



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 4)**

SPYGEN[®]



RAPPORT D'ETUDE

Etude de faisabilité pour la détection de l'Apron du Rhône grâce à l'ADN environnemental (Phase 4)

CEN Rhône-Alpes - Décembre 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 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 œuvre (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).

Les objectifs de l'année 2015 ont été de comparer la détectabilité de l'espèce en fonction des heures de la journée (entre 8h et 18h) sur des sites où l'espèce est présente en forte densité et de tester la validité de la méthode sur des sites où l'espèce est présente en faible densité. Suite aux bons résultats obtenus en 2014, un troisième objectif a consisté à réaliser des prospections à l'aide de la méthode Barcoding ADNe sur des sites où la présence de l'espèce est suspectée mais non avérée.

2°) Protocole d'étude

➤ Echantillonnage

Les échantillonnages ont été réalisés par du personnel de l'ONEMA (Délégations interrégionales Rhône-Alpes, Méditerranée et Bourgogne / Franche-Comté) préalablement formé par SPYGEN.

- **Chronique journalière**

Les expérimentations ont été réalisées sur trois stations où l'Apron du Rhône est présent en forte densité : la Beaume (La Beaume - X : 804148.52 Y : 6373044.10 - le 21 Juillet 2015), la Durance (Les Henris - X : 933248.24 Y : 6361421.10 - le 21 Août 2015) et la Loue (Port-Lesney - X : 914841.13 Y : 6658965.51) - le 11 Septembre 2015). Sur chacun de ces trois sites, six filtrations d'eau de 30L ont été réalisées entre 8h et 18h (8h, 10h, 12h, 14h, 16h, 18h) à l'aide d'une pompe péristaltique et d'une capsule de filtration stérile (porosité 0.45 µm).

- **Sites à faible densité**

Les tests ont été effectués sur trois stations où l'Apron du Rhône est présent en faible densité : l'Ardèche (Vogüé - X : 812178.22 Y : 6383828.33 - le 22 Juillet 2015), l'Asse (Pont de Brunet - X : 943189.32 Y : 6315708.08 - le 30 Août 2015) et la Loue (Chouzelot - X : 921567.86 Y : 6673593.29) - le 14 Septembre 2015). Sur chacun de ces trois sites, trois 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) afin de tester la répétabilité de la méthode.

- **Recherche de nouvelles populations**

Des prospections ont été menées sur trois stations où la présence de l'Apron du Rhône est suspectée sans être avérée :

- Le Rhône (section court-circuitée de Donzère-Mondragon - X : 831845 Y : 6356020 - le 20 Juillet 2015). Cette station est très proche de la confluence avec l'Ardèche, où l'espèce est présente.
- Le Verdon (Castellane - X : 977834.24 Y : 6309523.00 - le 27 Août 2015). Les analyses génétiques effectuées sur un Apron capturé en 2011 au lieu-dit Pont de Soleil ont mis en évidence que cet individu était génétiquement différent de la population située en aval. Le site de Castellane a été choisi en amont du lieu de capture, de façon à identifier si une autre population d'Aprons est présente.
- Le Doubs (Molay - X : 882585.31 Y : 6659605.48 - le 14 Septembre 2015). Cette station a été choisie car elle présente un habitat favorable pour l'Apron et l'espèce est connue historiquement à cet endroit.

Sur chacun de ces trois 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) afin de tester la répétabilité de la méthode.

➤ 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. 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 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. Pour une comparaison plus approfondie, la quantité d'ADN (en ng/µL) a été étudiée dans le cas de la chronique journalière.

3°) Résultats

➤ Chronique journalière

Sur la Beauce, la Durance et la Loue, l'Apron du Rhône a été détecté dans tous les prélèvements, quelle que soit l'heure d'échantillonnage (Tableau I).

Tableau I : Résultats des analyses Barcoding ADN Apron du Rhône sur la Beauce, la Durance et la Loue

Heure de prélèvement	Beauce - La Baume		Durance - Les Henris		Loue - Port-Lesney	
	Détection Apron	Nb répliqués positifs	Détection Apron	Nb répliqués positifs	Détection Apron	Nb répliqués positifs
8h	OUI	7/12	OUI	12/12	OUI	11/12
10h	OUI	3/12	OUI	12/12	OUI	11/12
12h	OUI	7/12	OUI	12/12	OUI	12/12
14h	OUI	7/12	OUI	12/12	OUI	12/12
16h	OUI	5/12	OUI	12/12	OUI	9/12
18h	OUI	9/12	OUI	12/12	OUI	12/12

Les différents tests statistiques réalisés montrent que sur chaque site le nombre de répliqués PCR positifs et la quantité d'ADN obtenue semblent varier aléatoirement. Ces effets ne sont pas significatifs lorsque les trois sites sont étudiés ensemble.

En effet, en considérant chaque station comme un répliqué d'expérimentation, les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence significative de détectabilité (nombre de répliqués PCR positifs) en fonction de l'heure d'échantillonnage (p -value = 0.925, cf. Figure 1A).

De plus, en considérant chaque station et chaque répliqué PCR comme répliqué d'expérimentation, aucune différence significative (quantité d'ADN) n'est observée en fonction de l'heure d'échantillonnage (p -value = 0.08878, cf. Figure 1B).

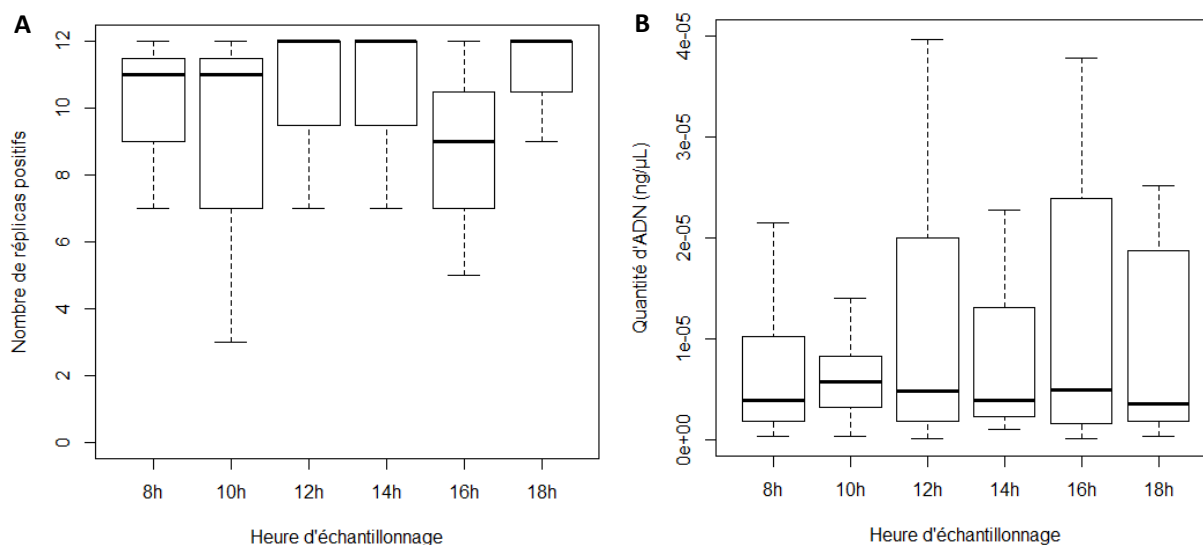


Figure 1 : Comparaison de la détectabilité de l'Apron du Rhône (A. nombre de répliqués PCR positifs et B. quantité d'ADN) en fonction de l'heure d'échantillonnage sur la Beauce, la Durance et la Loue

➤ Sites à faible densité

L'Apron du Rhône a été détecté sur les 6 échantillons de l'Ardèche et de l'Asse. Il a été détecté sur 2 des 3 échantillons de la Loue (cf. Tableau II).

Tableau II : Résultats des analyses Barcoding ADNe Apron du Rhône sur l'Ardèche, l'Asse et la Loue

Code prélèvement (dans l'ordre d'échantillonnage)	Ardèche - Vogüé		Asse - Pont de Brunet		Loue - Chouzelot	
	Détection Apron	Nb répliqués positifs	Détection Apron	Nb répliqués positifs	Détection Apron	Nb répliqués positifs
1	OUI	8/12	OUI	7/12	NON	0/12
2	OUI	4/12	OUI	9/12	OUI	1/12
3	OUI	4/12	OUI	12/12	OUI	3/12

➤ Recherche de nouvelles populations

L'Apron du Rhône n'a été détecté sur aucun des 6 échantillons du Rhône court-circuité de Donzère-Mondragon, du Verdon et du Doubs (cf. Tableau III).

Tableau III : Résultats des analyses Barcoding ADNe Apron du Rhône sur le Rhône court-circuité de Donzère-Mondragon, le Verdon et le Doubs

Code prélèvement (dans l'ordre d'échantillonnage)	Rhône court-circuité - Donzère-Mondragon		Verdon - Castellane		Doubs - Molay	
	Détection Apron	Nb répliqués positifs	Détection Apron	Nb répliqués positifs	Détection Apron	Nb répliqués positifs
1	NON	0/12	NON	0/12	NON	0/12
2	NON	0/12	NON	0/12	NON	0/12

4°) Discussion

Les expérimentations menées en 2015 ont à nouveau permis de démontrer les performances des technologies basées sur l'étude de l'ADN environnemental pour la détection de l'Apron du Rhône. En effet, sur les 27 échantillons analysés (dans le cadre de la chronique journalière et sur les sites à faible densité), l'espèce a été détectée dans 96% des cas avec la méthode du Barcoding ADNe.

Les résultats de la chronique journalière viennent compléter les conclusions des expérimentations menées en 2014. Lors de la phase 3, aucune différence significative de détectabilité n'avait été observée entre les prélèvements réalisés de jour ou de nuit (cf. rapport phase 3). D'après les tests menés cette année sur toute une journée (de 8h à 18h), la détectabilité de l'Apron du Rhône n'est pas dépendante de l'heure d'échantillonnage. A l'avenir, les prélèvements pourront donc être réalisés à n'importe quel moment de la journée.

La détection de l'Apron du Rhône par l'ADN environnemental est également validée sur des sites de plus faible densité de population puisque l'espèce a été identifiée dans 8 des 9 prélèvements effectués (tous sites confondus). Sur le site de la Loue à Chouzelot, où le nombre de répliqués positifs est plus faible que sur les autres stations, un échantillon s'est révélé négatif. La réalisation de plusieurs prélèvements sur le même site permet donc de maximiser les chances de détection de l'espèce lorsqu'elle est présente en faible densité.

Dans le cadre du PNA, les prospections réalisées cette année par l'étude de l'ADN environnemental n'ont pas permis de détecter de nouvelles populations d'Apron du Rhône. Cependant cet outil s'est récemment révélé efficace pour identifier la présence de l'Apron sur de nouveaux secteurs (ex : Bléone en 2014). Cette méthodologie basée sur l'ADNe, combinée à de nouvelles techniques d'échantillonnage (utilisation d'un bateau préleveur) permettra, à l'avenir, de faciliter la recherche de nouvelles populations d'Apron du Rhône.



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:

