



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**

SPYGEN, novembre 2013

SPYGEN[®]



RAPPORT D'ETUDE

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

CEN Rhône Alpes - Novembre 2013



1°) Contexte de l'étude :

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. 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 d'espaces naturels Rhône-Alpes (CEN RA). 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 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 Novembre 2012, a consisté à étudier la faisabilité de détection de l'Apron du Rhône 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). La seconde phase, réalisée en Octobre 2013, a permis de tester la détectabilité de l'espèce dans un cours d'eau de plus grande taille (La Leysse / Savoie). Deux paramètres ont été testés : le nombre d'Aprons du Rhône placés dans le cours d'eau et la distance d'échantillonnage. Les Aprons utilisés lors de ces expérimentations sont issus de la reproduction artificielle menée par le Muséum de Besançon. Ils ont été transférés à l'Aquarium du Bourget se situant à proximité immédiate des lieux d'expérimentations. Une fois les manipulations effectuées, ces Aprons ont été pris à nouveau en charge par l'Aquarium du Bourget pour la sensibilisation du grand public.

Nous présentons dans ce rapport les principaux résultats obtenus lors de la première phase (*détails de l'expérimentation présentés dans le rapport intermédiaire*) ainsi que le protocole d'étude et les résultats obtenus lors de la seconde phase.

2°) Phase 1 : Principaux résultats

Les premières expérimentations ont été menées sur le ruisseau du Bondat (affluent de l'Albanne - Savoie - Débit estimé : 0.3 m³/s) les 7 et 8 Novembre 2012. Cinq Aprons du Rhône ont été placés dans une nasse et des prélèvements (100 litres) ont été réalisés à 50 mètres à l'aval de celle-ci à l'aide d'une pompe péristaltique (débit : 2 L /min) et d'une capsule de filtration à usage unique (porosité 0.45 µm). Six pompages successifs ont été réalisés : 3 pompages de jour et 3 de nuit (Figure 1).



Figure 1 : Nasse contenant les cinq Aprons du Rhône

L'ADN de l'Apron du Rhône a été détecté dans l'ensemble des échantillons prélevés (déteabilité 100%). Néanmoins, cette première expérimentation a permis de démontrer que lorsque les prélèvements sont réalisés de nuit, la quantité d'ADN détectée est plus importante (p -value = $9.45e^{-06}$; Figure 2).

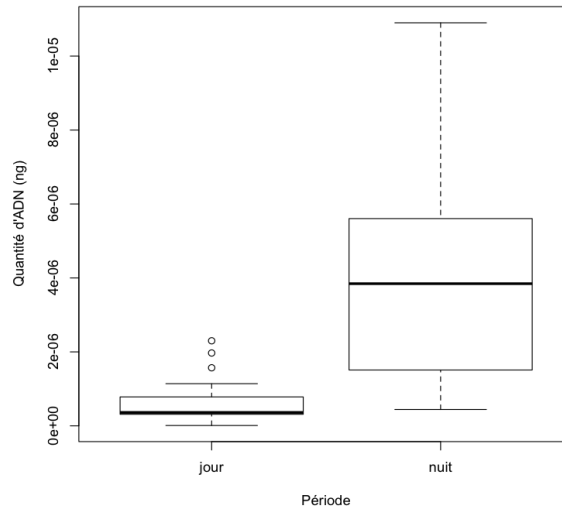


Figure 2 : Comparaison de la quantité d'ADN d'Apron du Rhône détectée en fonction de la période d'échantillonnage

3°) Phase 2 : Protocole d'étude

Pour cette seconde phase, les expérimentations ont été menées sur un cours d'eau de taille plus importante ; la Leysse (Le Bourget du Lac - Savoie ; Débit estimé : $7 \text{ m}^3/\text{s}$ - Largeur moyenne : 20 m - Profondeur moyenne : 50 cm). Trois nasses ont été positionnées dans le cours d'eau le 1 Octobre 2013 à 10 h (Figure 3). A 18 h, 5 Aprons du Rhône de petite taille (environ 7 cm) provenant de l'Aquarium de Besançon ont été placés dans la nasse centrale. Le 2 Octobre à 18 h, un prélèvement de 100 Litres a été effectué en amont des cages (*témoïn négatif*) à l'aide d'une pompe péristaltique (débit : 2 L/min) installée au centre du cours d'eau et de capsules de filtration à usage unique (porosité $1 \mu\text{m}$). Nous avons alors observé que les cages avaient été ouvertes et que 3 Aprons avaient disparus. L'ensemble du dispositif a alors été retiré de l'eau en attendant d'être sécurisé (mise en place de chaînes et de cadenas).



Figure 3 : Nasses placées dans la Leysse contenant les Aprons du Rhône

Le 7 Octobre, les nasses ont été installées à nouveau dans la Leysse et 5 Aprons du Rhône ont été placés dans la nasse centrale. Le 8 Octobre, des prélèvements d'eau ont été effectués en suivant le même protocole que celui utilisé pour le témoin négatif. Au total, 9 prélèvements de 100 litres ont été réalisés entre 19 h et 1 h : 3 à 8 m de la cage, 3 à 50 m et 3 à 200 m (densités estimées d'Aprons entre 0,0625 et 0,0025 individus / m^3 ; Tableau I).

N.B : Les prélèvements ont été réalisés à 3 distances différentes car de récents travaux publiés par une équipe américaine (Pilliod et al. 2013¹) ont montré, en utilisant comme modèle biologique la Salamandre géante de l'Idaho (*Dicamptodon aterrimus*), que l'espèce ne pouvait être détectée dans des cours d'eau de taille moyenne (environ 4 mètres de large et 10-20 cm de profondeur) que lorsqu'elle était présente à une densité élevée (environ 1,65 individus/m³) et lorsque les prélèvements (2 Litres d'eau) étaient effectués au maximum 5 mètres en aval de la source d'ADN. L'objectif était donc de voir si, avec le protocole utilisé dans le cadre de cette étude (filtration de volume plus importants ; 100 L et densités de poissons plus faibles), la distance de détection était différente.

Après cette première série de prélèvements, 12 Aprons du Rhône ont été répartis dans les 2 autres cages (6 Aprons par cage). Le 9 Octobre, une seconde campagne de prélèvements a été effectuée (entre 19 h et 1 h) : 3 prélèvements à 8 m, 3 à 50 m, et 3 à 200 m (densités estimées d'Aprons entre 0,2125 et 0,0085 individus / m³ ; Tableau I). Les Aprons (tous vivants, comme à la fin de la première expérimentation) ont alors été retirés du cours d'eau. Les échantillons ont été conservés au congélateur jusqu'à l'analyse. L'extraction d'ADN a été réalisée 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. Des tests d'inhibition ont été effectués sur chaque échantillon. En fonction du degré d'inhibition, les échantillons ont été dilués 10 ou 100 fois. L'amplification de l'ADN, par PCR quantitative (qPCR), a été effectuée avec un couple d'amorces spécifiques pour l'Apron du Rhône (12 répliquats par échantillon).

Tableau I : Informations relatives aux différents pompages réalisés dans le cadre de la Phase 2 de l'étude (date, heure, distance, nombre et densité d'Aprons du Rhône)

Echantillon	Date prélèvement	Heure début	Heure fin	Distance / Nasse	Nombre Aprons	Densité Aprons (nb ind. / m ³)
Témoïn	02/10/2013	18h	19h	- 2 m	0	0
1	08/10/2013	22h45	23h45	8m	5	0,0625
2	08/10/2013	23h	00h	8m	5	0,0625
3	08/10/2013	23h45	00h45	8m	5	0,0625
4	08/10/2013	19h	20h	50m	5	0,0100
5	08/10/2013	20h	21h	50m	5	0,0100
6	08/10/2013	21h	22h	50m	5	0,0100
7	08/10/2013	19h	20h	200m	5	0,0025
8	08/10/2013	20h	21h	200m	5	0,0025
9	08/10/2013	21h	22h	200m	5	0,0025
10	09/10/2013	22h45	23h45	8m	17	0,2125
11	09/10/2013	22h45	23h45	8m	17	0,2125
12	09/10/2013	23h45	00h45	8m	17	0,2125
13	09/10/2013	19h	20h	50m	17	0,0340
14	09/10/2013	20h	21h	50m	17	0,0340
15	09/10/2013	21h	22h	50m	17	0,0340
16	09/10/2013	19h	20h	200m	17	0,0085
17	09/10/2013	20h	21h	200m	17	0,0085
18	09/10/2013	21h	21h	200m	17	0,0085

¹ Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., & Waits, L.P. (2013) Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12159.

4°) Phase 2 : Résultats

Le tableau suivant présente les résultats obtenus à partir de l'analyse ADN des échantillons prélevés dans la Leysse (Tableau II).

