prélèvements effectués en tête de radier, à 20 mètres en aval de la tête de radier, à la surface de l'eau ou à mi-hauteur d'eau (cf. rapport phase 3).

La quatrième phase de l'étude, réalisée en 2015, a montré que la détectabilité de l'Apron du Rhône n'est pas dépendante de l'heure d'échantillonnage (pas de différence significative observée entre 8h et 18h). Elle a également permis de valider la performance de la méthode sur des sites où l'espèce est présente en faible densité, en montrant toutefois qu'il est préférable de réaliser plusieurs prélèvements par site pour optimiser la détection de l'espèce (cf. rapport phase 4).

Compte tenu de la performance de la méthode ADNe pour détecter des fortes et des faibles densités d'Apron du Rhône, l'objectif de l'année 2016 a été d'acquérir de nouvelles connaissances sur la répartition de cette espèce.

2°) Protocole d'étude

➤ Echantillonnage

Les échantillonnages ont été réalisés par du personnel de l'ONEMA (Délégations Interrégionales Bourgogne / Franche-Comté, Rhône-Alpes et Méditerranée) préalablement formé par SPYGEN. Les cours d'eau étudiés ont été choisis en fonction des connaissances sur les répartitions connues actuelles et passées de l'Apron du Rhône. Suite à des premiers résultats obtenus sur la distance de détection du signal ADNe en milieu aquatique courant (Civade *et al.* 2016), les sites ont été répartis tous les 2,5 km sur chaque cours d'eau. Les sites sont numérotés de l'aval (ex. DOU1) vers l'amont (ex. DOU4).

- Délégation Interrégionale Bourgogne / Franche-Comté

Trois cours d'eau ont été étudiés (le Doubs, la Loue et la Lanterne) pour un total de 12 sites échantillonnés (cf. Tableau I pour des informations plus précises sur les sites).

- Délégation Interrégionale Rhône-Alpes

Deux cours d'eau ont été étudiés (l'Ain et le Drac) pour un total de 10 sites échantillonnés (cf. Tableau II pour des informations plus précises sur les sites).

- Délégation Interrégionale Méditerranée

Trois cours d'eau ont été étudiés (la Cèze, le Gardon et le Verdon) pour un total de 12 sites échantillonnés (cf. Tableau III pour des informations plus précises sur les sites).

Sur chacun de ces sites, 2 filtrations d'eau successives de 30L ont été réalisées à l'aide d'une pompe péristaltique et d'une capsule de filtration stérile (porosité 0.45 µm). Cette stratégie d'échantillonnage a été adoptée d'après les tests réalisés en 2015. En effet, la détection de l'espèce était plus aléatoire lorsqu'elle était présente en faible densité (détection dans 2 échantillons sur 3 pour la station Chouzelot sur la Loue) et au moins deux échantillons étaient nécessaires pour optimiser la détection de l'Apron du Rhône.

Suite à des contraintes techniques, seule une filtration de 30 L a été réalisée sur les sites VERO et VER6.

➤ Analyses

Tous les échantillons ont été analysés selon la méthode de Barcoding ADNe pour une détection spécifique de l'Apron du Rhône. L'extraction de l'ADN a été réalisée dans une salle dédiée à l'ADN rare ou dégradé. L'amplification de l'ADN a été effectuée par PCR quantitative (qPCR) avec un couple d'amorces spécifique pour l'Apron du Rhône (12 réplicats par échantillon). Les résultats sont donnés sous la forme de présence/absence de l'espèce avec un nombre de réplicats positifs.

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.

3°) Résultats

➤ Délégation Interrégionale Bourgogne / Franche-Comté

Tableau I : Caractéristique des 12 sites échantillonnés en Bourgogne / Franche-Comté et résultats ADNe

Cours d'eau	Code station	X_LII	Y_LII	Localisation	Détection ADN Apron du Rhône	Nombre répliquats positifs			
Le Doubs	DOUam1	951830	2270887	Entre Glére et Bremoncourt	NON	0/12			
					NON	0/12			
	DOUam2	954033	2271044		NON	0/12			
					NON	0/12			
	DOU1	831168	2224332	Champdivers à Gevry	NON	0/12			
					NON	0/12			
					DOU2	833049	2228166	NON	0/12
								NON	0/12
					DOU3	834649	2227704	NON	0/12
								NON	0/12
DOU4	836804	2231041	NON		0/12				
			NON		0/12				
La Loue	LOU1	839914	2228691	Parcey	NON	0/12			
					NON	0/12			
	LOU4	877316	2236765	Châtillon sur Lison	NON	0/12			
					NON	0/12			
La Lanterne	LAN2	887237	2318815	Entre Bourgignon-les-Conflans et Briaucourt	NON	0/12			
					NON	0/12			
	LAN3	889303	2319785		NON	0/12			
					NON	0/12			
	LAN4	891110	2319588		NON	0/12			
					NON	0/12			
	LAN5	884480	2315870		NON	0/12			
					NON	0/12			

➤ Délégation Interrégionale Rhône-Alpes

Tableau II : Caractéristique des 10 sites échantillonnés en Rhône-Alpes et résultats ADNe

Cours d'eau	Code station	X_LII	Y_LII	Localisation	Détection ADN Apron du Rhône	Nombre réplicats positifs
L'Ain	Ain 0	824 753	2 105 042	Chazey sur Ain à Confluence	NON	0/12
	Ain 1	821 205	2 093 247		NON	0/12
	Ain 2	823 343	2 094 747		NON	0/12
	Ain 3	825 007	2 096 221		NON	0/12
	Ain 4	824 720	2 099 078		NON	0/12
	Ain 5	824 332	2 101 162		NON	0/12
	Ain 6	825 583	2 102 753		NON	0/12
					NON	0/12
					NON	0/12
					NON	0/12
Le Drac	Drac 1	866 534	2 015 017	Réserve naturelle Drac aval	NON	0/12
	Drac 2	866 270	2 013 679		NON	0/12
	Drac 3	865 842	2 011 761		NON	0/12
					NON	0/12
					NON	0/12

Tableau III : Caractéristique des 12 sites échantillonnés en Méditerranée et résultats ADN

Cours d'eau	Code station	X_LII	Y_LII	Localisation	Détection ADN Apron du Rhône	Nombre répliqués positifs
La Cèze	CEZ1	780395,46	1910664	Entre cascade du Sautadet et Bagnol sur Ceze	NON	0/12
					NON	0/12
	CEZ2	777655,59	1911335,25		NON	0/12
					NON	0/12
Le Gardon	GAR1	775232,29	1886038,2	Gorges du gardon, amont de Remoulins	NON	0/12
					NON	0/12
	GAR2	771871,06	1885476,9		NON	0/12
					NON	0/12
	GAR3	768673,93	1883980,2		NON	0/12
					NON	0/12
Le Verdon	VER0	927065,12	1873782,08	Amont couloir Samson	NON	0/12
	VER1	930001,76	1874218,03	Confluence Jabron à Castellane	OUI	3/12
	NON	0/12				
	VER2	930484,21	1875783,54		OUI	7/12
	OUI	2/12				
	VER3	929673,26	1877696,07		NON	0/12
	NON	0/12				
	VER4	930589,2	1878516,79		OUI	5/12
	NON	0/12				
VER5	935138,5	1879759,23	NON		0/12	
NON	0/12					
VER6	937287,39	1880319,67	NON	0/12		

4°) Discussion

Les résultats de cette étude mettent en évidence une nouvelle population d'Apron du Rhône sur le Verdon (cf. Figure 1). En effet 3 stations se sont révélées positives pour l'espèce : VER1, VER2 et VER4. L'absence de détection d'ADN de l'espèce sur la station VER3 laisse à penser que deux populations différentes pourraient être présentes. Il serait intéressant de tester ces hypothèses en menant des inventaires complémentaires sur ces stations (par exemple par pêches électriques). Cela permettrait également d'estimer la taille des populations présentes, ce qui n'est à l'heure actuelle pas possible avec les méthodes basées sur l'étude de l'ADNe.

Pour les stations VERO et VER6, une seule filtration d'eau a pu être réalisée. L'Apron du Rhône n'a pas pu être détecté mais les conditions d'échantillonnage n'étaient pas optimales pour ces deux sites.

Linéaire de présence de l'Apron sur le Verdon

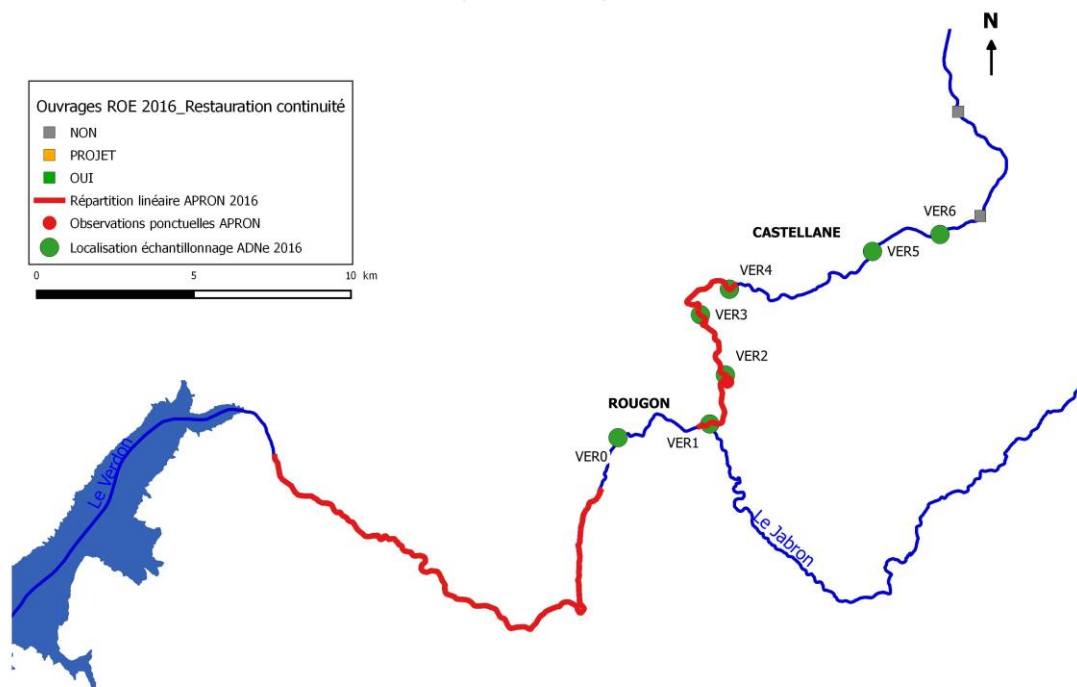


Figure 1 : Linéaire de présence de l'Apron du Rhône suite à cette étude (2016)

L'ADN de l'Apron du Rhône n'a pas non plus été détecté sur les autres sites d'étude (situés sur les cours d'eau du Doubs, de la Loue, de la Lanterne, de l'Ain, du Drac, de la Cèze et du Gardon). Les tests réalisés en 2015 sur des sites où l'espèce était présente en faible densité avaient mené à une détection positive de l'espèce par l'ADNe. L'Apron du Rhône est donc soit absent des linéaires des cours d'eau étudiés en 2016, soit présent à une densité très faible qui ne permet pas sa détection par l'ADNe.

A travers ces 5 années du Plan National d'Action pour l'Apron du Rhône (2012-2016), la méthode ADNe s'est montrée performante, notamment en mettant en évidence plusieurs nouvelles populations d'Aprons (sur la Bléone en 2014 et sur le Verdon en 2016). Cette méthode présente maintenant des protocoles d'échantillonnage et d'analyse validés et peut être utilisée pour la recherche de poissons dans les milieux aquatiques courants, notamment dans le cas d'espèces rares et discrètes. Des améliorations pourraient cependant être apportées pour faciliter la filtration d'eau sur site, en utilisant par exemple un bateau préleveur à la place d'une pompe péristaltique portable.

5°) Références

Civade R., Dejean T., Valentini A., Roset N., Raymond J.-C., Bonin A., *et al.*, 2016. Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. PLoS ONE 11(6): e0157366. doi:10.1371/journal.pone.0157366.



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

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

www.spygen.com



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



Et coordonné par la DREAL Rhône-Alpes :



Partenaires financiers du PNA:

