

## **L'ADN environnemental, une nouvelle méthode performante pour l'étude des communautés piscicoles des grands cours d'eau**

eDNA, a new efficient method to study fish communities in large rivers

Pont Didier<sup>1</sup>, Rocle Mathieu<sup>2</sup>, Civade Raphaël<sup>3</sup>, Maire Anthony<sup>4</sup>, Roset Nicolas<sup>5</sup>, Dejean Tony<sup>6</sup>, Jean Pauline<sup>6</sup> & Valentini Alice<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Association VigiLIFE, 17, rue du Lac Saint-André, Savoie Technolac - BP 274, 73375 Le Bourget-du-Lac Cedex, France, didier.pont@outlook.com)

<sup>2</sup>CNR Ingénierie, 2, rue André Bonin, 69316 Lyon, France, m.rocle@cnr.tm.fr)

<sup>3</sup>Association VigiLIFE, 17, rue du Lac Saint-André, Savoie Technolac - BP 274, 73375 Le Bourget-du-Lac Cedex, France, civade\_raphael@hotmail.fr)

<sup>4</sup>EDF R&D, LNHE-Laboratoire National d'Hydraulique et Environnement, 6 quai Watier, 78401 Chatou Cedex, France, anthony.maire@edf.fr)

<sup>5</sup>AFB-Agence Française pour la Biodiversité, Direction régionale Auvergne-Rhône-Alpes, Parc de Parilly, Chemin des Chasseurs, 69500 Bron, nicolas.rosset@afbiodiversite.fr)

<sup>6</sup>SPYGEN, 17, rue du Lac Saint-André, Savoie Technolac - BP 274, 73375 Le Bourget-du-Lac Cedex, France, tony.dejean@spygen.com)

### **RÉSUMÉ**

Les réseaux de biomonitoring pour le suivi des cours d'eau se développent rapidement en raison des menaces pesant sur la biodiversité aquatique et des besoins d'évaluation de leur état écologique. Dans le cas des grands cours d'eau et des communautés piscicoles, les limites des méthodes actuelles d'échantillonnage en termes de représentativité de la masse d'eau et de simplicité de réalisation amènent à proposer de nouvelles méthodes d'investigation. De ce point de vue, l'ADN environnemental (ADNe) apparaît comme une alternative prometteuse. La Compagnie Nationale du Rhône et le laboratoire SPYGEN ont testé cette méthode sur le Rhône (de Genève à la mer) en prélevant des échantillons d'eau sur 97 sites et en recourant au metabarcoding (selon le protocole proposé par Valentini et al. 2016, Mol. Ecol. 25(4): 929-942). Les listes d'espèces obtenues et leurs abondances relatives ont été comparées aux données issues des suivis par pêche électrique réalisés par l'Agence Française pour la Biodiversité (AFB) et Electricité de France (EDF). Les résultats démontrent l'efficacité de l'ADNe pour décrire les communautés piscicoles et pour rendre compte de la présence des espèces rares. La capacité intégrative du signal ADNe dans le temps et l'espace ainsi que la distance de détection des individus vers l'aval sont analysées.

### **ABSTRACT**

Biomonitoring is developing rapidly in watercourses due to threats affecting aquatic biodiversity and the need to assess their ecological status. In the case of large rivers and fish communities, the limitations of current sampling methods in terms of representativeness of the water body and simplicity of implementation lead to the search for new methods of investigation. In this context, eDNA appears as a promising alternative. The National Company of the Rhone and the SPYGEN laboratory tested this method on the Rhone (from Geneva to the sea) by taking water samples in 97 sites and using metabarcoding technics according to the protocol of Valentini et al. (2016, Mol Ecol 25 (4): 929-942). The list of detected species and their relative abundances were compared with the data obtained from electric fishing surveys carried out by the French Agency for Biodiversity (AFB) and Electricité de France (EDF). The results demonstrate the effectiveness of eDNA to describe the fish communities and highlight the presence of rare endangered species. The integrative capacity of eDNA signal in time and space and its detection distance downstream from the target species are discussed.

### **MOTS CLES**

ADN environnemental, communautés piscicoles, fleuve Rhône, grand cours d'eau, metabarcoding

## 1 INTRODUCTION

L'accroissement continu des impacts des activités humaines entraîne une altération profonde du fonctionnement des écosystèmes et en particulier des milieux aquatiques. Dans ce contexte, le maintien et le renforcement des réseaux de biosurveillance est nécessaire (évaluation de l'état écologique et des opérations de restauration dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau, suivi des espèces menacées et des altérations de la biodiversité...). Au sommet des chaînes trophiques et bien connues du public, les espèces piscicoles ont une place importante dans ces dispositifs. Dans les grands cours d'eau profonds, la pêche électrique est limitée aux zones rivulaires. Elle ne permet pas à elle seule un inventaire complet des peuplements et reste une méthode onéreuse. Dans ce contexte, le développement récent des techniques de détection de l'ADN environnemental (ADNe) est une opportunité pour renouveler les méthodes de suivi de la biodiversité piscicole et d'en accroître l'efficacité.

L'ADNe se réfère à l'ADN extrait à partir d'échantillons environnementaux sans isoler au préalable les organismes cibles (Taberlet 2012). Dans le cas des poissons, les volumes d'eau prélevés dans le milieu ne contiennent que de l'ADN extra-corporel provenant de cellules isolées ou de molécules d'ADN dégradé, le plus souvent adsorbées sur des particules. Le développement récent des méthodes de séquençage haut débit permet dorénavant l'analyse en parallèle de l'ensemble de l'ADNe d'un groupe taxonomique défini (metabarcoding) et de réaliser une évaluation environnementale de la diversité à moindre coût. Ces méthodes ont déjà fait la preuve de leur efficacité pour la détection d'espèces rares dans différents milieux aquatiques et pour différents groupes zoologiques. Pour ce faire, les auteurs ont recours à des comparaisons avec les méthodes d'échantillonnage traditionnelles. Récemment, Civade et al. (2016) l'ont testé avec succès dans des cours d'eau de petite taille et ont montré sa grande efficacité pour la description des richesses piscicoles. Différentes questions restent cependant posées :

- Peut-on confirmer dans les grands cours d'eau les résultats précédemment obtenus concernant l'estimation des richesses piscicoles ?
- Cette méthode permet-elle également de fournir une description des structures d'abondances et quelle en est la validité ?
- Quelle est la distance de détection de l'ADNe à l'aval de son lieu de production par les organismes ?
- Quelle stratégie d'échantillonnage employer ?

Enfin, peut-on envisager son usage à plus ou moins long terme dans les réseaux de surveillance et de suivi de la biodiversité ?

Une étude a été entreprise sur le Rhône par la Compagnie Nationale du Rhône et le laboratoire SPYGEN pour apporter des éléments de réponse à ces questions.

## 2 METHODE

Le Rhône a été échantillonné régulièrement du lac de Genève à la mer Méditerranée en avril et mai 2016. 59 prélèvements ont été effectués dans le chenal principal et dans les chenaux court-circuités des aménagements successifs. Des relevés complémentaires ont également été réalisés dans des îlots et dans les affluents principaux à proximité de leur confluence avec le fleuve. En fonction de la situation locale, les relevés ont été effectués à partir d'un bateau, depuis un pont ou à partir de la rive. Chaque prélèvement est constitué de deux filtrations tangentielles *in situ* (porosité 0.45 microns) de 50 litres d'eau chacune (2 x 30 minutes). Les opérations d'extraction de l'ADN, d'amplification et de séquençage ont suivi le protocole décrit dans Valentini et al. (2016) et une base de référence couvrant la quasi-totalité de la faune piscicole française permet d'obtenir une image des peuplements piscicoles. Ces résultats ont été comparés à un ensemble de relevés effectués par pêche électrique de 2006 à 2016 sur 40 sites distribués le long du fleuve (Agence Française pour la Biodiversité et Electricité de France).

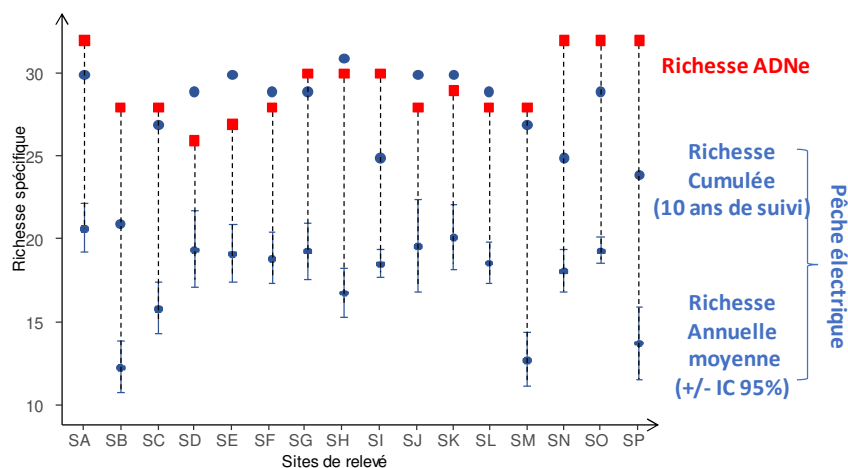
## 3 RESULTATS ET DISCUSSION

La comparaison des richesses spécifiques obtenues par pêche électrique et par la méthode ADNe montre que cette dernière détecte un plus grand nombre d'espèces en une seule opération (Figure ci-dessous). 83% à 100% des espèces présentes dans les pêches électriques sur la décennie sont détectées par ADNe. Cependant, certaines espèces détectées par ADNe ne correspondent pas à des présences réelles mais à des apports d'ADNe d'espèces consommées apportées au fleuve via les stations d'épuration, présence de pisciculture, etc

La propagation à l'aval de l'ADNe de Corégone, espèce caractéristique des lacs alpins (dont le Léman) montre que la distance de détection de l'ADNe est de l'ordre de plusieurs dizaines de km. En accord avec les lois régissant les transferts de la matière organique, cette distance est fortement dépendante de la taille du cours d'eau. Elle ne dépasse pas le kilomètre dans les petits cours d'eau.

La méthode ADNe fournit une bonne image des abondances relatives des espèces. Les plus gros écarts observés avec les abondances relatives obtenues par pêche électrique sont liés à une surestimation de certaines espèces rivulaires du fait d'un échantillonnage limité à la zone rivulaire en grand cours d'eau. L'organisation amont-aval du peuplement piscicole décrite par la méthode ADNe est significativement corrélée à celle fournie par les pêches électriques (analyse de co-inertie).

Des résultats relatifs à l'effort d'échantillonnage (nombre de filtrations nécessaires), à la sensibilité de la méthode à la variabilité intra-stationnelle et à l'autocorrélation spatiale entre relevés permettent de proposer une stratégie d'échantillonnage robuste.



Comparaison des richesses spécifiques obtenues par pêche électriques (en bleu) et par la méthode ADNe (en rouge) sur 16 tronçons du Rhône de longueur inférieure à 7 km. Le nombre d'espèces détectées par l'ADNe en une seule opération est très supérieure à celle d'une campagne annuelle de pêche électrique (ronds bleus). Par contre, la richesse obtenue lors de la seule campagne ADNe de 2016 est comparable à la richesse cumulée sur 10 ans de campagne par la méthode traditionnelle.

## 4 CONCLUSION

En conclusion, la méthode ADNe permet de décrire efficacement les patrons de distribution des espèces piscicoles et les structures des peuplements dans un grand fleuve comme le Rhône. Elle est plus adaptée à des approches large échelle (inter-stationnelle) que locales (inter-habitats). Elle ne permet pas l'analyse des structures de taille ou d'âge au sein d'une population. Son utilisation dans les réseaux de suivis de biodiversité est tout à fait envisageable. Les premiers résultats indiquent également sa potentialité pour une utilisation future dans les réseaux de biosurveillance et pour un bon rapport efficacité-coût. Ceci suppose au préalable des études de la sensibilité aux gradients de pressions anthropiques et la validation des évaluations de l'état écologique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Civade R., T. Dejean, A. Valentini, N. Roset, J-C. Raymond, A. Bonin, P. Taberlet and D. Pont (2016). Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0157366.
- Taberlet, P., E. Coissac, M. Hajibabaei and L. H. Rieseberg. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, 1789-1793.
- Valentini A., P. Taberlet, C. Miaud, R. Civade, J. Herder, P. F. Thomsen, E. Bellemain, A. Besnard, E. Coissac, F. Boyer, C. Gaboriaud, Pauline Jean, N. Poulet, N. Roset, G.H. Copp, P. Geniez, D. Pont, Christine Argillier, J-M. Baudoin, T. Peroux, A.J. Crivelli, A. Olivier, M. Acqueberge, M. Le Brun, P.R. Møller, E. Willerslev and T. Dejean, (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929-942, doi:10.1111/mec.13428.