Tableau II : Résultats de l'amplification des échantillons avec le couple d'amorces spécifique *Z. Asper*

Echantillon	Distance / Nasse	Nombre Apron	Densité Aprons	Dilution	Nombre répliqués positifs
Témoin	- 2 m	0	0	-	0/12
1	8m	5	0,0625	-	0/12
2	8m	5	0,0625	-	0/12
3	8m	5	0,0625	-	0/12
4	50m	5	0,0100	-	0/12
5	50m	5	0,0100	-	0/12
6	50m	5	0,0100	X 10	0/12
7	200m	5	0,0025	-	0/12
8	200m	5	0,0025	X 10	0/12
9	200m	5	0,0025	-	0/12
10	8m	17	0,2125	X 10	0/12
11	8m	17	0,2125	-	3/12
12	8m	17	0,2125	X 10	0/12
13	50m	17	0,0340	X 100	2/12
14	50m	17	0,0340	-	1/12
15	50m	17	0,0340	-	0/12
16	200m	17	0,0085	X 10	0/12
17	200m	17	0,0085	-	0/12
18	200m	17	0,0085	-	0/12

Les 9 premiers prélèvements effectués (présence de 5 Aprons) n'ont pas permis de détecter d'ADN d'Apron du Rhône. Lors de la seconde série de prélèvements (présence de 17 Aprons), de l'ADN d'Apron a été détecté à 5 mètres (1 échantillon sur 3) et à 50 mètres (2 échantillons sur 3). La quantité d'ADN obtenue dans ces 3 échantillons étant inférieure à la limite de quantification de l'appareil utilisé (qPCR), nous présentons dans ce rapport uniquement le nombre de répliqués positifs.

5°) Discussion

Cette première étude sur l'Apron du Rhône a permis de démontrer qu'il est possible de détecter la présence de cette espèce en milieu aquatique courant grâce à l'ADN environnemental. Néanmoins, la détectabilité de l'espèce varie grandement en fonction de la période d'échantillonnage, de la taille du site étudié et de la densité d'individus. Lors des premiers tests, réalisés sur un cours d'eau de petite taille (débit estimé : 0.3 m³/s), de l'ADN d'Apron du Rhône a été détecté dans 100 % des échantillons analysés (hors témoin négatif). Néanmoins, nous avons pu démontrer qu'un échantillonnage nocturne permettait d'augmenter de manière significative la quantité d'ADN capturée. Lors de la seconde expérimentation, menée sur un cours d'eau de plus grande taille (débit estimé : 7 m³/s), de l'ADN d'Apron a été détecté uniquement lorsque 17 individus étaient présents dans le milieu, avec une détectabilité variable en fonction des distances d'échantillonnage. La détection de l'espèce a été optimale à la distance intermédiaire (50 m ; 2 échantillons positifs sur 3). Le fait que la détectabilité soit moindre à proximité des

nasses (8 m) peut être dû à une trop faible homogénéisation de l'ADN dans le milieu à cette distance. L'absence de signal à une distance plus élevée (200 m) peut être liée à une dilution trop importante de l'ADN.

La stratégie d'échantillonnage utilisée dans le cadre de cette étude (filtration de volumes d'eau importants – 100 L) a permis d'augmenter considérablement la détectabilité d'une espèce en cours d'eau par rapport à celle présentée dans la littérature récente (détection de l'espèce cible à une densité 48 fois plus faible que dans l'étude menée par Pilliod *et al.* 2013). Ces résultats sont donc très encourageants, compte tenu notamment des conditions d'expérimentations qui n'étaient pas optimales lors de la phase 2 de l'étude. 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 ont été placés dans la Leysse seulement 24 h avant la réalisation des prélèvements d'eau (par crainte de vandalisme). Contrairement aux premiers tests réalisés en Novembre 2012 dans le ruisseau du Bondat, aucun Apron n'a été observé de nuit en dehors des tubes leurs servant de cache.

Néanmoins, des améliorations sont encore nécessaires pour augmenter la détectabilité de cette espèce. De nouvelles expérimentations sur l'Apron seront donc menées en 2014, en collaboration avec l'unité de recherche HBAN de l'Irstea Antony (qui a participé à la phase 2 de cette étude) et l'ONEMA, afin de tester des stratégies d'échantillonnage permettant d'améliorer la probabilité de détection de l'ADN environnemental en milieu aquatique courant. Un échantillonnage plus intégrateur, sur l'ensemble de la station étudiée, à l'aide d'un bateau télécommandé préleveur d'eau sera notamment testé. Il sera également nécessaire de tester en 2014 la détectabilité de l'espèce dans des cours d'eau où l'espèce est naturellement présente, à des densités variables.



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:

