



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 3)

SPYGEN[®]



RAPPORT D'ETUDE

Etude de faisabilité pour la détection de l'Apron du Rhône grâce à l'ADN environnemental (Phase 3)

CEN Rhône Alpes - Mars 2015



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'Ecologie, 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 phase 2 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).

En 2014, des tests ont été réalisés sur des cours d'eau où l'espèce est naturellement présente. L'objectif de cette troisième phase du projet était de comparer la détectabilité de l'Apron du Rhône en fonction de la période de prélèvement (jour vs nuit), de la stratégie d'échantillonnage utilisée et de la méthode d'analyse mise en œuvre. Lors des premières phases du projet, les analyses ont été effectuées uniquement avec une approche ciblée Apron du Rhône (ADNe Barcoding). Une nouvelle technologie (ADNe Metabarcoding), développée depuis 2010 par SPYGEN, en collaboration avec l'ONEMA, le LECA et IRSTEA, permet aujourd'hui de rechercher simultanément toutes les espèces de poissons présentes sur un site. Cette approche a donc été testée en parallèle à l'ADNe Barcoding afin d'étudier sa capacité à détecter une espèce rare et discrète.

2°) Protocole d'étude

Les expérimentations ont été réalisées sur trois stations où la présence de l'Apron du Rhône est avérée : la Durance (Les Henris - 44°18'42"N 5°55'30"E - les 7 et 8 Août 2014), la Beaume (Les Platanes - 44°27'21"N 4°16'33"E - les 13 & 14 Août 2014) et la Loue (Port-Lesney - 47°00'15"N 5°49'24"E - le 21 Octobre 2014). Ces 3 sites ont été sélectionnés car il s'agit des stations de référence de l'action 8 du PNA (étude du régime alimentaire de l'Apron du Rhône) où des captures d'Aprons sont effectuées 2 fois par an par l'Université de Marseille et IRSTEA Aix-en-Provence. Cela permet d'avoir une bonne connaissance des effectifs en place sur ces stations (Durance : 58 Aprons capturés le 17/10/14 - Beaume : 109 Aprons capturés le 30/10/14 - Loue : 50 Aprons capturés le 16/09/14). Pour chaque échantillon, 60 litres d'eau ont été filtrés à l'aide d'une pompe péristaltique et d'une capsule de filtration à usage unique (porosité 1 µm). Sur la Durance et la Beaume, cinq prélèvements (4 ponctuels et 1 intégrateur spatial) ont été effectués de jour (10 h à 13 h) et de nuit (22 h à 1h) (Tableau I et Figures 1, 2, 3). Sur la Loue, seuls les prélèvements de jour ont été effectués compte tenu des conditions météorologiques (cours d'eau en crue).

L'extraction de l'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. Pour l'analyse ADNe Barcoding, l'amplification a été effectuée par PCR quantitative (qPCR) avec un couple d'amorces spécifiques pour l'Apron du Rhône (12 réplicats par échantillon). Pour l'analyse ADNe Metabarcoding, une amplification de l'ADN a été réalisée avec un couple d'amorces universelles pour les Poissons (12 réplicats) puis les échantillons amplifiés ont été séquencés à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération (MiSeq - Illumina). Les séquences obtenues ont été analysées avec des outils bio-informatiques permettant d'éliminer les erreurs dues à l'amplification ou au séquençage et de comparer chaque séquence avec la base de références génétiques SpyGen®.

Tableau I : Description des prélèvements ADNe effectués

Code	Description
1	Jour - Filtration à 20 m en aval de la tête de radier (surface)
2	Jour - Filtration à 20 m en aval de la tête de radier (mi-hauteur d'eau)
3	Jour - Filtration en tête de radier (surface)
4	Jour - Filtration en tête de radier (mi-hauteur d'eau)
5	Jour - Filtration intégratrice spatiale
6	Nuit - Filtration à 20 m en aval de la tête de radier (surface)
7	Nuit - Filtration à 20 m en aval de la tête de radier (mi-hauteur d'eau)
8	Nuit - Filtration en tête de radier (surface)
9	Nuit - Filtration en tête de radier (mi-hauteur d'eau)
10	Nuit - Filtration intégratrice spatiale

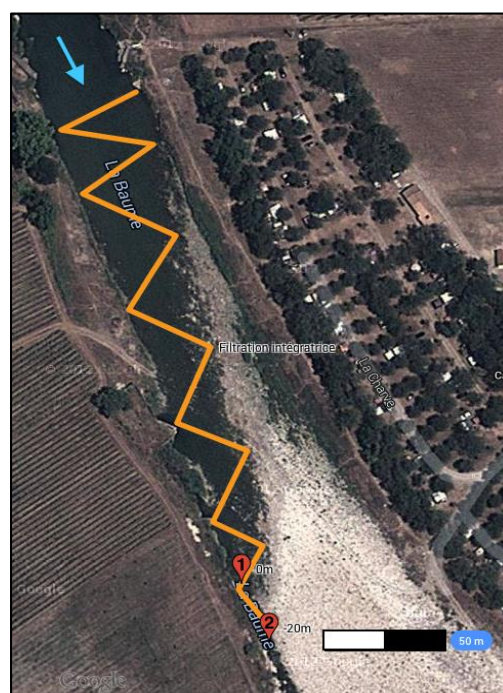


Figure 1 : Localisation des prélèvements ADNe effectués sur la Beaulieu
(1 = Filtration en tête de radier ; 2 = Filtration à 20 mètres en aval du radier)

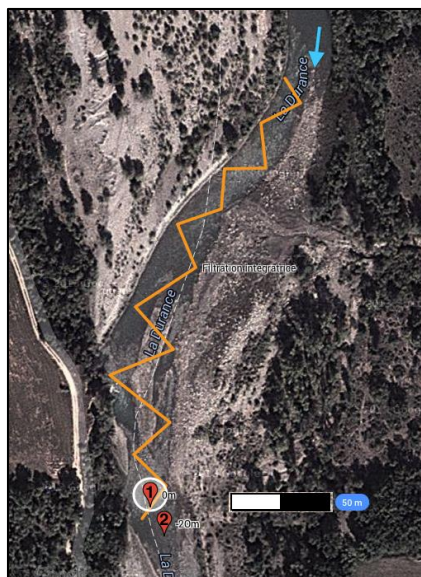


Figure 2 : Localisation des prélèvements ADNe effectués sur la Durance
(1 = Filtration en tête de radier ; 2 = Filtration à 20 mètres en aval du radier)



Figure 3 : Localisation des prélèvements ADNe effectués sur la Loue
(1 = Filtration en tête de radier ; 2 = Filtration à 20 mètres en aval du radier)

3°) Résultats

Les analyses ADNe Barcoding et Metabarcoding ont été effectuées sur 24 échantillons. En effet, au cours de l'expérimentation de nuit sur la Durance, une capsule s'est décrochée pendant la filtration et n'a pu être retrouvée.

- Analyses ADNe Barcoding

Sur la Beaulieu, l'ADN de l'Apron du Rhône a été détecté dans l'ensemble des échantillons, quelle que soit la stratégie d'échantillonnage utilisée et la période de prélèvement. Sur la Durance et la Loue, une filtration n'a pas permis de détecter l'Apron (prélèvement intégrateur de jour pour la Durance et prélèvement en aval de la tête de radier pour la Loue) (Tableau II).

Tableau II : Résultats des analyses ADNe Barcoding Apron du Rhône sur la Durance, la Beaume et la Loue

Code prélèvement	Durance		Beaume		Loue	
	Détection Apron	Nb réplcats positifs	Détection Apron	Nb réplcats positifs	Détection Apron	Nb réplcats positifs
1	OUI	12/12	OUI	11/12	NON	0/12
2	OUI	12/12	OUI	12/12	OUI	3/12
3	OUI	12/12	OUI	12/12	OUI	3/12
4	OUI	12/12	OUI	12/12	OUI	1/12
5	NON	0/12	OUI	10/12	OUI	1/12
6	OUI	12/12	OUI	5/12	-	-
7	-	-	OUI	9/12	-	-
8	OUI	12/12	OUI	10/12	-	-
9	OUI	12/12	OUI	1/12	-	-
10	OUI	10/12	OUI	4/12	-	-

En considérant chaque station (Beaume et Durance) et chaque stratégie d'échantillonnage comme un réplcat d'expérimentation, les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence significative de détectabilité (nombre de réplcats PCR positifs) en fonction de la période de prélèvement ($Pvalue = 0.243$) (Figure 4).

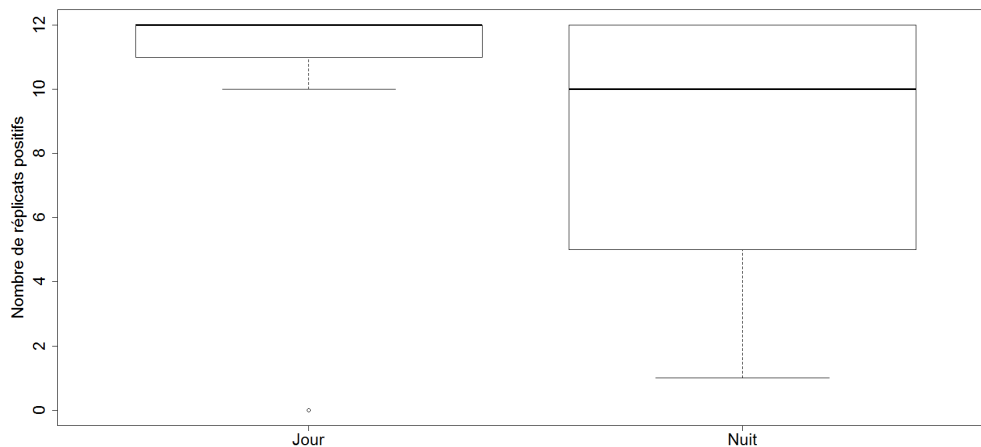


Figure 4 : Comparaison de la détectabilité de l'Apron du Rhône (nombre de réplcats PCR positifs) en fonction de la période d'échantillonnage

La comparaison de l'ensemble des méthodes d'échantillonnage testées montre que seul le prélèvement intégrateur spatial offre une détectabilité (nombre de réplcats positifs) de l'Apron significativement plus faible que toutes les autres stratégies ($Pvalue = 0.142$) (Figure 5).

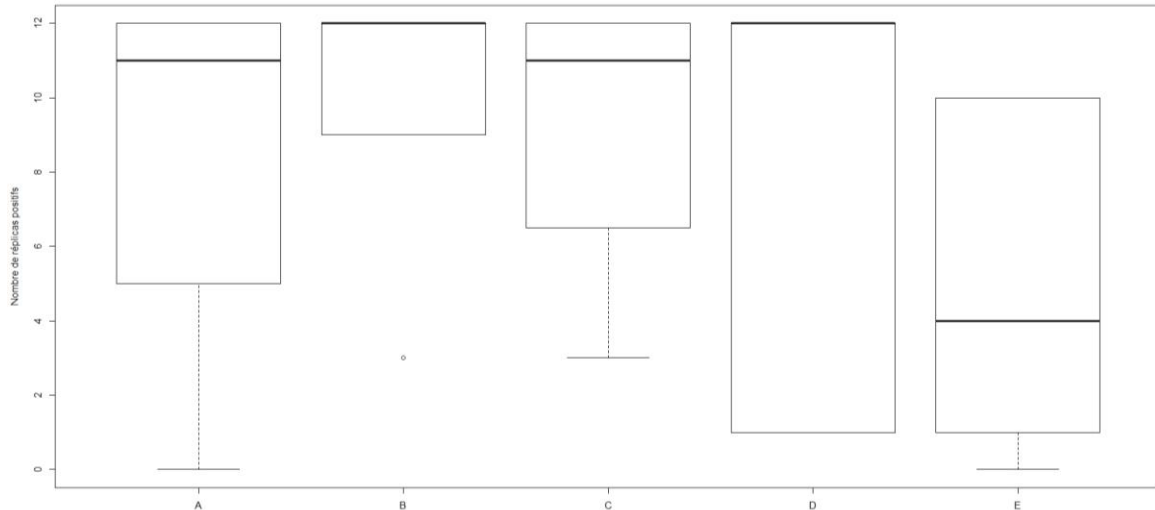


Figure 5 : Comparaison de la détectabilité de l'Apron du Rhône (nombre de réplicats PCR positifs) en fonction de la méthode d'échantillonnage utilisée – A = Filtration à 20 m en aval de la tête de radier (Surface) ; B = Filtration à 20 m en aval de la tête de radier (mi-hauteur d'eau) ; C = Filtration en tête de radier (surface) ; D = Filtration en tête de radier (mi-hauteur d'eau) ; E = Filtration intégratrice spatiale

- Analyses ADNe Metabarcoding

La détectabilité de l'Apron du Rhône en utilisant l'approche ADNe Metabarcoding est identique à celle obtenue avec la méthode ciblée sur les stations de la Beume (100 %) et de la Durance (89%). Sur la Loue, l'espèce a été détectée dans l'ensemble des échantillons avec le Metabarcoding et sur 80 % d'entre eux avec le Barcoding.

Les tableaux III, IV et V présentent la liste des espèces de poissons détectées sur chaque station. Sur la Durance, quelques séquences d'ADN d'Ablette (*Alburnus alburnus*), de Corégone (*Coregonus lavaretus*), de Carpe (*Cyprinus carpio*), de Perche soleil (*Lepomis gibbosus*), de Gardon (*Rutilus rutilus*), d'Omble (*Salvelinus* sp.), de Rotengle (*Scardinius erythrophthalmus*) et de Tanche (*Tinca tinca*), ont également été mises en évidence. Sur la Beume, de l'ADN d'Anguille (*Anguilla anguilla*), de Lamproie (*Lampetra* sp.), de *Leuciscus* sp., de Gardon (*Rutilus rutilus*) et de Tanche (*Tinca tinca*) a été détecté. Néanmoins, ce signal très faible laisse penser que ces espèces ne sont pas présentes sur les stations étudiées mais sur des sites situés bien à l'amont.

NB : Des études sont actuellement en cours pour connaître l'origine du signal ADNe en milieu aquatique courant.

Tableau III : Liste des espèces détectées sur la Durance pour les 9 prélèvements effectués et nombre de séquences ADN associées

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Code prélèvement								
		1	2	3	4	5	6	8	9	10
<i>Barbatula sp.</i>	Loche*	75093	36698	58318	24185	345000	40753	13487	37802	437746
<i>Barbus barbus</i>	Barbeau fluviatile	141631	60158	94008	42866	457984	70017	22711	63376	796503
<i>Cottus sp.</i>	Chabot*	14109	10132	13424	6729	10228	9133	2696	9043	4431
<i>Cyprinidae</i>	**	73189	33793	57882	29269	310259	40493	15696	45982	489941
<i>Esox lucius</i>	Brochet	1162	581	1049	484	0	116	275	946	0
<i>Gobio gobio</i>	Goujon	14318	9637	11744	5320	12365	8178	3999	12798	44439
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel	2023	1427	774	957	0	1230	344	685	435
<i>Perca fluviatilis</i>	Perche	1395	1568	1111	491	0	397	220	1410	0
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Vairon	2262	4382	2305	1338	6949	928	1149	3150	941
<i>Salmo trutta</i>	Truite	40238	26906	34475	15664	103660	14335	3670	12111	23510
<i>Squalius cephalus</i>	Chevaine	51500	24706	34132	17043	208580	19980	9891	21664	208682
<i>Zingel asper</i>	Apron du Rhône	13874	8854	14502	6400	0	11324	3425	11331	2742

