



apron

Programme en faveur de l'apron du Rhône

Action 3: Détection de l'apron du
Rhône grâce à l'ADN

environnemental

sur le Doubs aval Goumois et le Verdon
secteur du couloir Samson

SPYGEN, novembre 2017

SPYGEN[®]



RAPPORT D'ANALYSE

Etude de faisabilité pour la détection de l'Apron du Rhône grâce à l'ADN environnemental (Phase 6)

Conservatoire d'espaces naturels Rhône-Alpes

Octobre 2017



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 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).

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 des années 2016 et 2017 a été d'acquérir de nouvelles connaissances sur la répartition de cette espèce (cf. rapport phase 5 pour l'année 2016). Ce rapport présente les résultats acquis en 2017.

2°) Protocole d'étude

➤ Echantillonnage

Les échantillonnages ont été réalisés par du personnel de l'AFB (Délégations Interrégionales PACA-Corse et Bourgogne / Franche-Comté) préalablement formé par SPYGEN. Les stations étudiées ont été choisies en fonction des connaissances sur les répartitions connues actuelles et passées de l'Apron du Rhône ainsi que sur les résultats ADNe de l'année 2016. Suite à des premiers résultats obtenus sur la distance de détection du signal ADNe en milieu aquatique courant (Civade *et al.* 2016), les stations ont été réparties tous les 2,5 km sur chaque cours d'eau.

- Délégation Interrégionale PACA - Corse

Deux stations ont été échantillonnées sur le Verdon (*cf.* Tableau I pour des informations plus précises sur les sites).

- Délégation Interrégionale Bourgogne - Franche-Comté

Huit stations ont été échantillonnées sur le Doubs (*cf.* Tableau II pour des informations plus précises sur les sites).

Sur chacune de ces stations, 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.

➤ 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 l'analyse.

3°) Résultats

➤ Délégation Interrégionale PACA - Corse (2 stations)

Tableau I : Caractéristique des 2 stations échantillonnées sur le Verdon et résultats ADNe.

Cours d'eau	Code station	X_LII	Y_LII	Détection ADN Apron du Rhône	Nombre réplicats positifs
Le Verdon	VER0	973347	6304813	OUI	1/12
				NON	0/12
	VER_SAM0	972959	6303619	NON	0/12
				OUI	4/12

➤ Délégation Interrégionale Bourgogne - Franche-Comté (8 stations)

Tableau II : Caractéristique des 8 stations échantillonnées sur le Doubs et résultats ADNe.

Cours d'eau	Code station	X_LII	Y_LII	Détection ADN Apron du Rhône	Nombre répliquats positifs
Le Doubs	S1	948948	2261882	NON	0/12
				OUI	1/12
	S2	948380	2263780	NON	0/12
				NON	0/12
	S3	948829	2264962	NON	0/12
				NON	0/12
	S4	950681	2265204	NON	0/12
				OUI	1/12
	S5	953035	2266202	NON	0/12
				NON	0/12
	S6	954691	2266827	NON	0/12
				NON	0/12
	S7	955240	2267877	NON	0/12
				NON	0/12
	S8	956970	2267267	NON	0/12
				OUI	1/12

4°) Discussion

Les résultats de cette étude mettent en évidence de nouvelles détections de l'Apron du Rhône sur le Verdon et le Doubs (cf. Figures 1 et 2). En effet, les 2 stations échantillonnées se sont révélées positives sur le Verdon et 3 stations se sont révélées positives sur le Doubs. Les résultats indiquent cependant qu'une faible quantité d'ADN a été détectée car sur les deux prélèvements réalisés sur chacune de ces 5 stations, seul un prélèvement se révèle positif avec un faible nombre de répliquats positifs. De plus, sur le Doubs, les stations positives sont situées à différents endroits du linéaire prospecté, ce qui pourrait laisser penser à un faible nombre d'individus qui seraient détectés sporadiquement. Une absence de détection de l'Apron du Rhône par l'ADNe sur les autres sites ne permet pas de certifier l'absence de l'espèce et peut être liée à une trop faible quantité d'ADN présente dans le milieu.

A travers ces 5 années du Plan National d'Action pour l'Apron du Rhône (2012-2017), la méthode ADNe s'est montrée performante, notamment en mettant en évidence plusieurs nouvelles populations d'Aprons (sur la Bléone en 2014, sur le Verdon en 2016 et sur le Doubs en 2017). 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.

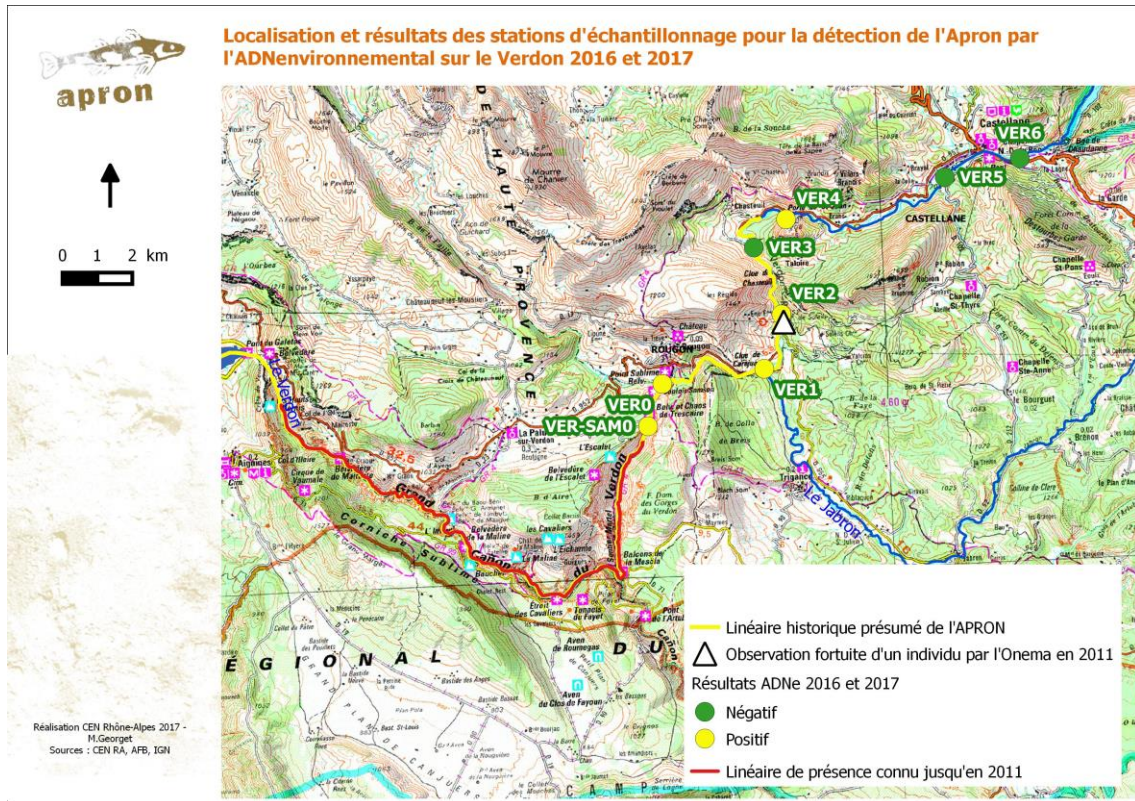


Figure 1 : Linéaire de présence de l'Apron du Rhône sur le Verdon suite aux résultats ADNe de 2016 et 2017.

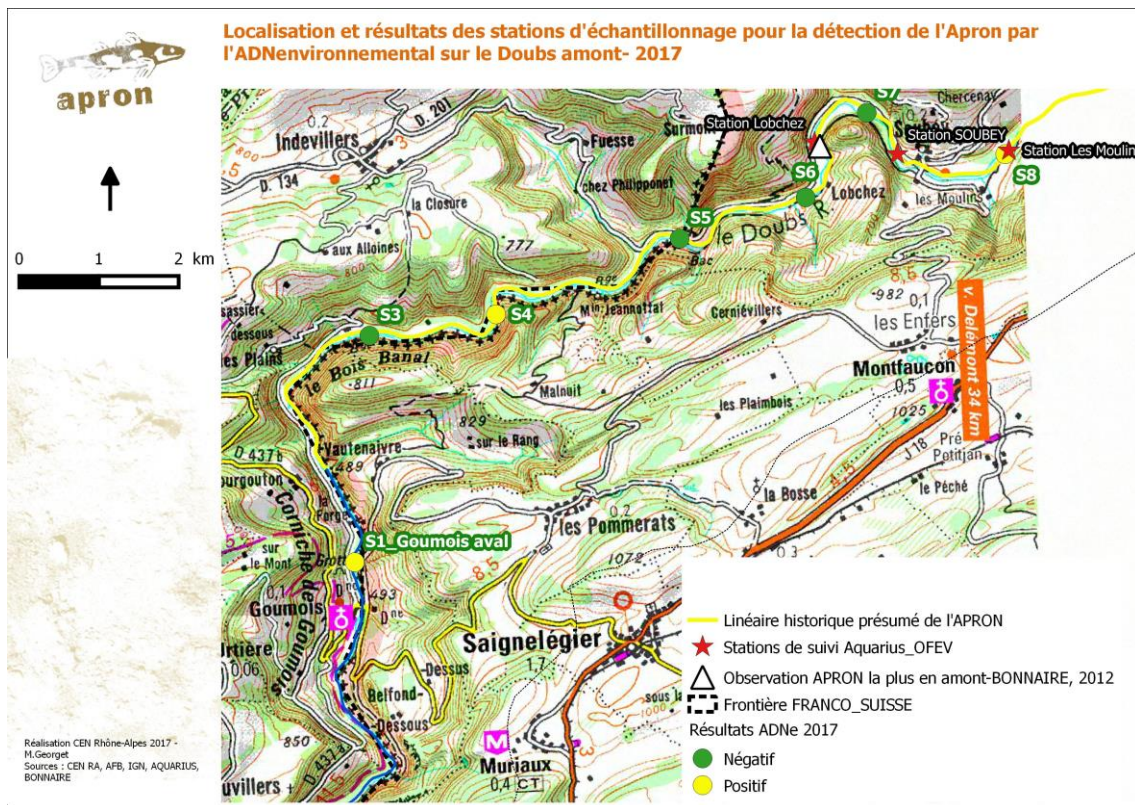


Figure 2 : Linéaire de présence de l'Apron du Rhône sur le Doubs suite aux résultats ADNe de 2017.



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 programme Apron,
animé par le



coordonné et financé par la DREAL Auvergne Rhône-Alpes