* Les espèces des genres *Barbatula* et *Cottus* ne peuvent pas être distinguées avec le couple d'amorces universelles Poissons utilisé. ** Il n'est pas non plus possible de faire la distinction entre le Blageon (*Telestes souffia*), le Hotu (*Chondrostoma nasus*) et le Toxostome (*Chondrostoma toxostoma*). Un couple d'amorces complémentaires, plus résolutif pour ces genres, est en cours de développement.

Tableau IV : Liste des espèces détectées sur la Beume pour les 10 prélèvements effectués et nombre de séquences ADN associées

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Code prélèvement									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	Spirlin	5347	9096	11371	4153	3624	5977	6060	3786	4714	7425
<i>Alburnus alburnus</i>	Ablette	1396	2596	3167	1069	955	2564	2522	2002	2083	2334
<i>Barbatula sp.</i>	Loche*	10072	19038	18015	6337	5997	16127	17352	12994	17641	17003
<i>Barbus barbus</i>	Barbeau fluviatile	16139	24553	32467	10846	9399	24351	23196	20781	31709	27238
<i>Cottus sp.</i>	Chabot*	558	990	364	282	120	347	585	348	256	225
<i>Cyprinidae</i>	**	50267	72291	97555	31873	30032	46574	43612	38405	48884	57610
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe	104	183	205	115	83	703	616	276	178	300
<i>Gobio gobio</i>	Goujon	29731	41709	47793	17125	16531	38772	40718	31229	36407	44682
<i>Lepomis gibbosus</i>	Perche-soleil	4607	9241	6366	2398	3473	3883	5929	6910	5645	8067
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Vairon	2806	5361	3533	3483	2608	5183	4100	9636	525	1753
<i>Pseudorasbora parva</i>	Pseudorasbora	546	923	798	273	332	817	912	403	441	441
<i>Salmo trutta</i>	Truite	1622	1854	1984	1127	1435	3438	1959	2314	1421	3965
<i>Squalius cephalus</i>	Chevaine	11802	16313	22764	7368	7157	15598	15066	11476	17197	16890
<i>Zingel asper</i>	Apron du Rhône	699	914	688	568	504	952	1448	1049	367	1189

* Les espèces des genres *Barbatula* et *Cottus* ne peuvent pas être distinguées avec le couple d'amorces universelles Poissons utilisé. ** Il n'est pas non plus possible de faire la distinction entre le Blageon (*Telestes souffia*), le Hotu (*Chondrostoma nasus*) et le Toxostome (*Chondrostoma toxostoma*). Un couple d'amorces complémentaires, plus résolutif pour ces genres, est en cours de développement.

Tableau V : Liste des espèces détectées sur la Loue pour les 5 prélèvements effectués et nombre de séquences ADN associées

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Code prélèvement				
		1	2	3	4	5
<i>Abramis brama</i>	Brème commune	0	320	76	112	294
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	Spirlin	10996	6150	6363	8076	11186
<i>Alburnus alburnus</i>	Ablette	73	558	96	0	47
<i>Ameiurus sp.</i>	Poisson-chat	178	2350	183	619	0
<i>Barbatula sp.</i>	Loche*	83560	70165	64738	87540	94166
<i>Barbus barbus</i>	Barbeau fluviatile	51925	44996	36925	47214	63919
<i>Cottus sp.</i>	Chabot*	100082	91572	79388	109776	125264
<i>Cyprinidae</i>	**	46826	47538	37410	49945	58643
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune	238	184	68	141	340
<i>Gobio gobio</i>	Goujon	6508	7879	5873	8008	6968
<i>Lampetra sp.</i>	Lamproie	634	566	34	221	982
<i>Leuciscus sp.</i>	*	9682	12776	7402	8798	14370
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel	1561	2418	1374	1427	2356
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Vairon	26982	19256	27962	65367	53889
<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon	894	1171	1034	961	2186
<i>Salmo trutta</i>	Truite commune	62124	70631	55442	76745	72981
<i>Squalius cephalus</i>	Chevaine	16048	13224	10479	15183	20164
<i>Thymallus thymallus</i>	Ombre commun	21043	15854	19597	21497	27213
<i>Tinca tinca</i>	Tanche	266	653	292	379	499
<i>Zingel asper</i>	Apron du Rhône	432	1276	131	561	14

* Les espèces des genres *Barbatula*, *Cottus* et *Leuciscus* ne peuvent pas être distinguées avec le couple d'amorces universelles Poissons utilisé. ** Il n'est pas non plus possible de faire la distinction entre le Blageon (*Telestes souffia*), le Hotu (*Chondrostoma nasus*) et le Toxostome (*Chondrostoma toxostoma*). Un couple d'amorces complémentaires, plus résolutif pour ces genres, est en cours de développement.

4°) Discussion

Les expérimentations menées dans le cadre de la Phase 3 de cette étude pilote ont permis de démontrer les performances des technologies basées sur l'étude de l'ADN environnemental pour la détection de l'Apron du Rhône. Sur les 24 échantillons analysés, l'espèce a été détectée dans 92 % des cas avec la méthode ADNe Barcoding, et dans 96 % avec l'approche ADNe Metabarcoding. Le faible taux de détection de l'espèce (nombre de répliques PCR positifs) sur la Loue est probablement lié à l'état hydrologique du cours d'eau au moment du prélèvement (niveau d'eau élevé, milieu très turbide). Sur les autres stations, les prélèvements ont été effectués en période d'étiage.

Contrairement aux tests réalisés au cours de la phase 1 de l'étude, les expérimentations menées sur des populations naturelles d'Apron ont démontré qu'il n'y a pas de différence significative de détectabilité entre un prélèvement de jour et de nuit. Néanmoins, il est important de préciser que les prélèvements de jour ont été effectués entre 10 h et 13 h, en prenant en considération le rythme digestif de l'espèce (fèces libérés dans le milieu durant cette période – M. Georget com. pers.). Il n'est donc pas possible de conclure si la détectabilité de l'espèce serait identique à d'autres moments de la journée. Afin d'éviter les contraintes liées à la réalisation de prélèvements de nuit, un échantillonnage de jour (entre 10 et 13 h) sera donc privilégié.

Concernant la stratégie d'échantillonnage, les expérimentations réalisés sur ces trois cours d'eau ont permis de démontrer qu'il n'y a pas de différence significative entre les méthodes testées, hormis pour le prélèvement spatial (moins performant). En 2014, des tests similaires ont été réalisés sur plusieurs cours d'eau de France, en collaboration avec IRSTEA Antony et l'ONEMA. L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus permettra de mettre en évidence si une stratégie d'échantillonnage est à privilégier. Des études ont également été menées en 2014 afin de mieux appréhender la distance de détection d'une espèce en cours d'eau avec l'ADN environnemental. Les résultats de ces travaux seront communiqués au PNA Apron du Rhône au cours des prochains mois. En prenant en considération l'ensemble de ces informations, il pourra être intéressant d'étudier en 2015 la détectabilité de l'Apron sur des stations où l'espèce est présente en très faible effectif. En effet, les populations d'Apron sur les stations étudiées (Durance, Loue et Beaume) sont relativement importantes en comparaison à celles d'autres cours d'eau du bassin Rhône-Méditerranée-Corse.



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



Direction régionale de l'environnement
RHÔNE-ALPES

Partenaires financiers du PNA:

