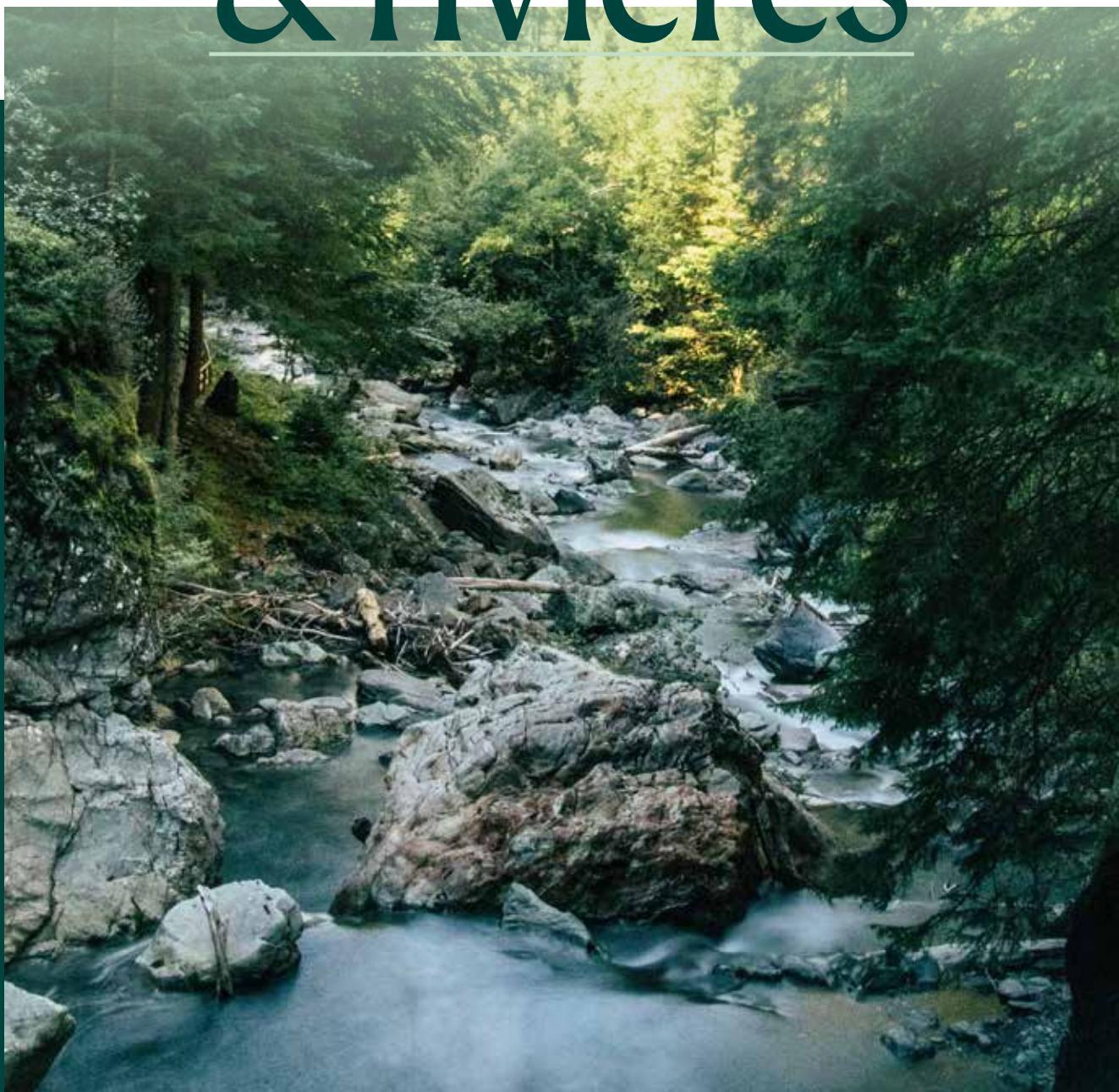


Fleuves & rivières





www.patrnat.fr



Centre d'expertise & de données sur la nature

Cette unité scientifique de l'OFB, du MNHN, du CNRS et de l'IRD regroupe des experts de la biodiversité et de la donnée ainsi que des coordinateurs de programmes nationaux.

Ce centre d'expertise et de données coordonne des programmes d'inventaire et de suivi des écosystèmes, des espèces et des aires protégées, contribue à répertorier les zones clefs pour la conservation de la nature, et produit des référentiels scientifiques et des standards de données. Ces programmes associent de nombreux partenaires nationaux et régionaux et fédèrent les citoyens à travers des observatoires de sciences participatives.

En tant que centre de données, PatriNat développe des systèmes d'information permettant d'organiser, diffuser et faire parler les données pour les politiques publiques (SIB, SINP) en coopération avec les infrastructures de recherche. L'ensemble des informations (de la donnée brute à la donnée de

synthèse) est rendu publique dans les portails du service public d'information sur la biodiversité. Des outils et services numériques complètent une offre pour les acteurs de la conservation de la nature.

En tant que centre d'expertise, PatriNat réalise des études fondées sur les informations fiables et pertinentes (publications, données, experts...) pour accompagner les politiques de biodiversité : indicateurs, chiffres clés, listes rouges, revues systématiques, rapports, avis scientifiques CITES, etc. PatriNat développe des méthodes et transfère des technologies innovantes pour accompagner les acteurs de la transition écologique.



Le portail des indicateurs et des informations sur des politiques de biodiversité



naturefrance.fr



Le portail dédié aux espèces, aux habitats, aux espaces naturels et au patrimoine géologique



www.inpn.fr



Le portail des indicateurs, des enjeux et des initiatives sur la biodiversité en Outre-mer



biodiversite-outre-mer.fr



www.vigilife.org



Notre mission

Mettre l'innovation au service de la connaissance et de la protection du vivant

Nos valeurs

Innovation, exigence, partage, engagement

Nos objectifs



Fédérer

Réunir des partenaires publics et privés engagés, afin de multiplier les sites d'observation et de permettre une large utilisation des données collectées.



Évaluer

Inventorier la biodiversité grâce à des méthodes ADNe standardisées et suivre ses changements sur le plus grand nombre d'écosystèmes à travers le monde.



Veiller

Prévenir le déclin des espèces les plus menacées de notre planète, et améliorer la détection précoce et le suivi des espèces exotiques envahissantes et des pathogènes, notamment au niveau des principales voies d'introduction.



Comprendre

Analyser et modéliser les données recueillies à l'échelle mondiale afin d'améliorer les connaissances sur la biodiversité et de mieux anticiper l'impact des changements globaux sur l'ensemble du vivant.



Innover

Poursuivre en permanence les travaux de recherche et développement afin de proposer des technologies toujours plus performantes, respectueuses de l'environnement et accessibles au plus grand nombre.



Orienter

Offrir à tous les décideurs des informations fiables et mises à jour, grâce à des indicateurs synthétiques et validés scientifiquement, afin de guider la mise en place d'actions de conservation, de restauration, ou de changement de pratiques.



Former

Décentraliser les moyens d'expertise ADNe, grâce à du transfert de compétences et de technologies, afin que chaque partenaire puisse traiter ses échantillons sur son territoire et que chaque pays reste souverain sur l'utilisation de ses ressources génétiques.



Sensibiliser

Accompagner les acteurs publics et privés pour une meilleure prise en compte de la biodiversité dans leurs activités et informer le grand public sur son importance et sa fragilité.



Valoriser

Mettre en valeur les bonnes pratiques et les actions inspirantes permettant de préserver le vivant, notamment celles menées par les populations autochtones.



Pérenniser

Doter Vigilife de moyens financiers pérennes lui permettant de poursuivre sa mission sur le long terme, grâce notamment à l'engagement du monde économique dans son fonctionnement.

Membres fondateurs



Préfaces



Vous avez en main le nouveau guide pratique sur l'usage de l'ADN environnemental dans les fleuves et les rivières.

C'est le fruit d'un remarquable travail collectif qui associe des chercheurs, des experts et des praticiens, et qui n'oublie pas les Outre-mer, territoires où cette technique d'inventaire pourrait grandement contribuer à améliorer les connaissances sur la biodiversité.

Il s'inscrit dans la collaboration, initiée en 2022, entre le consortium Vigilife et notre unité PatriNat (OFB, MNHN, CNRS, IRD), centre d'expertise et de données sur la biodiversité. Ce partenariat vise à rendre l'outil ADNe plus largement utilisable en routine dans les inventaires, suivis et évaluations de la biodiversité et à mieux partager les données dans les systèmes publics (ex. SINP), choisir les bonnes méthodes et structurer les référentiels.

Si on revient en arrière, en 2017, dans un rapport intitulé "Diagnostic et recommandations pour une stratégie d'acquisition de connaissances naturalistes" que nous avions coordonné, l'ADNe était abordé dans un chapitre qui portait sur le développement des "nouvelles méthodes". Un des constats était que la R&D sur l'ADNe était probante, notamment en milieux aquatiques, mais que l'approche restait très largement à transférer vers la sphère opérationnelle. Nous y préconisions d'"établir et publier des modes opératoires complets, associés à des formations".

Quelques années plus tard, la technique est encore plus performante dans les milieux d'eau douce, mais elle n'est pas encore utilisée en routine telles que le sont les approches d'observation plus traditionnelles. Ce guide vise donc à combler ce manque, en s'adressant aux acteurs francophones et à une communauté large : naturalistes, acteurs de la conservation de la nature, gestionnaires d'espaces naturels, chercheurs, acteurs privés, etc.

Enfin, et cela est clairement explicité dans ce guide, il est essentiel de ne pas opposer les approches traditionnelles et celles plus technologiques telles que l'ADNe, ou encore l'éco-acoustique, pour l'inventaire et le suivi de la biodiversité. L'expertise naturaliste et la connaissance fine des niches écologiques des espèces restent des savoir-faire centraux dans la mise en œuvre de toutes les méthodes d'inventaires, que ces dernières soient basées sur l'observation directe ou qu'elles requièrent la mise

en œuvre d'une chaîne technique ou technologique spécifique. Le choix de la méthode la plus appropriée doit être effectué selon les contextes, les groupes taxonomiques et les milieux visés, les types de données à collecter (ex. présence, abondance, structure de tailles, etc.) et les moyens disponibles, tant humains que budgétaires. Ainsi, dans la majorité des contextes, les approches traditionnelles et les nouvelles technologies sont complémentaires et non substituables. Enfin, quelles que soient les méthodologies et techniques déployées, une solide expertise naturaliste reste nécessaire pour valoriser pleinement les données en interprétant avec justesse les résultats.

Julien Touroult & Laurent Poncet

Co-directeurs

PatriNat (OFB, MNHN, CNRS, IRD), Centre d'expertise et de données sur la Nature



La connaissance, la préservation et la restauration des milieux aquatiques d'eau douce et des zones humides sont des enjeux majeurs à l'échelle locale et mondiale. La dégradation de ces milieux est alarmante : les populations de poissons d'eau douce ont diminué de 86 % depuis les années 1970, et 35 % des zones humides ont disparu entre 1970 et 2015.

Les fleuves et rivières représentent seulement 0,5 % de l'eau douce mondiale mais abritent près de 10 % de la biodiversité. Ils fournissent de l'eau potable à plus de 2 milliards de personnes et contribuent au tiers de l'alimentation humaine, tandis que les zones humides contribuent à 15 % de la production alimentaire mondiale. Ces milieux sont également vitaux pour la régulation des crues et des étiages, ainsi que pour l'absorption et le stockage du carbone.

Ces chiffres soulignent l'urgence de prendre des mesures pour inventorier, protéger et restaurer ces écosystèmes vitaux, et d'en assurer le suivi à long terme. Cependant, il n'existe actuellement aucun suivi à long terme de l'évolution de la biodiversité intégrale des cours d'eau ni sur leur continuum ni sur l'ensemble de leur bassin versant. Le constat est

similaire pour les zones humides. En France, des réseaux de suivi de la qualité des écosystèmes aquatiques existent, mais ils ne prennent pas en compte toute la biodiversité potentiellement présente.

Le fleuve Rhône est un exemple particulièrement intéressant en raison de son cours long de 812 km, s'écoulant depuis les Alpes suisses jusqu'à la Méditerranée et traversant une grande diversité de zones bioclimatiques. Ce fleuve, parmi les plus puissants d'Europe de l'Ouest par son débit, est aussi la seconde source d'apports liquides et sédimentaires à la Méditerranée après le Nil. Bien que figurant parmi les fleuves les plus anthropisés au monde, il abrite encore une diversité écologique riche mais soumise à de nombreuses pressions.

La Compagnie Nationale du Rhône (CNR) est concessionnaire du fleuve Rhône depuis 1934 jusqu'en 2041 avec trois missions historiques : hydroélectricité, navigation fluviale et irrigation qui doivent se déployer tout en respectant les enjeux environnementaux, tant naturels qu'humains, le long du fleuve. Afin d'assurer le suivi de ses activités de concessionnaire, CNR est engagée depuis plusieurs décennies, avec l'appui de scientifiques, de bureaux d'études, d'ONG, de l'Agence de l'Eau et sous la tutelle des services de l'Etat, dans des programmes de suivis environnementaux des aménagements construits et des actions de restauration écologiques du fleuve et de ses annexes.

Dans le cadre de leur veille technologique, les écologues de CNR ont identifié l'ADNe comme une technique à très fort potentiel. En 2013, la première utilisation de l'ADNe par CNR a permis de tester ce nouvel outil pour un suivi de mares créées sur le secteur de Donzère-Mondragon.

Fort de ces premiers résultats encourageants en eaux closes, un partenariat entre CNR et SPYGEN a permis de mettre en œuvre dès 2016 un suivi des poissons et des bivalves sur l'intégralité du cours du Rhône en aval du Léman jusqu'à la Méditerranée. Cette première mondiale a permis d'échantillonner une centaine de sites représentatifs des différents faciès du fleuve (canaux, retenues, Vieux-Rhône, affluents, annexes fluviales, etc.) et a démontré que l'ADNe est utilisable dans les grands cours d'eau.

CNR a ensuite rejoint l'Alliance Vigilife comme un des membres fondateurs, dans le but de contribuer au déploiement à grande échelle de ces technologies de suivi de la biodiversité.

Dans le cadre du programme Vigilife « Fleuves et Rivières Sentinelles », le projet « Rhône Fleuve Sentinel » est en cours de déploiement avec la mise en place d'un réseau de suivi intégral de la biodiversité par ADNe sur 15 stations entre la sortie du glacier du Rhône et ses embouchures à la mer. Ce démonstrateur vise à structurer un projet plus ambitieux qui pourrait couvrir un nombre de stations de suivi ADNe beaucoup plus important, tant sur le fleuve que sur ses affluents. Il permettra aussi de faire émerger les partenariats institutionnels, techniques, scientifiques et financiers nécessaires à son déploiement à long terme.

L'ADNe est donc un outil supplémentaire pour le suivi du vivant, déployable dans le cadre de suivis ponctuels comme à long terme, permettant de suivre l'évolution temporelle et géographique de la biodiversité de manière rapide et non intrusive. Cette technologie récente connaît des développements techniques, informatiques et méthodologiques rapides. Complémentaires aux techniques d'inventaires classiques, ces outils laissent prévoir des évolutions permettant des actions de grande ampleur dans les prochaines années, tant pour les scientifiques que pour les gestionnaires.

CNR gère un domaine foncier terrestre et aquatique de plus de 30 000 ha sur 550 km de fleuve. L'ampleur de ce territoire nécessite des outils de suivi à la hauteur des enjeux. Des outils tels que l'ADNe apportent des réponses concrètes pour la connaissance et le suivi des effets des pressions et des actions de restauration actuelles et futures.

Le Guide d'utilisation de l'ADN environnemental dans les fleuves et les rivières constitue une synthèse précieuse des connaissances sur ce domaine et permettra une large appropriation du sujet par toutes les parties prenantes souhaitant s'impliquer dans la connaissance et la préservation du vivant.

Franck Pressiat

Responsable du Département Environnement
Direction de l'Ingénierie de la Compagnie Nationale du Rhône
(CNR)

Auteurs :
Caroline Giraud (SPYGEN), Vincent Prié (SPYGEN, MNHN), Sébastien Brosse (Université de Toulouse), Nicolas Poulet (OFB), Mathieu Rocle (CNR), Alice Valentini (SPYGEN), Aurélie Lacoeuilhe (PatriNat)

Date de parution :
XX

Comment citer le document :
Giraud Caroline, Prié Vincent, Brosse Sébastien, Poulet Nicolas, Rocle Mathieu, Valentini Alice et Lacoeuilhe Aurélie. 2025. Guide d'utilisation de l'ADN environnemental dans les fleuves et les rivières. Inventaires et suivis par ADNe pour la connaissance de la biodiversité. XXp.

Direction artistique :
Here we com
www.herewecom.fr

Nous remercions les relecteurs de ce document :

PatriNat :
Laurent Poncet, Rémy Poncet et Julien Touroult.

Vigilife :
Benjamin Allegri, Albane Loiseau, David Mouillot, Baptiste Mulot et Franck Pressiat.

OFB :
Eddy Cosson.

Nous remercions l'ensemble des experts et expertes ayant accepté d'intervenir dans ce guide :
Thomas Baudry, Aurélien Besnard, Sylvain Besson, Michaël Cagnant, Pierre Campton, Opale Coutant, Carine Delaunay, Gaël Denys, Agnès Dettai, Jordi Gil, Frédéric Grandjean, Vincent Hay, Audrey Postic-Puivif, Franck Pressiat, Valentin Vasselon et Héloïse Verdier.

Ce guide, co-édité par l'Alliance Vigilife et par l'unité d'appui et de recherche PatriNat (centre d'expertise et de données sur le patrimoine naturel), a été financé par PatriNat.



.14

PARTIE 01.

Comprendre l'ADNe 15

Chapitre 1 : Contexte général 16

Bref aperçu non exhaustif des méthodes traditionnelles de recensement de la biodiversité 16

Émergence et applications de l'ADN environnemental 18

Chapitre 2 : Définition, écologie et détectabilité de l'ADNe 22

Définition et écologie de l'ADNe : composition, origine, transport et dégradation 22

Optimiser la détection de l'ADNe rare 24



.04

Préfaces 04

Résumé 08

Introduction 10

.26

PARTIE 02.

Aquérir des données issues de l'ADNe 27

Chapitre 3 : Concevoir un projet 28

Définir l'objectif de l'étude 28

Identifier les acteurs à mobiliser 29

Anticiper les ressources budgétaires et les délais à allouer 30

Élaborer une stratégie d'échantillonnage 30

Chapitre 4 : Analyses laboratoire et bioinformatique 40

Extraction de l'ADN 41

Détection d'une espèce cible par approche spécifique 42

Approche multispécifique ou metabarcoding de l'ADNe 46

Chapitre 5 : Limites et avantages de l'ADNe 50

Limites 50

Avantages 52

Chapitre 6 : Le cycle de la donnée ADNe 54

Définitions 54

Conserver, diffuser et utiliser les données 57



.72

Conclusions & perspectives 73

Conclusions 74

Perspectives 75

Glossaire 78

Bibliographie 79



.58

PARTIE 03.

Interpréter les données obtenues et agir dans les territoires 59

Chapitre 7 : Quelques exemples d'applications et d'interprétations 60

Chapitre 8 : Mise en place d'actions concrètes en faveur de la biodiversité 66

Résumé



Ce guide vise à fournir une synthèse des méthodes couramment utilisées en matière d'inventaire et de suivi de la biodiversité des fleuves et des rivières par utilisation de l'ADN environnemental (ADNe). Il offre des recommandations pour accompagner les utilisateurs à choisir les approches les plus adaptées à leurs objectifs et contextes spécifiques. Il est prévu de le mettre à jour régulièrement, au gré des améliorations technologiques et des avancées de la recherche scientifique qui, compte tenu de l'importance croissante de l'analyse de l'ADNe dans les études de biodiversité, sont susceptibles d'être nombreuses dans les années à venir.

Comprendre l'ADNe

Contexte général

Les méthodes traditionnelles de recensement de la biodiversité se répartissent en trois catégories : les observations directes ou indirectes, les captures et l'analyse des ondes acoustiques. Au-delà de la réalisation d'inventaires et de suivis des espèces, ces approches permettent de recueillir des informations biologiques essentielles telles que l'âge, le sexe, la taille et l'abondance des organismes. Cependant, leur efficacité varie selon les conditions environnementales et les taxons étudiés, et certaines de ces méthodes peuvent s'avérer, dans certains cas, invasives pour les écosystèmes. Depuis 2008^a, l'analyse de l'ADN environnemental, ou ADNe, s'impose comme une approche complémentaire et efficace permettant de détecter les espèces présentes grâce aux fragments d'ADN extraits et amplifiés à partir de leur environnement. Cette méthode novatrice et non invasive a notamment démontré son efficacité pour la détection d'espèces clés (ex. protégées, exotiques envahissantes, etc.), cryptiques ou invisibles à l'œil nu.

Définition et écologie de l'ADNe

L'ADNe est défini comme l'ADN pouvant être extrait à partir d'échantillons environnementaux sans nécessiter d'isoler, au préalable, les organismes ciblés^b. Il provient de diverses sources, incluant des microorganismes unicellulaires, des organismes pluricellulaires de petite taille et des résidus biologiques d'espèces plus grandes. Sa production et sa persistance en milieu aquatique varient selon des facteurs biotiques (ex. espèce, métabolisme, stress, etc.) et abiotiques (ex. température, pH, rayons UV,

etc.) mais aussi selon des phénomènes de transport, de sédimentation et de dégradation qui sont influencés par les caractéristiques hydrauliques des cours d'eau^c. La détectabilité des espèces dépend de la probabilité de prélever leur ADN dans le milieu, de la conservation de cet ADN tout au long du processus analytique et de l'absence de contamination des échantillons considérés. Ainsi, lorsque l'objectif de l'utilisateur est d'obtenir une liste d'espèces la plus exhaustive possible tout en limitant les risques de faux-négatifs et de faux-positifs, il est nécessaire de choisir des méthodes d'échantillonnage et d'analyse respectant les plus hauts niveaux de précaution possibles.

Acquérir des données issues d'ADNe

Concevoir un projet

La conception d'un projet basé sur l'analyse de l'ADNe consiste à :

- Définir l'objectif de l'étude en identifiant les questions posées par l'utilisateur ainsi que les taxons et les zones géographiques ciblés.
- Identifier le commanditaire de l'étude, l'échantilleur, le gestionnaire de données ainsi que les experts technologiques et écologiques.
- Anticiper les ressources financières et les délais à allouer en dialoguant avec les experts identifiés.
- Élaborer une stratégie d'échantillonnage optimale en choisissant une méthode adaptée aux objectifs visés ainsi que le nombre d'échantillons à prélever et leur répartition spatio-temporelle, tout en respectant les réglementations en vigueur.

Analyser au laboratoire

L'ADN contenu dans les échantillons environnementaux est d'abord extrait puis, selon les besoins de l'utilisateur, analysé par approche spécifique ou multispécifique (aussi appelée metabarcoding de l'ADNe)^d. L'approche spécifique consiste à révéler la présence d'une espèce d'intérêt par détection d'une séquence précise de son ADN. En effet, si cette séquence, aussi appelée marqueur génétique, est présente dans l'échantillon, elle peut être ciblée grâce à des amores, consistant en de courtes séquences synthétiques d'ADN, puis amplifiée par polymérisation en chaîne (PCR) ou méthode dérivée (PCR quantitative ou digitale). Inversement, l'approche multispécifique permet l'identification simultanée et sans a priori de plusieurs espèces distinctes

appartenant à un même groupe taxonomique. Pour cela l'ADN extrait est d'abord amplifié par PCR en utilisant des amores universelles. Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite séquencés et les résultats de séquençage sont analysés par méthodes bioinformatiques. Lors de cette dernière étape, les séquences détectées sont assignées taxonomiquement en les comparant à des bases de références génétiques. Dans le cadre de la réalisation d'inventaires et de suivis de biodiversité, il est recommandé que les échantillons récoltés soient analysés en respectant des niveaux de précaution stricts.

Limites et avantages

Limites	Avantages
- Production potentielle de faux-positifs et de faux-négatifs, particulièrement lorsque les niveaux de précaution ne sont pas respectés	- Méthode non invasive
- Pas d'identification d'espèces hybrides ou d'occurrences d'introgressions génétiques	- Étude de tous les règnes du vivant à partir d'un même échantillon
- Pas d'informations individuelles ni de quantification de l'abondance absolue des espèces détectées	- Détection d'organismes difficilement observables par les méthodes classiques (faible densité, invisibles à l'œil nu, stades larvaires, etc.)
- Étude limitée des espèces consommées, élevées, génétiquement proches ou pour lesquelles les bases de références génétiques sont incomplètes	- Détection précoce d'espèces (ex. espèces exotiques envahissantes)
- Délais d'obtention des résultats plus longs par rapport aux méthodes traditionnelles	- Facilité de mise en oeuvre sur le terrain
- Production de déchets (utilisation de matériel à usage unique)	- Réduction des biais liés aux conditions de terrain défavorables, à l'expérience de l'observateur et à la variabilité des efforts de prospection
	- Possibilité de prospection de zones protégées, dangereuses ou polluées
	- Possibilité de gain de temps lors des échantillonnages et donc un ratio coûts/rendements favorable

Cycle de la donnée ADNe

Les différentes étapes d'échantillonnage et d'analyse de l'ADNe impliquent qu'il existe différents types de données issues d'ADNe. Elles englobent les données physiques (échantillons prélevés et extraits ADN) et les données numériques (données brutes issues du séquençage, données interprétées et données validées). Plusieurs informations sont susceptibles d'être rattachées à l'ensemble de ces données. Ce guide propose des pistes de réflexion quant aux informations à collecter et aiguille l'utilisateur pour définir la propriété des données ainsi que pour anticiper leur lieu et temps de stockage. Les différentes plateformes de mise à disposition des données en France et à l'international sont également présentées.

Interpréter les données obtenues et agir dans les territoires

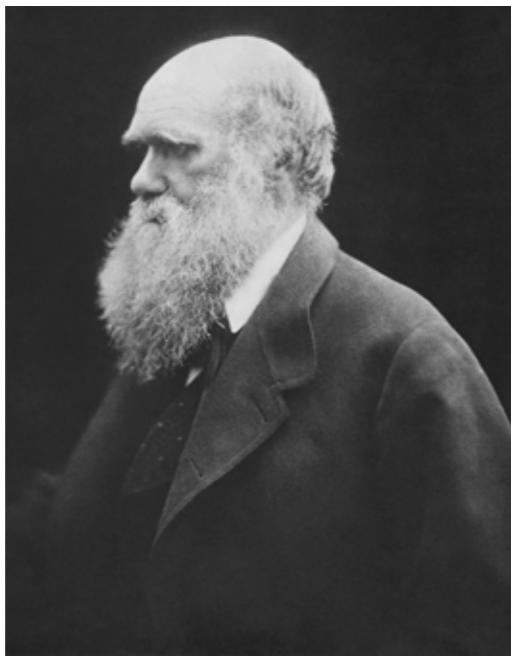
Des témoignages d'experts montrent comment l'interprétation des données issues de l'analyse de l'ADNe peut conduire à l'analyse d'espèces clés (ex. grands migrateurs, espèces exotiques envahissantes), de milieux riches en biodiversité ("hotspots") et à l'étude d'impacts anthropiques. Des acteurs de la biodiversité présentent également comment l'ADNe a pu être un atout pour la gestion et la conservation d'espèces cibles et pour le suivi de populations.

Bibliographie

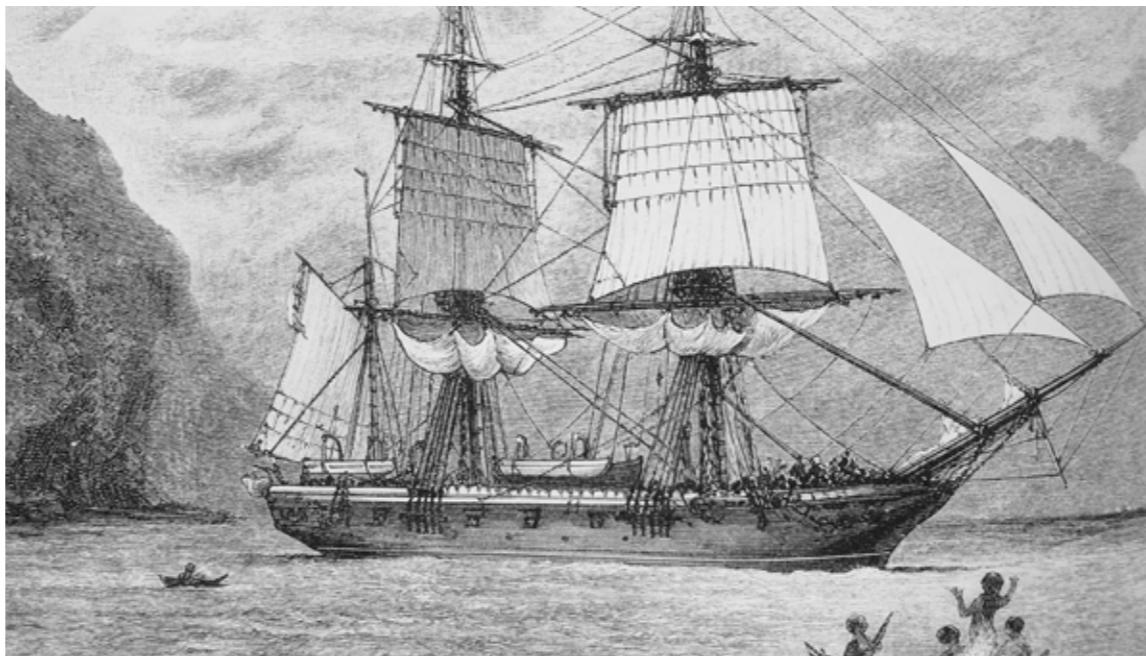
- a. Ficetola et al. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- b. Taberlet et al. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- c. Barnes & Turner. 2015. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- d. Bruce et al. 2021. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. *Pensoft*. <https://doi.org/10.3897/ab.e68634>

Introduction

Les frégates l'Astrolabe et la Boussole au mouillage devant l'île de Maui



Charles Darwin



Le Beagle dans le détroit de Magella

Pour faire face à l'ampleur et à la rapidité de l'érosion de la biodiversité, il est nécessaire de mobiliser toutes les techniques efficaces disponibles pour l'inventaire, le suivi et la prise en compte du monde vivant. Afin de répondre à ce défi global, une méthode d'inventaire innovante et non invasive, basée sur l'analyse de l'ADN environnemental (ADNe), est désormais accessible à tous les acteurs de la biodiversité. Grâce à cette approche performante et facilement déployable sur le terrain, il devient possible d'étudier l'ensemble des règnes du vivant - des bactéries aux grands mammifères - à partir de prélèvements environnementaux (ex. eau, sol, etc.), et d'améliorer le suivi d'espèces clés (ex. patrimoniales, menacées, exotiques envahissantes, etc.), cryptiques ou invisibles à l'œil nu. Les fleuves et les rivières, qui abritent une grande diversité d'espèces et d'habitats, se révèlent particulièrement propices au déploiement de cette technologie. En effet, bien que les méthodes dites "traditionnelles" d'inventaires et de suivi de la biodiversité permettent de récolter des informations individuelles importantes (ex. âge, taille, sexe, etc.) et restent pertinentes pour l'analyse de la biodiversité, elles présentent certaines limites, notamment pour l'étude d'espèces rares ou morphologiquement proches, et peuvent être inapplicables dans certains types de milieux, voire invasives pour les écosystèmes.

Depuis sa première application en biologie de la conservation en 2008, l'analyse de l'ADNe a été déployée dans une grande variété de milieux, pour étudier des organismes appartenant à divers groupes taxonomiques et pour répondre à des objectifs variés. Cette expansion a conduit au développement de nombreuses méthodes à chaque étape du processus, de l'échantillonnage à l'analyse des résultats. Cependant, toutes ces méthodes ne conviennent pas à tous les contextes ni à toutes les finalités. Face aux grands enjeux environnementaux actuels (ex. changements climatiques, pollutions, érosion de la biodiversité, invasions biologiques, etc.), des actions coordonnées à toutes les échelles et sur le long terme sont indispensables pour mutualiser efficacement les données collectées dans le temps et l'espace. Ceci est notamment l'objectif du présent document qui vise à accompagner les utilisateurs dans leurs choix méthodologiques, de l'acquisition des données issues de l'ADN jusqu'à leur interprétation, pour accompagner la mise en place d'actions concrètes (ex. gestion, conservation, etc.) favorables à la biodiversité dans les territoires.

Introduction

« A-t-on des nouvelles de monsieur de La Pérouse ? » C'est l'une des dernières questions qu'aurait posées Louis XVI avant de monter sur l'échafaud. Jean François de Galaup, comte de La Pérouse, commande à partir de 1785 les deux navires, la Boussole et l'Astrolabe, partis en expédition pour explorer l'océan Pacifique. Au XVIII^e siècle, ce type d'expédition scientifique avait un caractère encyclopédique, recouvrant bien sûr la géographie, mais également l'anthropologie et la biologie, avec comme objectif d'enrichir les collections muséologiques. Parmi les scientifiques présents à bord de la Boussole et de l'Astrolabe, un mathématicien, un astronome, un météorologue et... trois naturalistes. De la même manière, l'expédition aux Antilles de 1796 – 1798, commandée par Nicolas Baudin à bord de la Belle Angélique, comportait un botaniste, un jardinier et deux zoologistes. Leur mission : inventorier les terres lointaines, enrichir les collections des musées à Paris et tenter de rapporter des plantes vivantes en vue de leur acclimatation. La formidable exploration de l'Amazone menée par le naturaliste brésilien Alexandre Rodrigues Ferreira (40 000 km parcourus de 1783 à 1792) avait également pour but de décrire la faune et la flore de l'intérieur du pays. De nombreux spécimens ont été rapportés de cette expédition, plantes et animaux, d'abord à Lisbonne, puis à Paris (comme butin de guerre). Beaucoup d'espèces amazoniennes ont été décrites à partir de ce matériel, étudié notamment par Georges Cuvier et Jean-Baptiste de Lamarck, parmi lesquelles le Pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) ou le Dauphin de l'Amazone *Inia geoffrensis* (Blainville, 1817). Plus célèbre encore, le voyage du Beagle entre 1831 et 1835 poursuivait, un demi-siècle plus tard, les mêmes objectifs scientifiques, avec à son bord un jeune naturaliste de 22 ans du nom de Charles Darwin. On l'aura deviné, les moyens employés pour observer et décrire la faune et la flore de ces contrées lointaines sont alors ceux des chasseurs-cueilleurs. Les inventaires naturalistes se font essentiellement au fusil, au filet et à la serpette.

Aujourd'hui, les expéditions scientifiques poursuivent les mêmes buts en matière d'amélioration des connaissances sur la biodiversité à travers le monde : inventorier le vivant. Et plus, dans le contexte de la sixième extinction massive de la biodiversité, inventorier le vivant avant qu'il ne disparaisse. C'est l'objectif notamment des grandes expéditions du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) à Paris, regroupées sous le programme La planète revisitée : "Les naturalistes ont décris à ce jour 2,1 millions d'espèces. Il en reste

sans doute 8 à 30 millions à déchiffrer ! Ajoutez à l'équation que beaucoup sont en voie d'extinction : le quart, voire la moitié, pourrait disparaître d'ici le milieu ou la fin du siècle". Les moyens mis en œuvre sont colossaux : des centaines de scientifiques, marins, plongeurs, cordistes, spéléologues, etc. et des innovations comme l'arboglissoir ou le radeau des cimes.

Les naturalistes ont, au fil du temps, mis en œuvre des moyens de collecte plus massifs, tels que la dynamite pour inventorier les poissons récifaux. "Un acte de vandalisme" comme le qualifiait le commandant Cousteau, "mais c'est la seule méthode qui permette de faire le recensement de toutes les espèces vivantes". Concernant les poissons d'eau douce, l'inventaire et le suivi à l'aide de la roténone ont été pratiqués jusqu'à très récemment. La roténone est un composé chimique présent dans certaines plantes qui produit un stress oxydatif chez les poissons. Déversée directement dans l'eau de la rivière, elle tue les poissons sur quelques dizaines de mètres. Utilisée traditionnellement depuis 2000 ans en Amazonie, Afrique équatoriale et Asie du Sud-Est pour la pêche de subsistance, cette méthode a également été utilisée par les scientifiques pour l'inventaire et le suivi de l'ichtyofaune. Interdite dans toute l'Union Européenne depuis 2008, des dérogations pour l'utilisation de la roténone dans le cadre d'études scientifiques ont été délivrées jusqu'en 2015 en Guyane, où la conductivité des eaux est très faible et rend la pêche scientifique à l'électricité difficile à mettre en œuvre. Elle est toujours utilisée aujourd'hui dans le cadre du suivi de certaines pêcheries, par exemple en Namibie. Compte-tenu de la toxicité de la roténone sur l'ensemble de l'écosystème, les naturalistes lui préfèrent aujourd'hui la pêche scientifique à l'électricité. Elle est devenue au milieu du XX^e siècle un moyen standard d'étude des poissons, moins létale que la roténone puisque, dans la plupart des cas, les poissons capturés et étudiés sont relâchés vivants dans le milieu naturel. Le recours à des engins de pêche (ex. filets, verveux, nasses, etc.) est aussi une approche performante notamment en grands cours d'eau mais peut aussi générer une certaine létalité.

Pour de nombreux groupes d'invertébrés, l'inventaire nécessite la mise à mort des spécimens, que ce soit pour la description ou pour l'identification, même dans un contexte de suivi. En 1982, Terry L. Erwin publie une étude révolutionnant les estimations de la biodiversité mondiale en arthropodes. Sa méthode ? Le « fogging insecticide », qui

"L'essentiel de la biodiversité fait moins de 5 mm."

consiste à pulvériser un produit insecticide à haute dose dans les arbres de la forêt tropicale pour collecter tous les spécimens présents sur chaque arbre. De nombreuses espèces d'insectes non décrites ont ainsi été découvertes en Amazonie et ailleurs, remettant en question les estimations du nombre d'espèces sur terre. En milieu marin, les animaux récifaux de petite taille sont collectés à l'aide d'une suceuse, sorte d'aspirateur subaquatique qui permet de collecter tous les organismes sur une surface donnée. L'évaluation de l'état écologique des cours d'eau mise en œuvre pour la surveillance des milieux aquatiques dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) s'appuie, entre autre, sur le calcul d'un indice basé sur les communautés d'invertébrés benthiques (Indice Biologique Globale Normalisé - IBGN - puis l'Indice Invertébrés MultiMétriques - I2M2). Actuellement, l'échantillonnage consiste, chaque année sur chaque station de suivi, en une série de prélèvements des invertébrés benthiques lesquels sont stockés dans l'alcool et identifiés au laboratoire

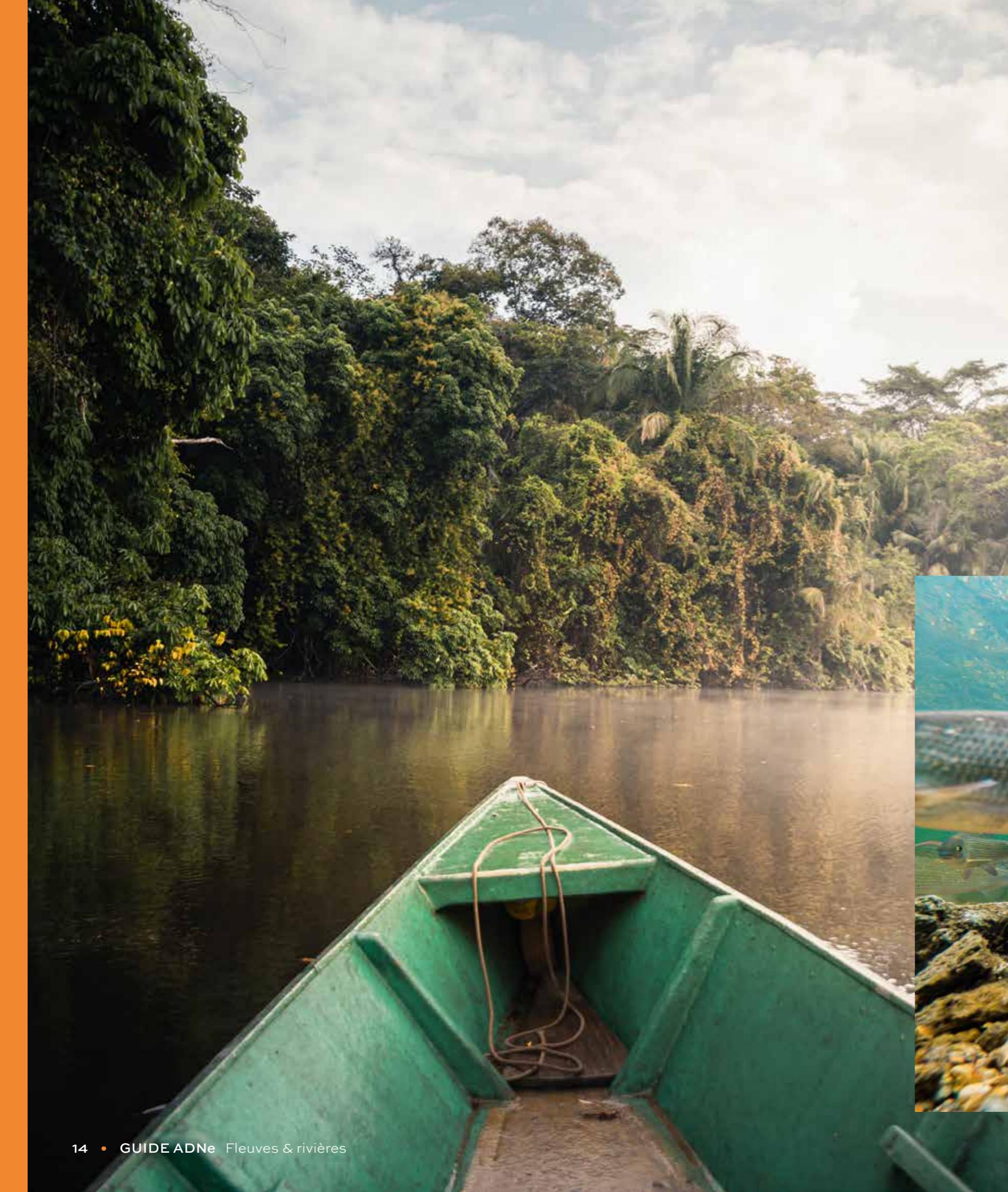
sous la loupe binoculaire. Un marché annuel de plusieurs millions d'euros en France.

Il existe finalement peu de méthodes non vulnérantes et non invasives, pour l'inventaire de la biodiversité. Les ornithologues travaillent beaucoup à la vue et à l'oreille. Des corollaires technologiques, comme les pièges photos et les enregistreurs automatiques (y compris d'ultra-sons ou d'infra-sons) permettent d'optimiser les inventaires non vulnérants et non invasifs. Ces méthodes sont largement utilisées pour l'inventaire et le suivi des oiseaux et des grands mammifères ainsi que des chauves-souris. Cependant, toutes ces technologies non-invasives ont leurs limites quand on parle de l'inventaire des insectes, des micro-mollusques ou des acariens. Et que dire des diatomées ou des procaryotes. L'étude de ces microorganismes a nécessité le développement de méthodes moléculaires permettant de les identifier sans avoir à les cultiver. Ce sont peu ou prou ces mêmes approches, basées sur l'extraction et l'analyse de l'ADN, qui sont aujourd'hui utilisées pour explorer la biodiversité via l'ADN environnemental.



PARTIE 01.

Comprendre l'ADNe



CHAPITRE 01.

Contexte général

Bref aperçu non exhaustif des méthodes traditionnelles de recensement de la biodiversité

De manière générale, indépendamment du type de milieu considéré, les méthodes traditionnelles de recensement de la biodiversité se répartissent en trois catégories : les recensements visuels directs ou indirects, les captures et l'analyse des ondes acoustiques.

Les recensements visuels reposent sur des observations directes ou indirectes (ex. traces) réalisées *in situ* ou *ex situ*, à l'œil nu ou à l'aide d'outils numériques tels que la vidéo, la photographie ou l'imagerie aéroportée ou satellitaire. Pour de nombreux taxons, elles fournissent des informations essentielles sur les individus (ex. classe d'âge, taille, abondance, etc.) et les populations (ex. nombre d'individus, composition, etc.). Cependant, leur efficacité varie en fonction du taxon étudié et est influencée par des facteurs biologiques et comportementaux propres aux espèces cibles (ex. détection, comportements d'évitement, etc.) ainsi que par les conditions environnementales (ex. visibilité réduite lorsque l'eau est turbide) ou les spécificités de la zone d'étude (ex. zones dangereuses inaccessibles pour un agent de terrain). Par ailleurs, certains



dispositifs, comme les pièges photographiques, nécessitent un important traitement des données, ce qui peut constituer un frein dans certains cas. Enfin, le niveau d'expertise de l'observateur joue souvent un rôle clé dans la précision des données recueillies.

Les méthodes par capture consistent à prélever les organismes directement dans leur milieu de vie afin de les identifier et de les dénombrer. Elles englobent diverses techniques, notamment des méthodes de pêche (ex. pêche à la ligne, dragage, pêche scientifique à l'électricité, etc.) et de piégeage (ex. nasses, piégeage de micromammifères, pièges lumineux, etc.), ainsi que l'utilisation de produits chimiques pouvant être léthaux (ex. roténone pour les poissons, éther acétique pour les insectes, etc.) ou anesthésiants (ex. eugénol, tricaine, benzocaine, etc.). Ces approches permettent de recueillir des échantillons biologiques et des données utiles concernant la taille, l'âge, le sexe, l'état de santé et l'abondance des espèces. Cependant, leur mise en œuvre peut être complexe, voire impossible, selon les caractéristiques des organismes cibles, du milieu d'intérêt ou la réglementation en vigueur. Par exemple, la pêche scientifique à l'électricité ne peut pas être déployée dans les milieux profonds à forte salinité ou dans des eaux à faible conductivité. Enfin, certaines de ces méthodes peuvent être dommageables pour les écosystèmes et les individus (ex. stress voire mise à mort dans certains cas).

L'utilisation des méthodes fondées sur l'acoustique s'est développée en complémentarité des précédentes. Elles comprennent notamment l'échosondage (qui repose sur la réflexion des ondes acoustiques) et la bioacoustique (écoute passive des ondes sonores émises par les organismes). Ce groupe de méthodes peut fournir des informations sur l'abondance, le comportement des organismes et l'aire de répartition des individus, tout en prenant en compte des espèces difficiles à étudier par les captures ou les observations visuelles. Cependant, la discrimination des espèces peut être complexe.



Piège photo

© Unsplash



Pêche scientifique à l'électricité

© Université de Toulouse



Tente Malaise

© MNHN - Aurélie Lacoeulhe



Roténone

© Université de Toulouse

CHAPITRE 01.

Émergence et applications de l'ADN environnemental

En 1987, le terme ADN environnemental (ADNe) est employé pour la première fois pour désigner l'ADN microbien extrait à partir d'échantillons de sédiments^[1]. Son utilisation reste restreinte à la microbiologie, jusqu'en 2008 lorsqu'une équipe du Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA, Unité Mixte de Recherche du CNRS, de l'Université de Grenoble et de l'Université Savoie Mont-Blanc) parvient à détecter la présence d'une espèce invasive, la grenouille taureau *Aquarana catesbeiana*, dans des plans d'eau français grâce à la détection de traces de son ADN laissées dans l'environnement^[2]. Cette étude pionnière marque un tournant pour les méthodes fondées sur l'analyse de l'ADNe dont le champ d'applications s'élargit à la biologie de la conservation^[3]. Depuis 2008, l'analyse de

l'ADNe en milieu aquatique a ainsi démontré son efficacité pour la détection des espèces et s'inscrit comme une méthode de recensement complémentaire aux méthodes traditionnelles permettant de réaliser des inventaires et des suivis de biodiversité. En milieu aquatique, la méthode consiste à extraire l'ADN collecté dans un échantillon d'eau puis à identifier les espèces à partir des fragments d'ADN obtenus. Pour cela, deux approches peuvent être employées : l'approche spécifique permettant de détecter une espèce cible ou l'approche multispécifique, aussi appelée metabarcoding de l'ADNe, permettant l'identification simultanée et sans a priori de plusieurs espèces différentes appartenant à un même rang taxonomique.



L'ADNe pour détecter des espèces cibles
Détection précoce d'espèces pathogènes, invasives, parasites, etc. Mise en évidence d'espèces menacées, patrimoniales, etc.



01 MÉTHODES PAR CAPTURE

- Pêches, pièges, produits chimiques, etc.
- Applicable précisément à une espèce cible
 - Applicable précisément à un groupe taxonomique cible
 - Applicable simultanément à tous les règnes du vivant
 - Fournit des données sur l'abondance des espèces
 - Fournit des informations individuelles
 - Évite de sacrifier les individus
 - Préserve la tranquillité des écosystèmes

02 RECENSEMENTS VISUELS ET HYDROACOUSTIQUES

- Observations directes, photographies, vidéos, bioacoustique, etc.
- Applicable précisément à une espèce cible
 - Applicable précisément à un groupe taxonomique cible
 - Applicable simultanément à tous les règnes du vivant
 - Fournit des données sur l'abondance des espèces
 - Fournit des informations individuelles
 - Évite de sacrifier les individus
 - Préserve la tranquillité des écosystèmes

03 ADN ENVIRONNEMENTAL

- Applicable précisément à une espèce cible
- Applicable précisément à un groupe taxonomique cible
- Applicable simultanément à tous les règnes du vivant
- Fournit des données sur l'abondance des espèces
- Fournit des informations individuelles
- Évite de sacrifier les individus
- Préserve la tranquillité des écosystèmes

CHAPITRE 01.

* Paroles d'expert

Mathieu Rocle,
ingénieur environnement à la
Compagnie Nationale du Rhône
(CNR)

Aucune méthode d'inventaire n'est autosuffisante

En tant qu'ingénieur environnement à CNR, je suis amené à réaliser des diagnostics sur les milieux aquatiques, le long du fleuve Rhône notamment. Les techniques d'inventaires que nous utilisons couramment sont celles liées aux invertébrés benthiques (IBGA) et aux poissons (pêches scientifiques à l'électricité). Ces méthodes permettent de collecter les spécimens dans le but premier d'en connaître la diversité, mais aussi d'autres facteurs tels que la quantité, la biomasse, l'état sanitaire, etc.

Aujourd'hui, si ces méthodes restent d'actualité, les nouveaux outils que sont l'ADNe ou l'échosondage permettent d'obtenir certaines de ces variables

(diversité, biomasse) de façon plus simple. En effet, ces méthodes sont rapides à mettre en œuvre et avec moins de personnel (donc moins onéreuses). De plus, elles sont non intrusives et pré servent donc les espèces. Selon l'information recherchée, ces méthodes sont pertinentes (parfois suffisantes, mais souvent complémentaires aux techniques traditionnelles). Pour ma part, je les considère très intéressantes à l'échelle macroscopique (ex. sur la totalité du fleuve), où les informations collectées permettent d'avoir une vision globale, mais aussi sur des secteurs plus ciblés lors de la recherche d'espèces cryptiques ou lors de la détermination de fronts de migrations.

* Paroles d'expert

Vincent Prié,
SPYGEN / MNHN (attaché)

Changements de paradigmes chez les chiroptérologues : un parallèle entre bioacoustique et ADNe

Les méthodes utilisées pour investiguer le vivant sont multiples et ont évolué au cours du temps, conduisant à des perceptions contrastées de la biodiversité. L'évolution de la chiroptérologie, l'étude des chauves-souris, est un bon exemple. Les premiers travaux étaient souvent menés par des spéléologues et concernaient les espèces cavernicoles telles que les Rhinolophes, qui se laissent pendre comme des ampoules et sont faciles à repérer au plafond des grottes. A partir des années 1930, des dizaines de milliers de Rhinolophes sont ainsi capturés dans les cavités, souvent en plein hiver, pour être bagués - entraînant des dégâts considérables sur les colonies.

Puis vient l'utilisation de filets dits « japonais » permettant de capturer les espèces en chasse dans leur milieu naturel. Connus des Japonais depuis des siècles, ces filets sont utilisés dès les années

1950 aux Etats-Unis pour étudier les oiseaux et les chauves-souris. On capture peu de Rhinolophes dans les filets parce que les Rhinolophes ont un sonar très performant qui leur permet de détecter les filets et de les éviter. Au contraire, les filets permettent de capturer beaucoup de Pipistrelles et de Murins de petite taille, qui sont abondants et volent à faible altitude. La connaissance sur les chauves-souris se déplace alors, avec une mise en lumière d'autres espèces.

Dès les années 1950 les premiers détecteurs d'ultrasons portatifs sont disponibles. Ils permettent de rendre audible le sonar des chauves-souris. Ces détecteurs se démocratisent dans les années 1990 – 2000. Ils sont peu efficaces pour les Rhinolophes, qui ont un sonar très directionnel et peu puissant, mais permettent en revanche d'étudier des espèces de haut vol, au sonar puissant, qui

sont rarement capturées dans les filets et fréquentent peu les cavités, telles que les Noctules ou les Molosses par exemple. La connaissance des populations de chiroptères se déplace encore avec l'arrivée de ce nouvel outil qui permet d'entendre l'inaudible et de capturer ce qui se passe haut dans le ciel.

Aujourd'hui, on dispose d'enregistreurs passifs très performants, qui permettent d'enregistrer des sons 24h/24. La masse de données accumulée est énorme et des logiciels dédiés permettent d'identifier les sons enregistrés et de les rapporter à telle ou telle espèce. Le naturaliste dispose alors d'une technologie permettant de réduire l'impact sur les chauves-souris, d'augmenter la probabilité de détection et d'intégrer un maximum d'information dans le temps et dans l'espace. Encore faut-il disposer de bases de références fiables pour assigner correctement les sons enregistrés aux espèces et de méthodes bioinformatiques efficaces. Ces nouveaux outils permettent ainsi de fournir une liste d'espèces par unité de temps et de lieux en limitant le dérangement.

Il existe beaucoup de parallèles entre la bioacoustique et l'ADNe. Le changement

de paradigme lié à l'arrivée d'une technologie apporte une perception différente, parfois plus aiguë, mais avec d'autres limites. Dans les deux cas, la perception de l'abondance peut être biaisée de manière similaire : une seule chauve-souris tournant autour de l'enregistreur produira beaucoup de sons, comme un seul poisson localisé proche du point de prélèvement produira beaucoup d'ADNe. Dans les deux cas, la localisation du point d'enregistrement ou de prélèvement est cruciale, et l'échantillonnage doit être intégrateur pour refléter la diversité des micro-habitats (ex. transects ou multiplication des points). Dans les deux cas, l'attribution des données collectées à une espèce est tributaire de bases de références robustes. Certains signaux sonores, comme certaines séquences d'ADNe, peuvent être communs à plusieurs espèces, ou à contrario une seule espèce peut émettre différents types de sons ou avoir différents haplotypes. Quand les bases de références sont incomplètes, comme c'est souvent le cas en milieu tropical, la question peut se poser : sommes-nous en présence d'une diversité intra-spécifique méconnue ou de détection d'espèces cryptiques non décrites ? Enfin, avec l'évolution de la technologie ou les différents moyens mobilisés (ex. capacité des micros ou profondeur de séquençage choisie) la distance de détection peut varier et rendre difficile la comparaison des résultats dans l'espace ou dans le temps.



CHAPITRE 02.

Définition, écologie et détectabilité de l'ADNe

Définition et écologie de l'ADNe : composition, origine, transport et dégradation

L'ADNe est défini comme l'ADN extrait à partir d'échantillons environnementaux (ex. eau, sol, air, etc.) sans avoir besoin d'isoler les organismes au préalable^[4]. Il se compose d'ADN extracellulaire, libre ou adsorbé sur des particules organiques et inorganiques, ainsi que d'ADN intracellulaire provenant de diverses sources. Ces sources incluent des microorganismes unicellulaires (bactéries, virus ou protistes), des organismes pluricellulaires de petite taille et entiers (zooplancton ou méiofaune), ainsi que de traces et de résidus (ex. peau, fèces, gamètes, mucus, salive, etc.) d'organismes plus grands (ex. vertébrés, invertébrés, plantes, etc.)^[3-5].

La quantité d'ADN produite par les organismes varie en fonction de facteurs biologiques et physiologiques tels que l'espèce, l'âge, le stade de développement, le métabolisme, l'état de stress, le statut immunitaire, le comportement de reproduction et la

"Là où la vie passe, elle laisse des traces."

Nicolas Poulet & Laurent Basilico, 2019

biomasse des individus. Ces caractéristiques biologiques et physiologiques peuvent elles-mêmes être modulées par des paramètres environnementaux comme la température et le pH de l'eau^{[6], [7]}.

Dans l'environnement, l'ADNe est dégradé sous l'action d'un ensemble de facteurs biotiques (ex. par des microorganismes, des enzymes, etc.) et abiotiques (ex. rayons UV, pH, température, etc.). En milieu aquatique, il peut également être transporté, sédimenté et remis en suspension dans la colonne d'eau^{[8], [7]}.



À retenir

Persistante et distance de détection de l'ADNe en fleuves et rivières

Plusieurs études menées sur différents types d'organismes (ex. poissons, amphibiens, etc.), en conditions contrôlées, se sont intéressées à la vitesse de dégradation de l'ADNe^[7]. Les temps de dégradation les plus rapides observés en milieu aquatique sont de l'ordre de quelques heures, tandis que les plus lents oscillent entre 21 et 28 jours^[7]. Les recherches actuelles semblent donc indiquer que l'ADNe ne persiste pas plus de quelques jours voire semaines dans la colonne d'eau^{[8], [9]}. Cependant, les conditions environnementales peuvent modifier ces durées de persistance. Par exemple, il a été montré qu'une exposition continue aux radiations UV réduisait la détectabilité de l'ADNe de 3 jours par rapport aux conditions sans exposition, et que l'ADNe pouvait persister jusqu'à 58 jours dans une eau maintenue à 5 °C^{[10], [11]}. Des expérimentations menées sur des poissons maintenus en cage dans des cours d'eau d'Amérique du Nord ont montré que l'ADN de ces espèces captives était détectable sur plusieurs centaines de mètres et jusqu'à 5 km en aval^{[12], [14], [15]}. D'autres études suggèrent que l'ADN de certaines espèces de lacs est transporté moins de 10 km en aval dans les cours d'eau^{[13], [16], [17]}. Cependant, malgré ces phénomènes de dispersion de l'ADNe en milieu aquatique, les méthodes d'analyse de l'ADNe sont capables de discerner des assemblages d'espèces entre des sites distants de quelques centaines de mètres^{[10], [16], [18], [19]}.

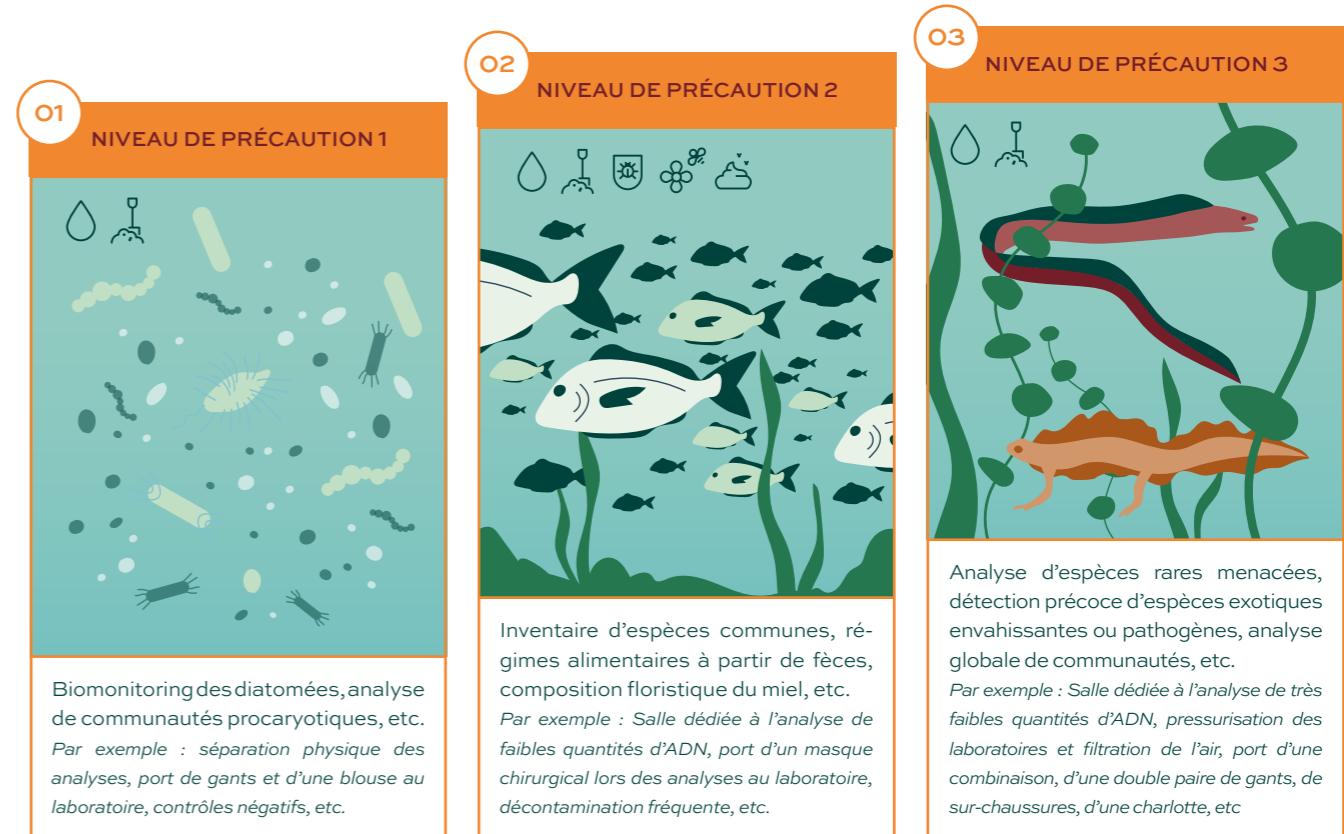
En milieu aquatique, l'ADNe se comporte comme les particules fines de matière organique^{[12], [13]}. En conséquence, sa distance de détection est influencée par les caractéristiques hydrauliques du cours

CHAPITRE 02.

Optimiser la détection de l'ADNe rare

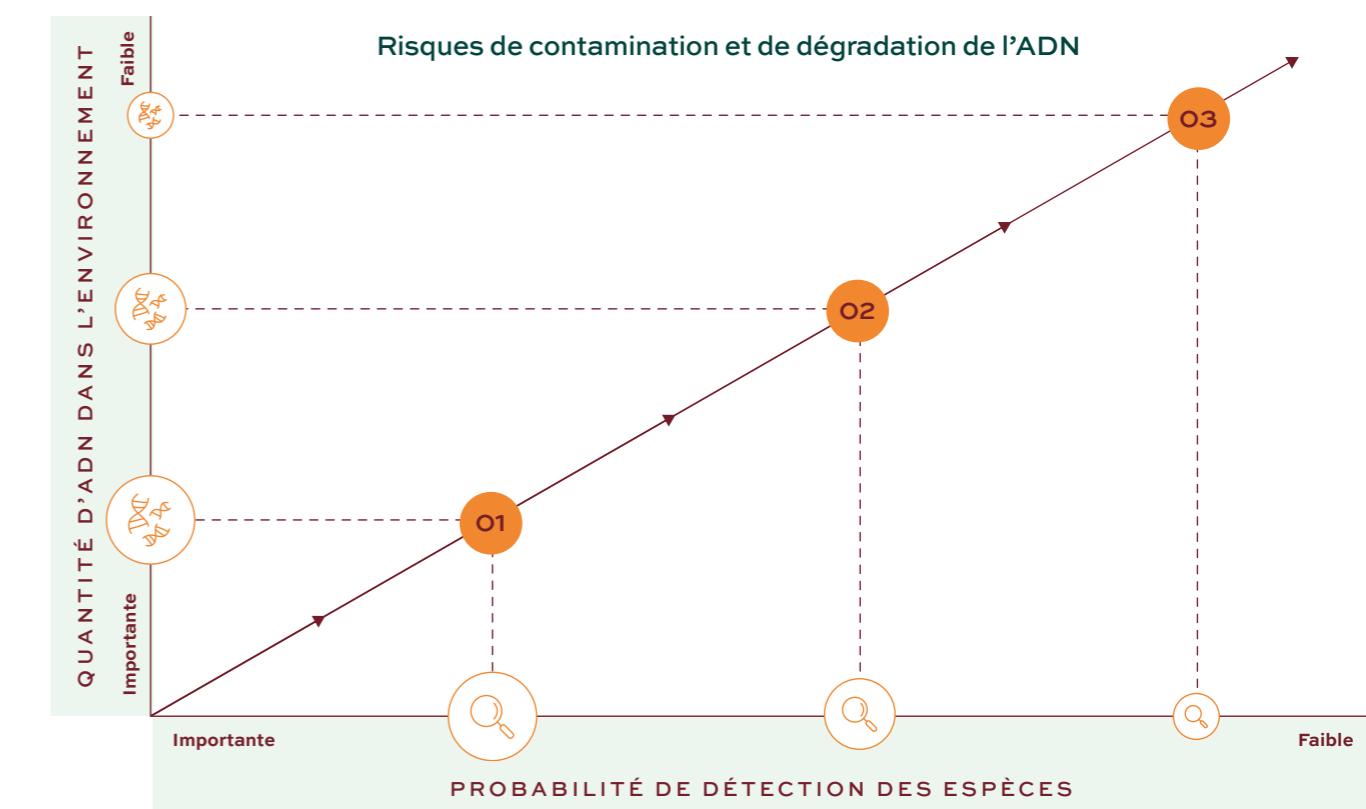
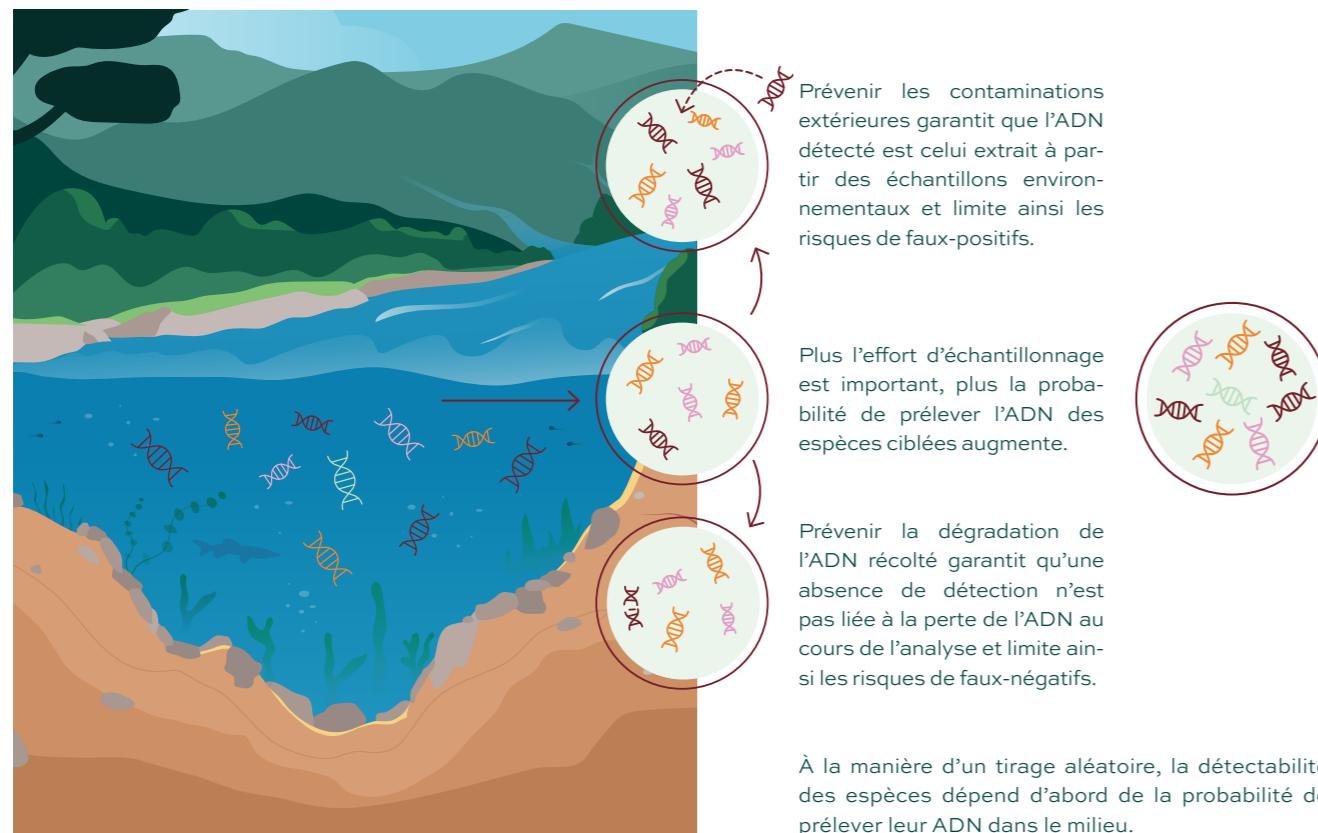
En milieu aquatique, la dégradation et le transport de l'ADNe dans l'eau entraînent sa dilution dans de grands volumes, rendant sa concentration souvent très faible. Or, à la manière d'un tirage aléatoire, la détectabilité des espèces dépend d'abord de la probabilité de prélever leur ADN dans le milieu. Elle repose ensuite sur la conservation de l'ADNe récolté pour empêcher sa dégradation et ainsi assurer qu'une absence de détection n'est pas liée à un faux-négatif résultant de la perte du matériel génétique au cours du processus analytique. En parallèle, les risques de faux-positifs doivent être prévenus pour garantir que l'ADNe détecté est bien celui des espèces présentes dans l'environnement d'intérêt et non le résultat d'un apport extérieur, qu'il s'agisse d'un apport provenant du matériel d'échantillonnage et d'analyse ou des personnes les manipulant (contamination), ou d'ADN non ciblé présent dans l'environnement (ex. rejets d'aquaculture). Selon les objectifs de l'étude, ces différents paramètres - probabilité de détection, conservation et absence d'ADN exogène et/ou non

ciblé - impliquent des niveaux de précaution plus ou moins contraignants en termes de matériel, d'infrastructures, d'échantillonnage et d'analyses en laboratoire. Par exemple, dans le cas d'analyses de communautés bactériennes abondantes dans l'environnement, les niveaux de précaution à prendre ne sont pas aussi drastiques que pour détecter des espèces rares laissant des traces infimes de leur ADN dans l'environnement. Pour réaliser des inventaires et des suivis de biodiversité, il est nécessaire de prendre en compte ces espèces moins communes afin d'obtenir les listes taxonomiques les plus exhaustives possibles tout en limitant les risques de faux-négatifs* et de faux-positifs* qui sont préjudiciables à la bonne interprétation des résultats. Ce point est d'autant plus critique lorsque les inventaires et les suivis de biodiversité sont réalisés dans le cadre d'études réglementaires. Enfin, il est également préconisé d'utiliser des méthodes standardisées pour permettre de comparer les données récoltées dans le temps et dans l'espace.



Vocabulaire

***Faux-négatif** : Absence de détection d'une espèce présente dans l'environnement étudié.
***Faux-positif** : Détection d'une espèce absente de l'environnement étudié.



Type d'échantillons concernés



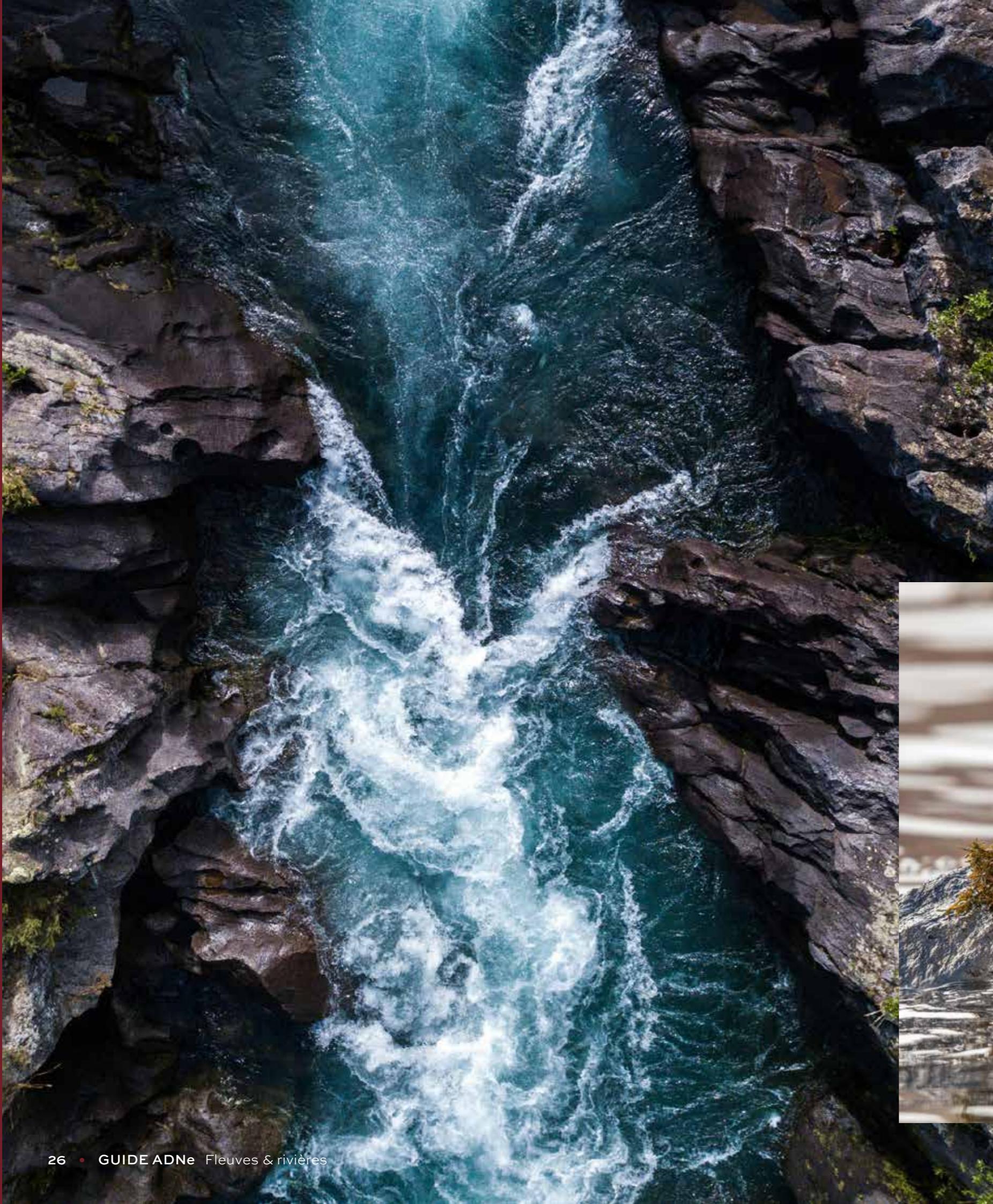
*Le terme bulk désigne l'ADN massal, c'est-à-dire l'ADN extrait à partir d'homogénéat de communautés capturées (exemple : invertébrés, diatomées, etc.). L'appartenance de l'ADN massal à l'ADN environnemental est débattue au sein de la communauté scientifique.

PARTIE 02.

Acquérir

DES DONNÉES ISSUE DE

l'ADNe



CHAPITRE 03.

Concevoir un projet

Comme pour tout projet, la conception d'une étude basée sur l'analyse de l'ADNe nécessite d'abord de définir clairement le ou les objectif(s) à atteindre. En parallèle, une évaluation des moyens humains, logistiques et budgétaires disponibles pour réaliser les échantillonnages et les analyses doit être réalisée. Ces différents paramètres définissent les contraintes techniques et environnementales qui conditionnent, entre autres, l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage optimale. Une telle stratégie consiste à concevoir un plan de collecte des échantillons permettant de maximiser la détectionnalité de l'ADNe, de minimiser l'effort d'échantillonnage et de réduire les risques de biais (faux-positifs et faux-négatifs, Cf. Chapitre 2), tout en assurant une représentativité fidèle du milieu étudié.

Définir l'objectif de l'étude

Les objectifs d'une étude basée sur l'analyse de l'ADNe sont définis en fonction des questions posées par l'utilisateur ainsi que par les taxons, les milieux, et les zones géographiques ciblés. Ainsi, une étude peut aussi bien concerner une espèce unique (qu'elle soit considérée comme vulnérable, emblématique, envahissante, etc.) qu'un ou plusieurs groupe(s) taxonomique(s) (ex. poissons, amphibiens, vertébrés, etc.), et être conduite à l'échelle locale lorsqu'elle concerne un site unique (ex. zone de restauration écologique, zone de frayère, etc.) ou à l'échelle globale si plusieurs localisations différentes sont impliquées (ex. comparaison d'espèces colonisant des zones fortement anthropisées ou non, etc.).

"Les objectifs d'une étude basée sur l'analyse de l'ADNe sont définis en fonction des questions posées par l'utilisateur ainsi que par les taxons, les milieux et les zones géographiques ciblés"

Identifier les acteurs à mobiliser

Lors de la réalisation d'un projet faisant appel aux méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe, une même personne peut assurer plusieurs rôles et intervenir à différentes étapes. Par exemple, le commanditaire de l'étude peut réaliser l'échantillonnage, transmettre les données sur les plateformes dédiées et assurer l'expertise écologique.

Expert écologue

Il peut participer à l'élaboration de la stratégie d'échantillonnage et réalise les interprétations écologiques des résultats obtenus par l'expert technologique.

Gestionnaire de données

Il assure la qualité et la structuration des données et des métadonnées dans les bases de données et systèmes d'information.

Paroles d'expert

Aurélien Besnard,
Directeur d'études de l'École
Pratique des Hautes Études
(Montpellier)

Tout comme l'étude de la distribution des espèces et des facteurs pouvant l'influencer à partir de simples observations de terrain, l'utilisation des techniques d'ADNe implique de bien réfléchir au plan d'échantillonnage spatial à déployer. Ainsi, une définition claire de la question d'intérêt et de la population statistique afférente est nécessaire afin de déployer un échantillonnage spatial rigoureux pour réaliser des inférences en cohérence avec la question étudiée. Par ailleurs, même si la probabilité de détection via l'ADNe est haute, des problèmes de faux-négatifs sont fréquents et impliquent de bien réfléchir à la manière de modéliser cette détection pour obtenir des estimations non biaisées des paramètres. La définition de tels plans d'échantillonnage robustes est cruciale pour l'exploitation des données. Elle implique de mobiliser des compétences en statistiques relativement pointues. Nous encourageons donc les porteurs de projet à travailler de concert avec des écostatisticiens qui pourront les guider sur la définition de tels plans.

Commanditaire

Chef de projets, gestionnaire, chercheur, etc.

En charge de l'étude, il identifie les objectifs et peut participer à l'élaboration de la stratégie d'échantillonnage. Il assure le respect des réglementations, l'opérationnalisation technique et financière du projet ainsi que la diffusion et l'utilisation des résultats.

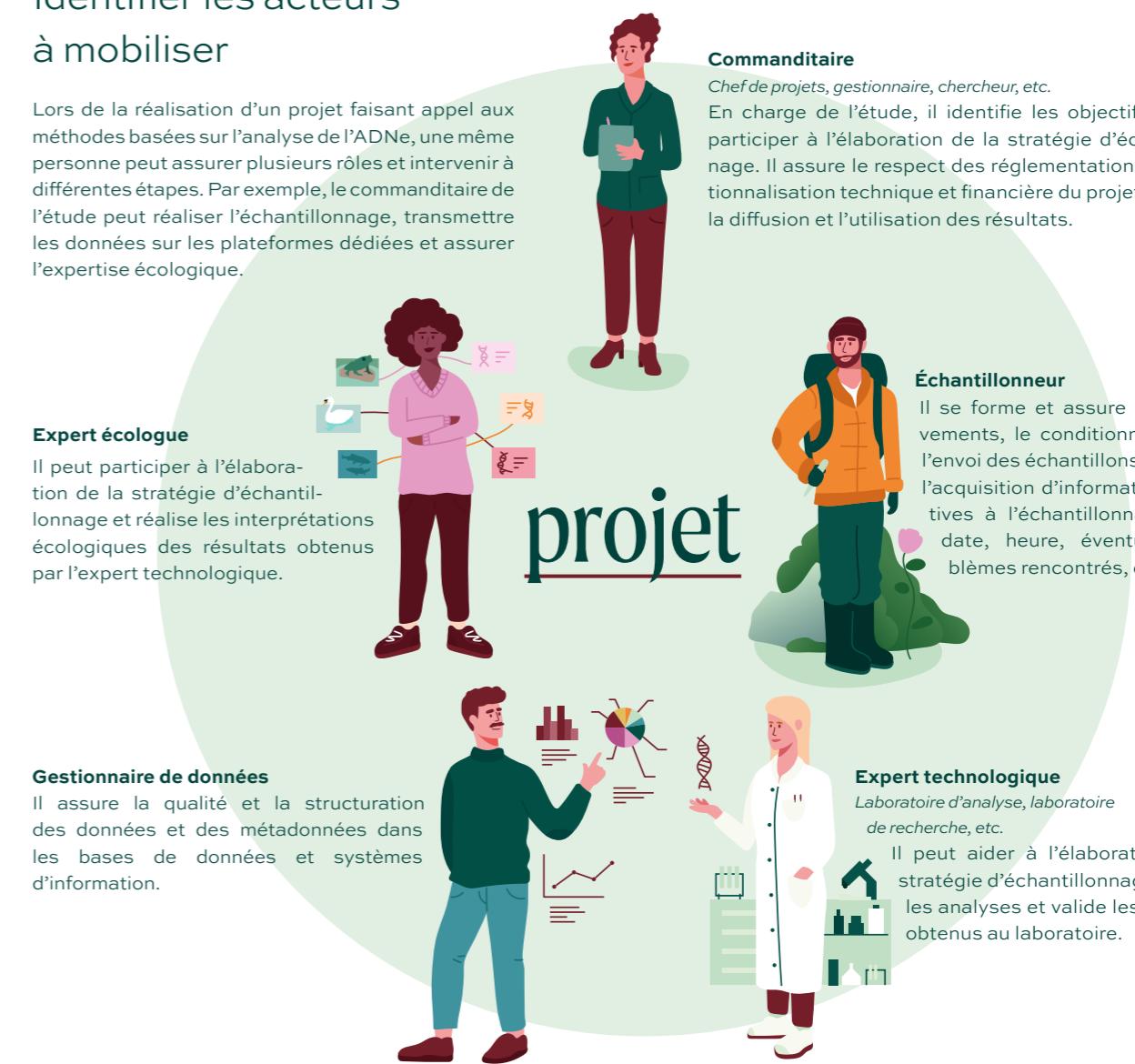
Échantillonneur

Il se forme et assure les prélèvements, le conditionnement et l'envoi des échantillons ainsi que l'acquisition d'informations relatives à l'échantillonnage (lieu, date, heure, éventuels problèmes rencontrés, etc.).

Expert technologique

Laboratoire d'analyse, laboratoire de recherche, etc.

Il peut aider à l'élaboration de la stratégie d'échantillonnage, réalise les analyses et valide les résultats obtenus au laboratoire.



CHAPITRE 03.

Anticiper les ressources budgétaires et les délais à allouer

Le budget est un point clé à prendre en compte lors de l'élaboration d'un projet. En effet, des ressources budgétaires limitées par rapport aux besoins de l'utilisateur peuvent influencer la stratégie d'échantillonnage en modulant, par exemple, le nombre de sites prospectés ou le nombre d'échantillons prélevés. Ainsi, bien que ce ne soit pas toujours possible, nous recommandons d'élaborer une stratégie d'échantillonnage en amont de la demande de financement, en collaboration avec les experts technologiques et écologiques identifiés. A titre informatif, à l'heure actuelle, le coût moyen d'une analyse ADNe pour un échantillon peut atteindre plusieurs centaines d'euros. Les tarifs varient selon le groupe taxonomique ciblé mais aussi selon le matériel d'échantillonnage proposé et les analyses réalisées par les prestataires sélectionnés. En effet, chaque laboratoire déploie une méthode qui lui est propre, plus ou moins adaptée aux objectifs définis

par l'utilisateur (Cf. chapitre 2). Généralement, les prix communiqués par l'expert technologique n'incluent pas les potentiels frais liés à l'interprétation écologique des résultats et aux moyens nécessaires pour réaliser les échantillonnages sur le terrain (ex. frais de mission et de déplacement, bateau, etc.). Ils devront néanmoins être pris en compte dans le budget final.

Lors de la conception d'un projet, il est également important de se renseigner auprès de l'expert technologique quant au temps nécessaire pour obtenir les résultats. Il dépend essentiellement de la charge de travail du laboratoire, du nombre d'échantillons à analyser et de l'approche méthodologique déployée (spécifique ou multispécifique). Ainsi, les délais d'obtention des résultats peuvent s'étendre sur plusieurs mois. Un temps supplémentaire peut aussi être requis pour l'étape d'interprétation écologique.

Élaborer une stratégie d'échantillonnage



En amont de la réalisation des prélevements, la stratégie d'échantillonnage permet de déterminer le nombre d'échantillons à collecter, leur répartition dans le temps et l'espace ainsi que les méthodes et les réglementations à respecter. Elle répond ainsi à quatre questions clés :

- **Comment échantillonner ?**
 - **Où échantillonner ?**
 - **Quand échantillonner ?**
 - **Selon quelles réglementations en vigueur ?**
- COMMENT ÉCHANTILLONNER ?**
- **Choisir une méthode d'échantillonnage**

La collecte d'échantillons en milieu aquatique consiste à prélever plusieurs litres d'eau. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes permettant de réaliser ce type de prélevements^[20], toutes ne sont pas optimisées pour la détection d'ADNe rare (comprendre ADNe présent en faible quantité, Cf. chapitre 2). Les principales méthodes existantes sont brièvement présentées ici.

À retenir

Filtration vs. précipitation

Traditionnellement, deux méthodes existent pour collecter l'ADNe à partir d'un échantillon d'eau : la précipitation de l'ADN par ajout d'éthanol et d'acéate de sodium ou la filtration de l'eau à travers une membrane poreuse retenant l'ADN^[21]. La précipitation a été déployée dans le cadre de la première étude portant sur la détection de l'ADNe provenant d'un vertébré^[2]. Cependant, à l'heure actuelle, la filtration est

la méthode la plus utilisée^[20] car elle est reconnue par la communauté scientifique comme étant plus performante^[21]. En effet, elle permet d'analyser de plus grands volumes d'eau tout en limitant l'usage d'éthanol – produit inflammable, soumis à des réglementations strictes et souvent coûteuses en termes de transport, de conservation et d'utilisation^[21].

Pour aller plus loin

Autres méthodes d'échantillonnage

En fonction de l'objectif de l'étude, des prélèvements de sédiments peuvent être envisagés, en complément ou en remplacement des filtrations d'eau. Toutefois, les temps de persistance de l'ADNe dans les sédiments diffèrent de ceux observés dans l'eau, ce qui exige une stratégie d'échantillonnage spécifiquement adaptée à cette matrice.

Par ailleurs, certaines études ont exploré l'utilisation de méthodes alternatives pour l'échantillonnage de l'eau, notamment l'emploi de capteurs passifs immergés dans la colonne d'eau pendant une durée déterminée. À ce jour, ces

approches sont peu répandues, quel que soit le type de milieu étudié. Dans les fleuves et rivières, une étude indique que la filtration active permet d'augmenter les quantités d'ADN collectées, d'augmenter la probabilité de détection de l'ADN et de révéler une plus grande richesse spécifique^[22]. D'autres travaux suggèrent que la filtration active et les capteurs passifs produisent des résultats comparables^{[23],[24]}. Cependant, l'obtention de résultats équivalents en utilisant des capteurs passifs nécessite un plus grand nombre de répliques sur le terrain^[22], ce qui entraîne une augmentation des coûts^[24].

CHAPITRE 03.

Filtration hors site
Photo Adobe stock

L'eau peut être filtrée directement sur site ou être prélevée dans des contenants spécifiques pour ensuite être transportée puis filtrée au laboratoire. Les filtrations réalisées en dehors du site de prélèvement limitent le temps passé sur le terrain. Cependant, le transport et la manipulation des échantillons augmentent, respectivement, les risques de contamination et de dégradation de l'ADNe. Pour limiter ce second phénomène, les échantillons d'eau peuvent être conservés au froid ou par ajout d'une solution tampon, ce qui engendre des contraintes logistiques et budgétaires non négligeables, limitant les volumes d'eau pouvant être analysés^[21].

Filtration sur site
© Vincent Prié, SPYGEN

Qu'elles soient effectuées hors site ou sur site, les filtrations peuvent être réalisées avec une pompe manuelle (ex. seringue) ou motorisée (péristaltique ou à vide). Les pompes manuelles sont faciles à utiliser et peu onéreuses mais les filtrations peuvent être laborieuses et chronophages, limitant ainsi les volumes d'eau et le nombre d'échantillons analysés^[21]. Les pompes manuelles et motorisées peuvent être utilisées avec des membranes filtrantes (également appelées "filtres" dans ce document) ouvertes ou encapsulées et composées de fibre de verre, de nitrocellulose ou de polymères de plastique (polycarbonate, polyéthersulfone, etc.). Ces divers matériaux sont susceptibles d'influencer l'hydrophilie de la membrane, ses propriétés mécaniques et ses capacités de résistance (ex. capacité à résister à différentes pressions de filtration, temps de conservation supportés, etc.), constituant un ensemble de paramètres pouvant moduler les volumes d'eau filtrés^{[20], [21]}. Ces derniers dépendent également de la porosité et de la surface du filtre. En effet, le diamètre des pores doit être suffisamment petit pour retenir le plus d'ADNe possible tout en limitant la saturation de la membrane (colmatage) due à l'accumulation d'autres particules organiques et inorganiques. Généralement, les filtres ont une porosité inférieure à 1,5 µm et les plus utilisés sont de l'ordre de 0,22 µm et 0,45 µm^{[20], [21]}. En fleuve et rivière, où l'eau peut être turbide et riche en matière organique, des membranes avec une porosité de l'ordre de 0,45 µm sont généralement préconisées.

Pompe manuelle (seringue)
© Aurélie Lacoeulhe, PatriNat**Pompe motorisée (péristaltique)**
© Vincent Prié, SPYGEN**Filtre plat ouvert**
© MicrobeOnline**Capsule de filtration**
© SPYGEN

Les filtres ouverts sont moins onéreux mais nécessitent d'être manipulés par l'utilisateur et sont exposés à l'air libre au cours de la filtration, avec des temps d'exposition pouvant atteindre plusieurs dizaines de minutes, voire plusieurs heures^[25]. Leur utilisation augmente donc le risque de contamination des échantillons (risque de faux-positifs). De plus, ils ont une surface réduite (environ 17 cm²) par rapport aux membranes encapsulées (jusqu'à 500 cm²), ce qui limite les volumes d'eau pouvant être filtrés (colmatage plus rapide).



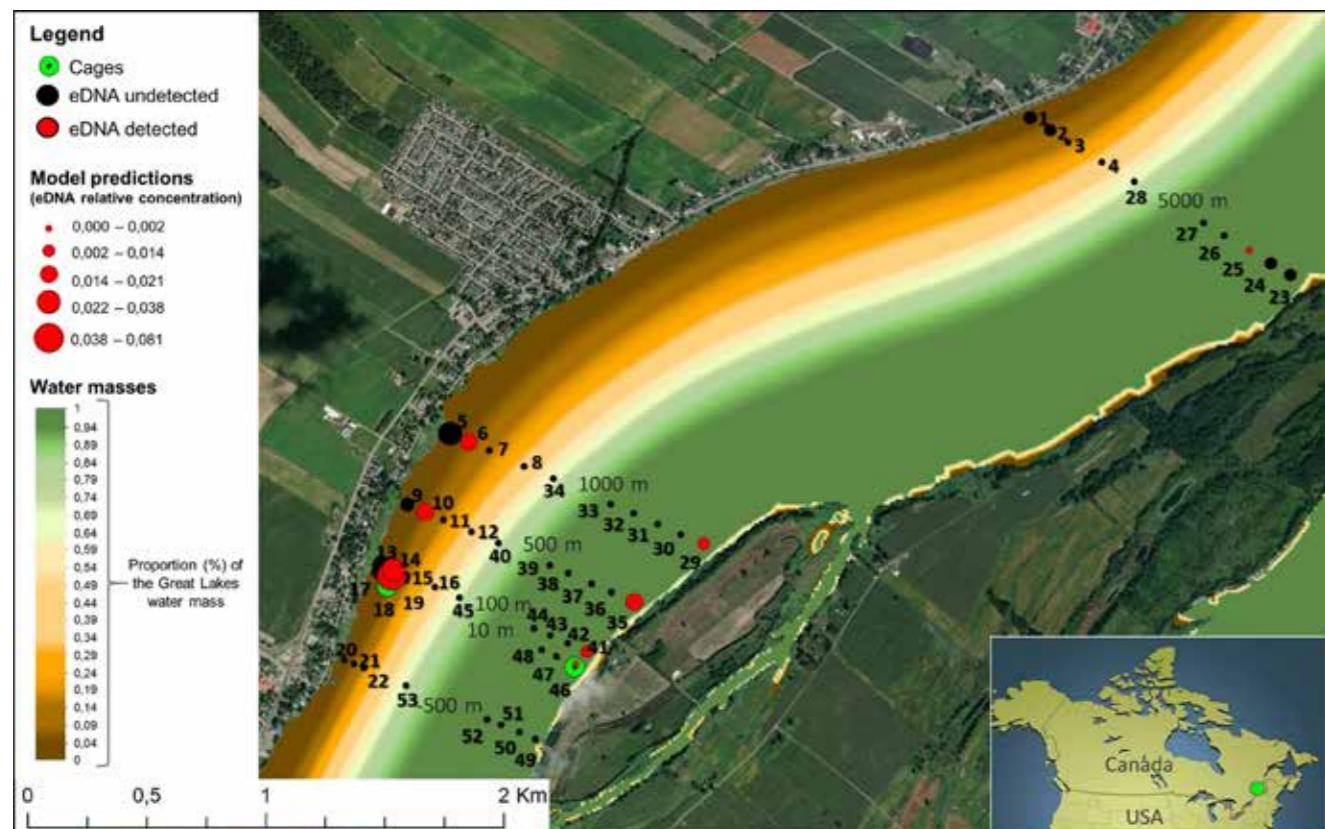
Après filtration, l'ADNe retenu sur la membrane peut être dégradé par des phénomènes physico-chimiques ou par les communautés microbiennes présentes à la surface. Afin de prévenir ces risques de dégradation, les filtres doivent être conservés rapidement, au froid ou dans des solutions de conservation (ex. tampons, éthanol, etc.), et à l'abri de la lumière. La conservation au froid exige un accès immédiat à des équipements de réfrigération ou de congélation et implique de maintenir les échantillons à une température basse et stable durant leur transport jusqu'au laboratoire^[21]. Les capsules de filtration, souvent plus volumineuses que les filtres plats, peuvent nécessiter des espaces de stockage au froid plus importants. Si une solution de conservation est utilisée, cela influe sur la méthode d'extraction de l'ADN qui sera ensuite utilisée lors des analyses au laboratoire, et ce indépendamment du type de membrane filtrante, ouverte ou encapsulée.

**→ Points fixes ou transects**

Les écosystèmes dulcicoles sont des milieux hétérogènes, dynamiques et structurés en habitats morphologiques, hydrauliques, physico-chimiques et biologiques distincts^[26]. Ainsi, les communautés diffèrent entre les berges et la colonne d'eau mais aussi, dans le cas de plus grands écosystèmes, entre différentes profondeurs. Une étude intéressante à la dispersion de l'ADN produit par des truites communes *Salmo trutta* maintenues en cage (biomasse totale de 27,9 kg) dans la Rivière des Outaouais au Canada a montré que l'ADNe était transporté selon un flux longitudinal avec peu de dispersion latérale^[14]. En d'autres termes, quand l'écoulement est laminaire et / ou lorsque la taille du cours d'eau est importante, un échantillonnage réalisé en rive gauche détectera préférentiellement l'ADN des espèces présentes en rive gauche et inversement. Ainsi, dans le cadre d'inventaires et de suivis de biodiversité, nécessitant d'obtenir une liste d'espèces la plus exhaustive possible, il est recommandé d'effectuer des prélèvements d'eau permettant de considérer l'écosystème dans sa globalité, d'une berge à l'autre^{[21], [27]}. La filtration continue en suivant un transect est une méthode adaptée à cet objectif et peut, dans certains cas, fournir de meilleurs résultats que l'échantillonnage par pêche scientifique à l'électricité^[28]. Cependant, elle reste encore peu utilisée^[29] en raison de contraintes logistiques et environnementales. Par exemple, selon la taille du cours d'eau étudié, une embarcation peut être nécessaire. En alternative, d'autres méthodes peuvent être employées : les prélèvements ponctuels suivis de filtrations individuelles ou les filtrations sur point fixe. Ces approches permettent d'établir une liste des espèces associées à chaque point d'échantillonnage. Cependant, selon la répartition spatiale des espèces et la couverture des prélèvements, certaines espèces peuvent ne pas être détectées. La couverture spatiale peut être améliorée en multipliant les points de prélèvements mais s'accompagne d'une augmentation des coûts, chaque échantillon nécessitant une analyse propre au laboratoire.

"Il est recommandé d'effectuer des prélèvements d'eau permettant de considérer l'écosystème dans sa globalité d'une berge à l'autre"

CHAPITRE 03.

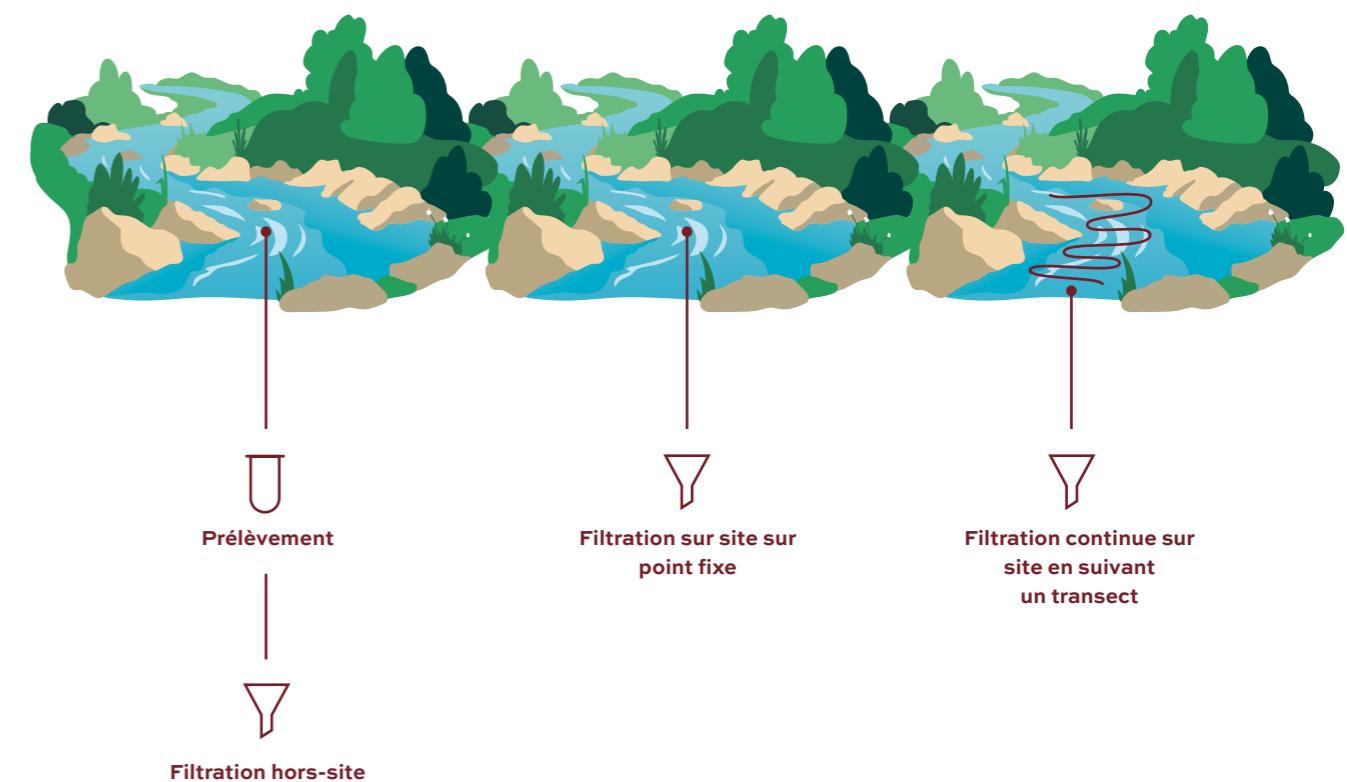

Illustration de la dispersion de l'ADNe dans le fleuve Saint-Laurent^[14]

Des truites brunes (*Salmo trutta*) ont été placées dans des cages (cercles verts) situées dans deux masses d'eau distinctes provenant de la rivière des Outaouais (dégradé de brun) et des Grands Lacs (dégradé de vert). Après le retrait des cages, des échantillons d'eau ont été prélevés à 53 stations, réparties de 500 m en amont jusqu'à 5 000 m

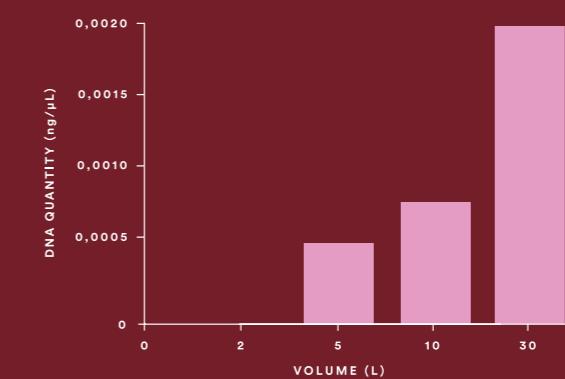
en aval, puis analysés par qPCR. Les cercles rouges indiquent une détection positive de l'ADNe par qPCR, tandis que les cercles noirs signalent une absence de détection. La taille des cercles représente la concentration relative d'ADNe prédictée par un modèle hydrodynamique bidimensionnel.


Exemple de protocole d'échantillonnage basé sur un transect de prélèvement d'eau de berge à berge sur le Maroni, en Guyane.

Les lignes pointillées représentent le trajet recommandé pour garantir une représentativité des écosystèmes. Il est conseillé de passer des temps de prélèvement équivalents en berge gauche, en zone centrale et en berge droite.


À retenir
Volumes d'eau filtrés

Comme pour un tirage aléatoire, la détectabilité des espèces dépend avant tout de la probabilité de prélever leur ADN dans l'environnement. Cependant, en milieu aquatique, les phénomènes liés à l'écologie de l'ADNe (production, dégradation et transport) impliquent sa dilution dans des volumes importants (Cf. chapitre 2). Les concentrations d'ADNe en milieu naturel sont donc généralement faibles et ce particulièrement dans le cas d'espèces rares, peu abondantes dans l'environnement. En conséquence, les quantités d'eau filtrées tendent à être



Quantité d'ADN d'une espèce de poisson (*Barbus barbus*) détectée dans une rivière en fonction du volume d'eau filtré.

CHAPITRE 03.



Échantillonnages par transect en réplicas © Vincent Prié, SPYGEN

→ Nombre d'échantillons

Afin de filtrer les plus grands volumes d'eau possibles et augmenter la probabilité de détection de l'ADNe des espèces ciblées, plusieurs échantillons, appelés réplicas terrain, peuvent être collectés sur un même site de prélèvement. En milieu aquatique, l'ADNe peut être fortement dilué (Cf. chapitre 2) et il est donc nécessaire d'effectuer plusieurs réplicas. Leur nombre peut être déterminé à la suite d'une étude pilote et selon les taxons ciblés, les caractéristiques du milieu et les objectifs de l'étude^[26]. A noter, que le nombre de réplicas réalisé est souvent un compromis entre coûts, moyens à disposition et exhaustivité des espèces détectées.

"Une bonne stratégie d'échantillonnage est avant tout un compromis optimisé entre une question et un ensemble de contraintes."

Giraudoux, 2004

Pour aller plus loin

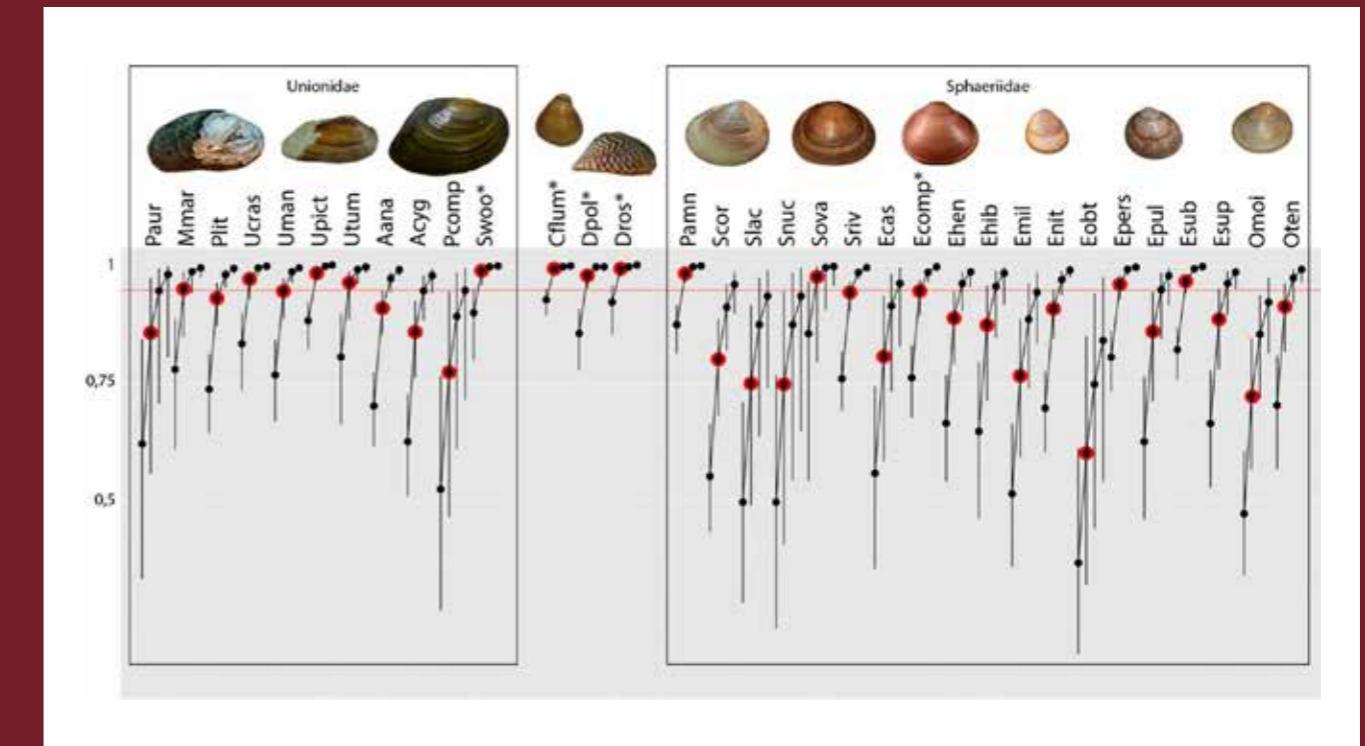
Nombre de réplicas terrain



Pour en savoir plus : Prié et al. 2023. Conservation assessment based on large-scale monitoring of eDNA: Application to freshwater mussels. *Biological Conservation*. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2023.110089>

Dans le cadre d'une étude menée entre 2015 et 2020 sur la détection des bivalves d'eau douce en France par analyse de l'ADNe, les probabilités de détection des espèces ont été modélisées à l'aide de modèles d'occupation. À partir des probabilités de détection estimées pour un réplica, des calculs ont permis de déterminer le nombre de réplicas nécessaires pour atteindre une probabilité de détection de 95 % (0,95). Les résultats révèlent que les probabilités de

détection varient de 0,37 à 0,93 pour un réplica, de 0,6 à 0,99 pour deux réplicas et de 0,84 à 1 pour quatre réplicas. Ainsi, dans le cadre du protocole d'échantillonnage utilisé, deux réplicas suffisent pour détecter la majorité des espèces. Cependant, en fonction des espèces ciblées, un nombre plus élevé de réplicas peut être requis pour optimiser leur détection et minimiser les risques de faux négatifs.



Probabilité de détection (de 0 à 1) pour différentes espèces de moules d'eau douce en fonction du nombre de réplicas (illustrés par les points noirs et rouges). Chaque réplica correspond à un échantillon de 30 L d'eau filtrée sur un transect. Les points rouges indiquent les résultats pour deux réplicas. La ligne rouge représente une probabilité de détection de 95 % (0,95).

CHAPITRE 03.



"Il est recommandé d'échantillonner à l'aval le plus proche des zones d'intérêt et préférentiellement dans des zones de brassage afin de favoriser l'homogénéisation de l'eau et des molécules d'ADNe"

→ Où échantillonner ?

En tenant compte de l'écologie de l'ADNe en milieu aquatique (Cf. chapitre 2), l'espacement entre les sites de prélèvement dépend à la fois des besoins de l'utilisateur et des caractéristiques du cours d'eau (ex. superficie à étudier, présence de forts courants, discontinuité de l'habitat). Du fait des phénomènes de transport et de dilution de l'ADNe dans la colonne d'eau, il est recommandé d'échantillonner à l'aval le plus proche des zones d'intérêt et préférentiellement dans des zones de brassage afin de favoriser l'homogénéisation de l'eau et des molécules d'ADNe^[21]. Par exemple, lorsqu'un habitat abrite une grande diversité de taxons ou une espèce cible, le prélèvement doit être effectué à l'aval direct de cette zone. En revanche, lorsque les taxons sont globalement distribués à l'échelle du cours d'eau ou que l'utilisateur manque de connaissance quant à leur aire de répartition écologique, il est recommandé d'effectuer des échantillonnages à intervalles réguliers. L'espacement entre ces intervalles devra être évalué en fonction des contraintes logistiques et budgétaires mais aussi de la taille et du débit du cours d'eau^[13] afin que le plan d'échantillonnage soit le plus représentatif possible du milieu considéré. Pour atteindre cette représentativité, la stratégie d'échantillonnage doit également être adaptée à la morphologie du cours d'eau. Il peut donc être nécessaire de considérer les affluents, les plans d'eau plus ou moins connectés au cours d'eau d'intérêt (ex. bras secondaires, bras morts, etc.) ainsi que l'ensemble des tresses dans le cas d'un cours d'eau en tresses. Enfin, le positionnement des points de prélèvement peut avoir une importance cruciale dans la prévention des faux-positifs. Ainsi, il est déconseillé de filtrer l'eau à proximité de sites fortement anthropisés susceptibles de relarguer de fortes concentrations d'ADNe non ciblé^[21]. Par exemple, les stations d'épuration ou les rejets d'aquaculture peuvent être des sources d'ADN d'espèces consommées. De même, l'échantillonneur et/ou l'embarcation utilisée peuvent être sources de contamination (ex. traces d'ADN sur la coque de l'embarcation, sur l'équipement de l'échantillonneur, etc.). Ils doivent donc être systématiquement positionnés à l'aval du point de prélèvement et remonter le cours d'eau de l'aval vers l'amont lorsque plusieurs échantillonnages sont réalisés. Une décontamination préalable (ex. javel) du matériel peut également être envisagée afin de limiter les apports d'ADN exogène.

→ Quand échantillonner ?

Le moment idéal de l'échantillonnage doit être défini selon les caractéristiques du milieu et des espèces associées. Par exemple, lorsqu'une espèce particulière est ciblée, il est recommandé d'échantillonner durant sa période de reproduction et/ou d'activité (en prenant garde à ne pas déranger les individus qui pourraient être rencontrés). En effet, à ces moments, l'espèce exrète plus d'ADN (ex. production de gamètes, mise bas, etc.) et l'augmentation de son activité facilite la dispersion de son ADN^[21]. Selon le cycle de vie des espèces, celles-ci ne sont pas forcément présentes aux mêmes endroits tout au long de l'année (ex. flux migratoire). Il est donc utile d'obtenir des informations préalables sur la répartition et l'écologie des taxons d'intérêt pour déterminer la période d'échantillonnage la plus favorable^[21]. En zone tempérée, avec des saisons très marquées, les assemblages d'espèces peuvent fortement varier au cours de l'année^[6]. Lorsque l'on réalise des inventaires de biodiversité, il est donc important d'échantillonner à la même période tous les sites que l'on veut comparer. De même, les échantillonnages pluriannuels doivent être effectués à la même période chaque année pour être comparables. Pour réaliser un inventaire le plus exhaustif possible des espèces présentes dans une zone sur l'ensemble de l'année, il faut idéalement effectuer plusieurs échantillonnages à différentes saisons afin de maximiser la détection des espèces qui ne sont présentes qu'à certaines périodes. On peut, par exemple, effectuer un échantillonnage au printemps et un autre à l'automne. Les objectifs définis par l'utilisateur peuvent également influencer la période d'échantillonnage. Par exemple, même si les périodes de fortes crues sont susceptibles d'entraîner la remise en suspension de

l'ADNe sédimenté et d'augmenter la turbidité de l'eau, ces périodes peuvent être favorables à la détection de certains taxons comme les vertébrés terrestres par exemple. De la même manière, selon le type de milieu étudié, les périodes de très faible débit peuvent représenter une contrainte ou un avantage. En effet, dans un ruisseau, un débit très faible peut entraîner un assèchement partiel ou total du cours d'eau, créant des conditions peu favorables à l'échantillonnage et propices à la dégradation de l'ADNe. À l'inverse, dans un grand fleuve, une diminution du débit peut réduire les phénomènes de transport et de dilution de l'ADNe.



→ Selon quelles réglementations échantillonner ?

Avant de réaliser une campagne d'échantillonnage, il est important de vérifier que l'ensemble des autorisations nécessaires au bon déroulement des prélèvements et de l'acheminement des échantillons ainsi que du matériel ont été obtenues. Au niveau international, l'Accès aux ressources génétiques et le Partage juste et équitable des Avantages découlant de leur utilisation (APA) est encadré par le protocole de Nagoya, adopté en 2010 lors de la 10ème Conférence des Parties contractantes à la Convention sur la Diversité Biologique (pour plus d'informations : <https://absch.cbd.int/fr/>). Cependant, en France métropolitaine, les échantillonnages réalisés pour des études basées sur l'analyse de l'ADNe et conduites à des fins d'inventaires de biodiversité ne rentrent pas dans le cadre de ces accords (article L412-4 du code de l'environnement). Il est important de noter que ces procédures peuvent tout de même être potentiellement appliquées dans les territoires ultra-marins. Les conditions d'accès aux sites de prélèvement peuvent aussi être réglementées et nécessiter, au préalable, des demandes d'autorisation auprès du gestionnaire ou propriétaire du site.

CHAPITRE 04.

Analyses laboratoire et bioinformatique

À retenir

Contraintes laboratoires liées à l'étude de l'ADNe rare

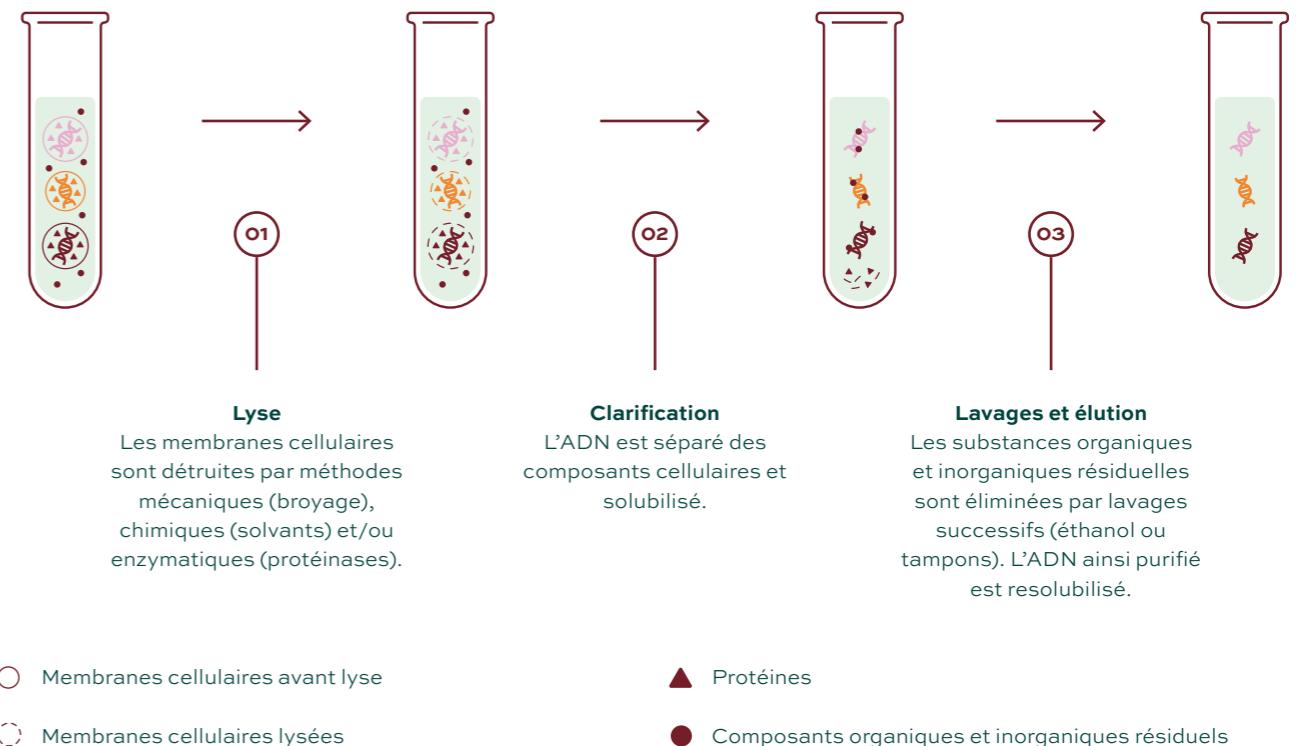
L'analyse de l'ADNe rare impose au laboratoire partenaire ou prestataire de respecter un ensemble de contraintes pour garantir que l'ADN extrait et amplifié à partir d'un échantillon environnemental ne résulte pas d'une contamination. Dans un premier temps, la plateforme d'analyse doit être organisée en plusieurs salles distinctes pour assurer une séparation physique entre les étapes pré-PCR et post-PCR, la PCR (Polymerase Chain Reaction) étant l'étape d'amplification de l'ADN. Ainsi, les salles dédiées à la préparation du matériel et à l'extraction de l'ADN (pré-PCR, où l'ADN est en faible concentration) doivent être maintenues en surpression pour empêcher l'entrée de contaminants extérieurs et être équipées d'un sas d'entrée, permettant au personnel de s'équiper avec du matériel dédié et à usage unique (charlottes, masques, double paire de gants, combinaisons, chaussures spécifiques et sur-chaussures). En revanche, les salles destinées à l'amplification de l'ADN et au séquençage (post-PCR, où l'ADN est abondant) ne nécessitent pas de sas d'entrée, mais doivent être

maintenues en dépression ou isolées dans des infrastructures séparées (par exemple, bâtiments ou étages séparés) afin d'éviter une contamination des autres zones par l'ADN présent en très forte concentration. Le flux de travail entre ces différentes salles doit être unidirectionnel, suivant un système de marche en avant, de manière à ce que le matériel et le personnel circulent toujours de la salle où l'ADN est le moins concentré vers la salle où l'ADN est le plus concentré. En parallèle, il est essentiel de décontaminer les surfaces et les matériaux avec un agent destructeur de l'ADN (ex. javel) entre chaque série d'analyse, tout en assurant également une décontamination régulière de l'ensemble des laboratoires. Enfin, des contrôles négatifs, et éventuellement des contrôles positifs, doivent être réalisés à chaque étape du processus analytique. Sans le respect de l'ensemble de ces exigences, il est impossible d'éviter les contaminations croisées et de garantir la qualité du travail réalisé au laboratoire lorsque le nombre d'échantillons analysés devient important.

Extraction de l'ADN

L'extraction permet d'isoler l'ADN contenu dans les échantillons environnementaux préalablement collectés^[3]. Elle se compose de quatre étapes principales^[3] – lyse, clarification, lavages et élution – pouvant être réalisées à l'aide de protocoles à façon (ex. phénol-chloroforme) ou de kits commerciaux^[3].

^{[20], [21]}. Indépendamment de la méthode mise en œuvre, l'ADN extrait peut ensuite être analysé pour détecter une espèce cible par approche spécifique ou pour étudier plusieurs espèces appartenant à un même groupe taxonomique par approche multispécifique ou metabarcoding de l'ADNe.



À retenir

Kits commerciaux ou méthodes personnalisées

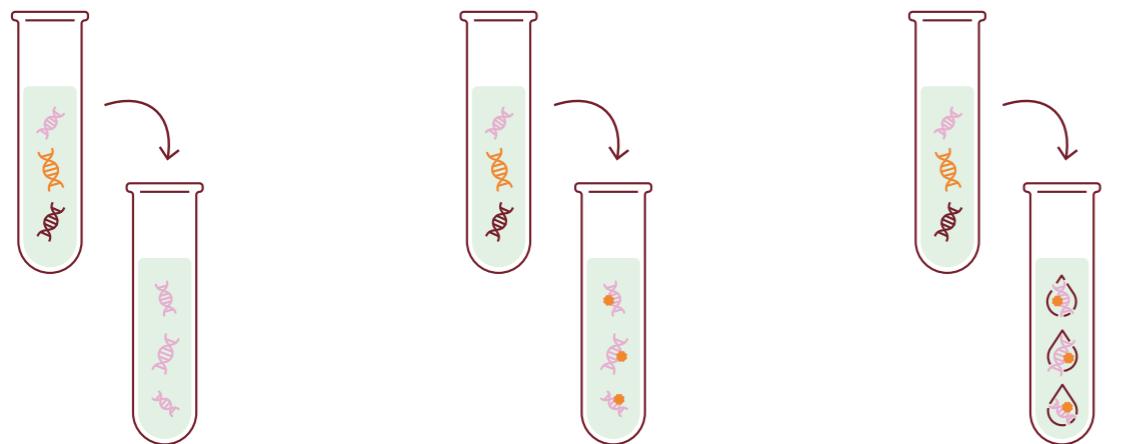
Les kits commerciaux garantissent la standardisation et limitent les risques de contamination des produits et du matériel utilisés tout en réduisant les risques liés à la santé et à la sécurité du personnel de laboratoire. Leur utilisation est donc recommandée pour garantir la reproductibilité des résultats, dans le cadre d'études réglementaires ou industrielles réalisées de façon régulière et à haut débit^[21]. De nombreux kits sont aujourd'hui disponibles sur le marché et leur efficacité est dépendante du matériel de filtration choisi (filtre plat ou encapsulé), de la méthode de conservation associée, des organismes ciblés ainsi que des caractéristiques du milieu (par exemple, la présence de composés organiques ou inorganiques résiduels peut inhiber les étapes laboratoire réalisées en aval s'ils ne sont pas éliminés correctement)^[21]. Un kit d'extraction doit donc être sélectionné selon le matériel utilisé en amont et les objectifs de l'utilisateur. Afin de limiter les risques de contamination, nous préconisons également de choisir une méthode limitant les temps d'exposition des échantillons à l'air libre (par exemple, lorsqu'une méthode d'extraction sans centrifugation et utilisant une chambre à vide est mise en œuvre, les échantillons sont maintenus ouverts pendant toute la durée de l'extraction et sont ainsi exposés pendant plusieurs heures).

CHAPITRE 04.

Détection d'une espèce cible par approche spécifique

L'approche spécifique consiste à révéler la présence d'une espèce d'intérêt par détection d'une portion précise de son ADN. En effet, si cette région, aussi appelée marqueur génétique, est présente dans l'échantillon, elle peut être ciblée grâce à des amores, consistant en de courtes (18-23 pb)

séquences synthétiques d'ADN, puis amplifiée par polymérisation en chaîne (PCR). D'autres méthodes dérivées de la PCR, telles que la qPCR (PCR quantitative) ou la dPCR (PCR digitale), peuvent également être utilisées pour amplifier et potentiellement quantifier le fragment génétique de l'espèce



PCR conventionnelle

Amplification et détection par présence – absence de l'ADN de l'espèce cible
La PCR est une méthode d'amplification d'un fragment spécifique d'ADN permettant d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Dans le cadre de l'approche spécifique, les résultats sont visualisés par migration des fragments d'ADN amplifiés sur un gel d'agarose maintenu sous l'effet d'un champ électrique (électrophorèse)

PCR quantitative

Amplification et quantification de l'ADN de l'espèce cible
La PCR quantitative, ou qPCR, est une méthode dérivée de la PCR se basant sur la mesure d'un signal fluorescent émis lors de l'amplification du fragment d'ADN ciblé. Les résultats sont visualisés informatiquement.

PCR digitale

Amplification et quantification de l'ADN de l'espèce cible
La PCR digitale, ou dPCR, est une méthode dérivée de la qPCR où le mélange réactionnel est fractionné en milliers de microréactions. Les résultats sont visualisés informatiquement.

La réaction PCR (PCR conventionnelle et méthodes dérivées) se compose de plusieurs cycles d'amplification. Chaque cycle comporte 3 étapes : une phase de dénaturation de l'ADN (l'ADN double brin est séparé en 2 brins distincts), une phase d'hybridation des amores et une phase de synthèse de l'ADN complémentaire.

★ Vocabulaire



***Marqueur** : Région spécifique et connue de l'ADN ayant une localisation précise dans le génome (par exemple, un gène ou une partie d'un gène).

***Amores** : Courtes séquences synthétiques d'ADN permettant de cibler un marqueur génétique et d'initier son amplification par PCR (ou autres méthodes dérivées).

À retenir

PCR conventionnelle, quantitative ou digitale

A l'heure actuelle, la qPCR, plus fiable que la PCR conventionnelle dont l'interprétation des résultats peut être subjective, est la méthode la plus couramment utilisée^{[3], [21]}. Cependant, certaines études suggèrent que la dPCR

offre de plus grandes sensibilité et précision d'analyse et la méthode tend donc à se développer^[32]. Indépendamment de la méthode employée, les résultats peuvent être influencés par les réactifs et les protocoles utilisés.

Nombre de cycles PCR

Plus le nombre de cycles PCR réalisés est important, plus le nombre de molécules d'ADN amplifiées augmente^[26]. Dans le cas d'inventaires et de suivis de la biodiversité, nécessitant la prise en compte de l'ADNe rare, nous recommandons d'effectuer entre 40 et 50 cycles PCR (dans le cas d'études de com-

munautés plus abondantes, comme les bactéries, 25 à 35 cycles PCR suffisent). Ces valeurs favorisent l'amplification de l'ADN rare mais augmentent également les risques de contamination et donc de détection de faux-positifs. Elles nécessitent donc des niveaux de précaution importants.

Nombre de répliques PCR

Lors d'une réaction PCR (PCR conventionnelle ou méthodes dérivées), un sous-échantillon de l'ADN total extrait est utilisé (de 1 à 10 % environ)^[3]. Ainsi, même si l'ADN ciblé est présent dans l'extrait d'ADN obtenu, il peut ne pas être présent lors de la réaction PCR et ne pas être détecté. Pour pallier cette problématique et augmenter la probabilité de détection de l'ADN des espèces ciblées, plusieurs réactions PCR peuvent être réalisées pour un seul et même échantillon, on parle alors de répliques PCR. En combinant répliques terrain (Cf. chapitre 3) et répliques labo (extraction, PCR, séquençage), il est généralement

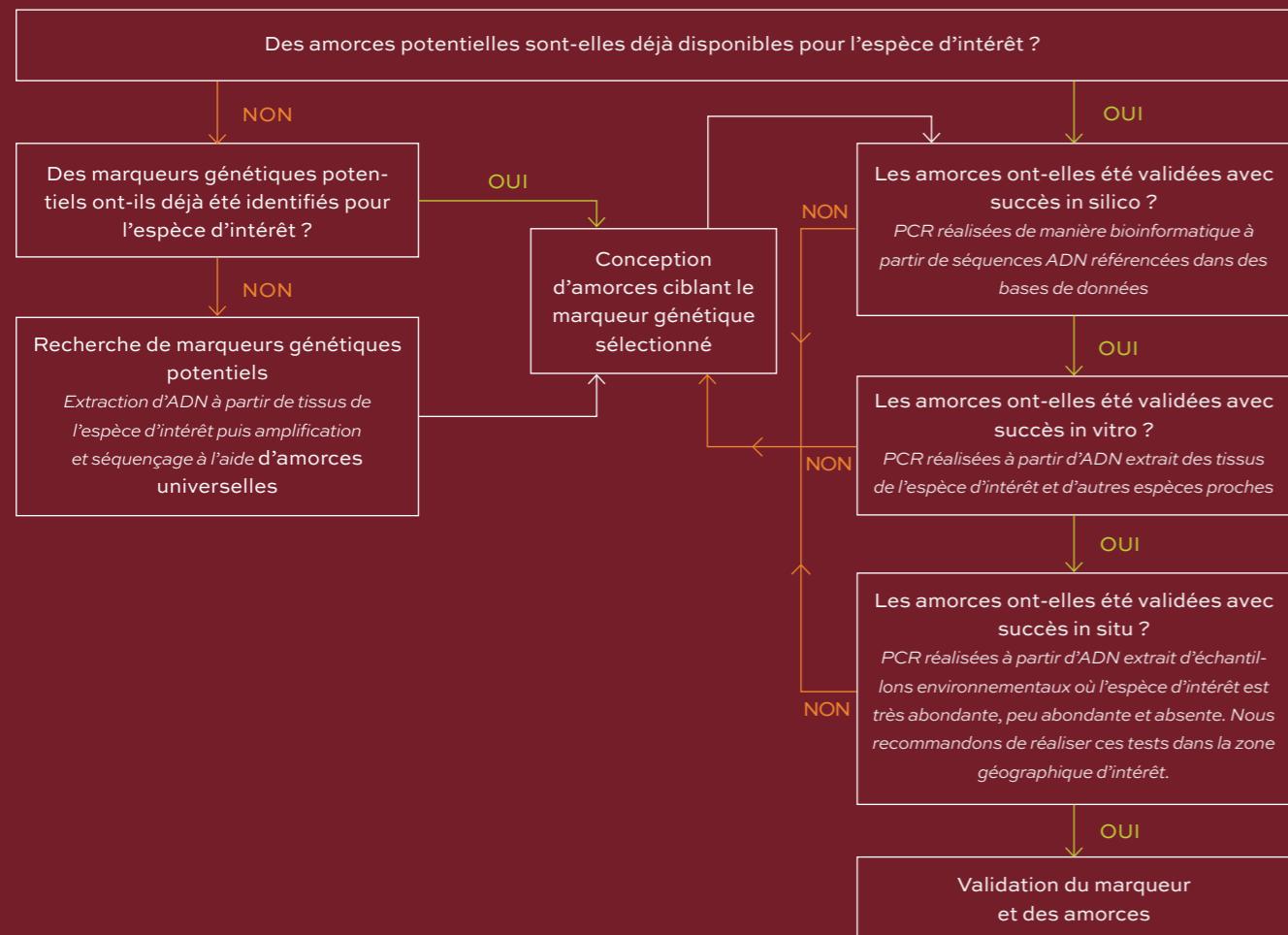
recommandé d'effectuer au moins trois répliques par échantillon. Cependant, ce chiffre doit être supérieur à six, lorsque la probabilité de détection des espèces est égale à 0,5^[33]. En l'absence de cette information, un minimum de huit répliques devra être réalisé^[33]. Selon les objectifs de l'utilisateur, et notamment dans le cas d'analyses de l'ADNe rare, il est conseillé d'augmenter davantage le nombre de répliques pour favoriser la détectabilité des espèces mais aussi pour permettre d'évaluer la fréquence et l'occurrence de l'ADN de l'espèce ciblée à travers les répliques réalisées^{[21], [33], [34]}.

À retenir

Choix du marqueur et des amorces

Les amorces doivent cibler des portions spécifiques d'ADN de l'espèce étudiée (appelée sites d'hybridation) et permettre d'amplifier une région d'ADN hautement conservée mais également suffisamment variable pour garantir qu'aucun autre taxon ne soit détecté lors de l'analyse. Ce point est important pour assurer la spécificité des amorces utilisées dans le cadre d'une approche spécifique et ainsi limiter les risques de faux-négatifs ou de faux-positifs pouvant avoir des conséquences non négligeables dans le cas d'inventaires et de suivis de la biodiversité (Cf. chapitre 2). Ainsi, nous recommandons que les amorces utilisées aient été préalablement validées selon un protocole en

trois étapes – *in silico*, *in vitro*, *in situ*^{[35], [36]}. Outre un marqueur génétique précis, les amorces doivent également cibler une séquence courte d'ADN (moins de 150 paires de bases ou pb) pour permettre son amplification à partir d'ADN potentiellement dégradé (Cf. chapitre 2)^[26]. La conception d'un couple optimal d'amorces peut donc être chronophage et coûteuse. Nous mettons également en garde l'utilisateur que la publication d'un couple d'amorces dans la littérature scientifique n'est malheureusement pas forcément gage de qualité et certaines amorces sont susceptibles d'amplifier d'autres espèces que celle ciblée. Nous recommandons donc de travailler avec un expert technologique de confiance.

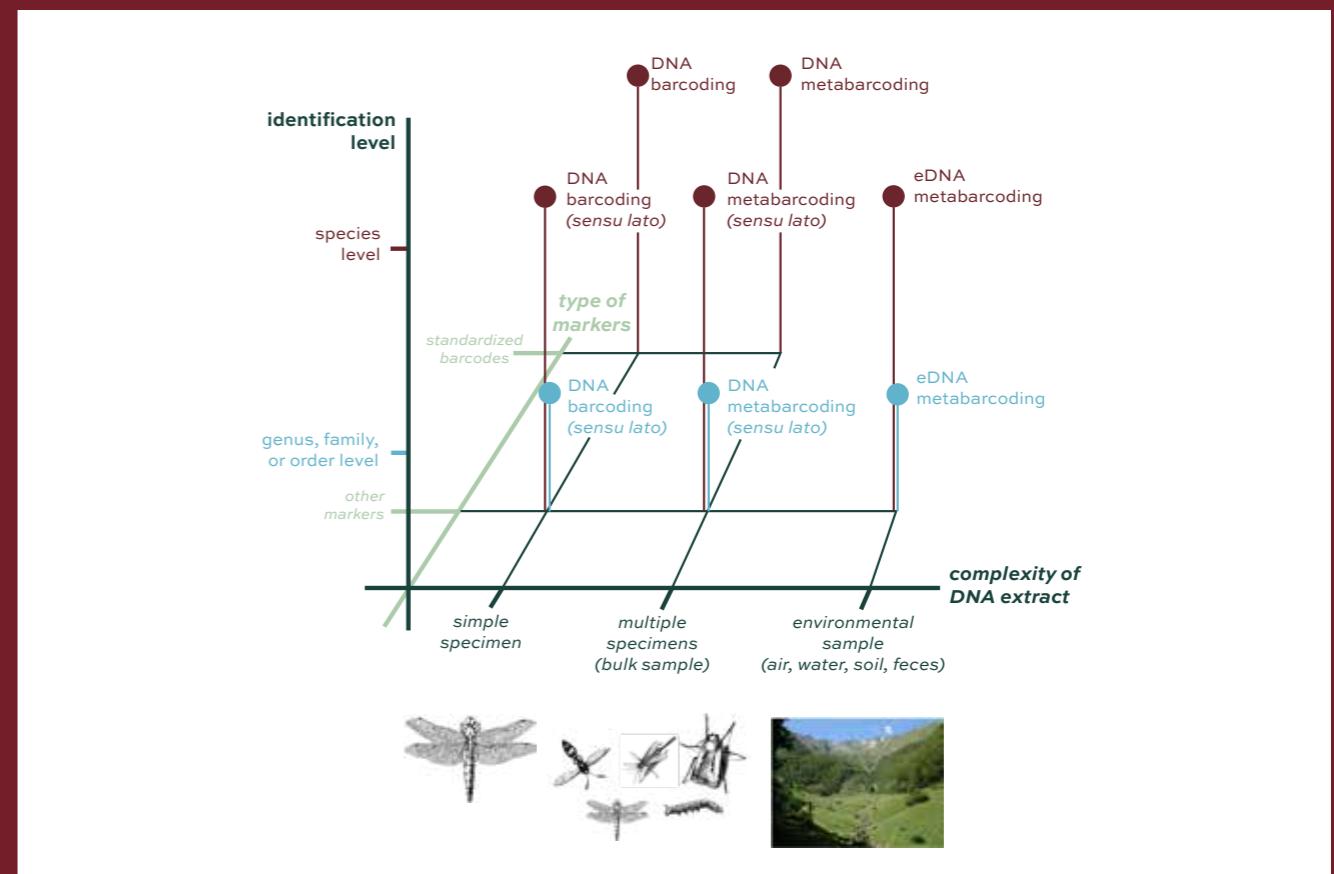


Pour aller plus loin

Barcode de l'ADN et approche spécifique par ADN

L'approche spécifique consiste en l'identification d'une espèce cible à partir d'un échantillon environnemental. Le terme barcoding de l'ADN peut parfois être rencontré mais ne doit pas être confondu avec celui de barcoding de l'ADN faisant référence à la méthode décrite par

Hebert et al. (2003) et utilisée dans le cadre des travaux menés par le consortium iBOL (International Barcode Of Life). Pour éviter toute confusion, nous recommandons de ne plus utiliser le terme barcoding de l'ADN.



Terminologie suggérée par Taberlet et al. (2012) pour l'identification des taxons basée sur l'ADN selon le type de marqueur utilisé (en vert), le niveau d'identification (axe des ordonnées) et la complexité de la matrice d'ADN (axe des abscisses).



Pour en savoir plus : Hebert et al. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>



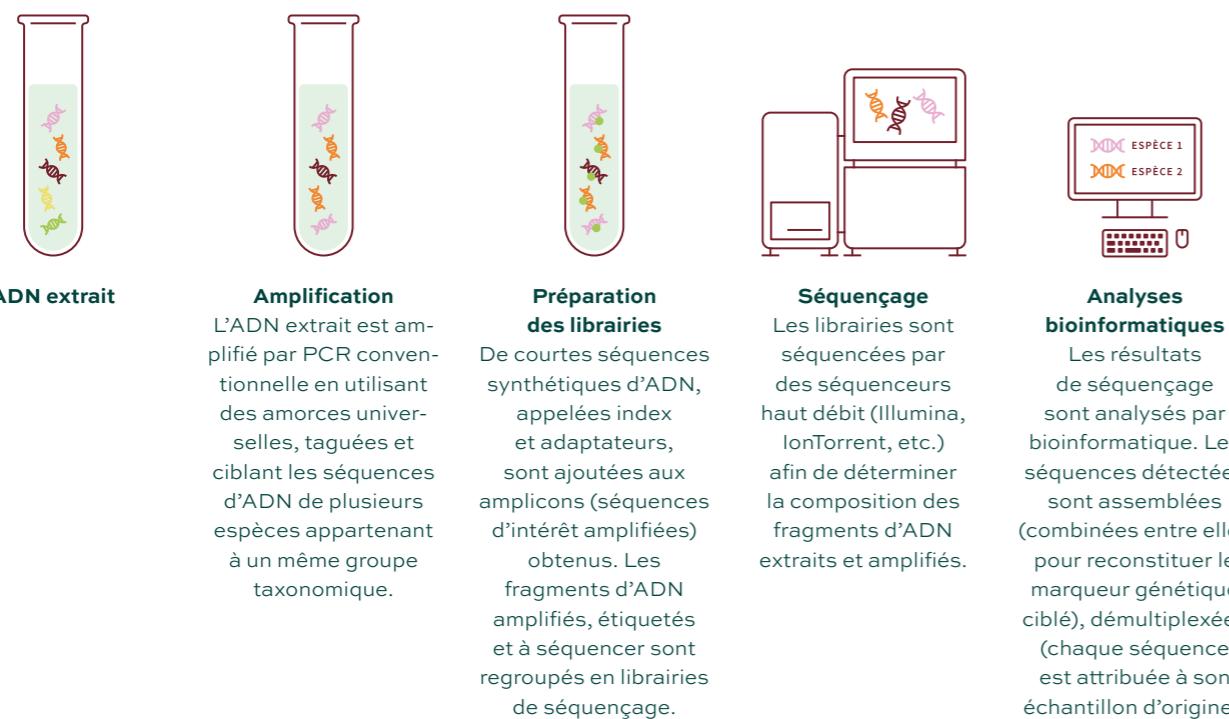
Pour en savoir plus : La définition du barcoding de l'ADN donnée par le consortium iBOL. <https://ibol.org/phases1/about-us/what-is-dna-barcoding/>

CHAPITRE 04.

Approche multispécifique ou metabarcoding de l'ADNe

L'approche multispécifique permet l'identification simultanée et sans a priori de plusieurs espèces distinctes appartenant à un même groupe taxonomique (du règne – bactéries, eucaryotes, etc. – à des niveaux taxonomiques intermédiaires – poissons, crustacés, etc.)^[21]. Pour cela l'ADN extrait est d'abord amplifié par PCR conventionnelle en utilisant des amores universelles. Les fragments

d'ADN amplifiés (aussi appelés amplicons) sont ensuite séquencés et les résultats de séquençage sont analysés par méthodes bioinformatiques. Un tableau final recensant les espèces mises en évidence et le nombre de fois où les séquences associées ont été détectées par échantillon est alors obtenu et peut être analysé par l'expert écologue.



Vocabulaire

***Tag :** Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées et consistant en un identifiant unique pour chaque échantillon ou chaque réplica PCR^[27].

***Adaptateur de séquençage :** Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées pour permettre leur fixation sur le support du séquenceur^[21].

***Index :** Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées et consistant en un identifiant unique pour chaque librairie de séquençage^[21].

***Librairie de séquençage :** Ensemble des amplicons (séquences d'intérêt amplifiées) à séquencer et comportant à leurs extrémités des tags, des adaptateurs de séquençage et des index^[27].

À retenir

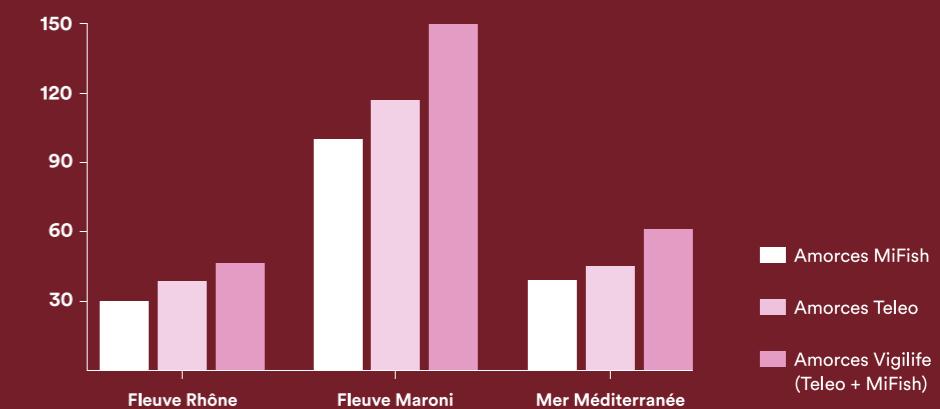
Choix des amores et du marqueur



Pour en savoir plus : Polanco et al. 2021. Comparing the performance of 12S mitochondrial primers for fish environmental DNA across ecosystems. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.232>

Comme lors d'une approche spécifique, les amores utilisées dans le cadre du metabarcoding de l'ADNe doivent cibler un marqueur génétique court (de 200 à 500 pb pour les microorganismes et moins de 120 pb pour les macroorganismes^[21]) et avoir été préalablement validées *in silico*, *in vitro* et *in situ*^{[26], [27]}. De plus, la région d'ADN ciblée doit être suffisamment variable d'une espèce à l'autre afin d'obtenir une résolution taxonomique optimale. Inversement, les

sites d'hybridation des amores doivent être conservés et ubiquitaires au sein du groupe taxonomique d'intérêt pour permettre une amplification fiable et équivalente de l'ensemble des espèces. Le choix des amores a un effet déterminant sur les espèces détectées. Ainsi, à partir d'un même extrait d'ADN, le nombre d'espèces identifiées peut être très variable en fonction des amores sélectionnées.



Nombre de cycles et de réplicas PCR

Les problématiques de l'analyse spécifique et du metabarcoding de l'ADNe sont identiques, se référer au

paragraphe portant sur la détection d'une espèce cible pour de plus amples informations.

Méthode de préparation des librairies

Il existe trois méthodes de préparation des librairies de séquençage : la PCR en une étape, la PCR en deux étapes et la ligation^[27]. Lors de la PCR en une étape, les tags, les index et les adaptateurs sont ajoutés directement aux amores lors de leur synthèse. Cette méthode permet de gagner du temps lors de la préparation des échantillons pour le séquençage mais les amores étant très longues (du fait de l'ajout d'autres séquences), elle est également plus onéreuse. La longueur des amores peut aussi affecter l'efficacité de la réaction d'amplification et ainsi réduire la probabilité de détection de l'ADN rare^[21]. Lors d'une PCR en deux étapes, la première réaction d'amplification PCR est réalisée en utilisant des amores non taguées, ciblant le marqueur génétique

d'intérêt et contenant des sites d'hybridation pour les séquences supplémentaires. Une seconde PCR est ensuite effectuée pour ajouter les index et les adaptateurs. Bien que cette méthode permette de résoudre partiellement les problématiques liées à la longueur des amores, elle est néanmoins plus facilement sujette aux contaminations croisées^[21]. A l'heure actuelle, elle reste l'une des méthodes les plus utilisées car elle est plus économique et facile à mettre en œuvre. La ligation consiste à ajouter les séquences supplémentaires (index et adaptateurs) à la suite de la réaction d'amplification par PCR, réalisée à l'aide d'amores taguées, en utilisant des enzymes appelées ligases. Cette méthode limite les risques de contamination.

À retenir

Séquençage – technologie et profondeur

Il existe différentes technologies de séquençage qui se distinguent par leur performance (temps d'analyse), leur capacité (nombre de séquences pouvant être lues ou "reads") et leur taux d'erreur. A l'heure actuelle, en raison de son rapport qualité/prix et de son taux d'erreur relativement faible, la technologie Illumina® est la plus utilisée^[38]. Au-delà du choix du séquenceur, la profondeur de séquençage est un point essentiel à prendre en compte. Cette notion fait référence au nombre total de séquences

lues (les lectures de séquence sont aussi appelées reads) attendues par échantillon. Elle est dépendante des capacités du séquenceur et du nombre total d'échantillons séquencés. En général, les études portant sur l'analyse de l'ADNe visent une profondeur de séquençage comprise entre 50 000 et 200 000 séquences par échantillon. Cependant, lors d'études où la détection d'espèces rares représente un enjeu important, il est conseillé d'augmenter cette profondeur^[21].

Analyses bioinformatiques et bases de référence génétique

A l'heure actuelle, il existe de nombreux outils bioinformatiques destinés à l'analyse des données de séquençage. Cependant, chaque méthode est susceptible de donner des résultats différents voire incohérents d'un point de vue écologique si elle n'est pas choisie et utilisée correctement. Une analyse bioinformatique doit donc être optimisée selon le marqueur génétique ciblé, le groupe taxonomique d'intérêt et le séquenceur choisi. Indépendamment de la méthode utilisée, les séquences finalement obtenues sont comparées à des banques de séquences d'ADN d'organismes connus appelées bases de références génétiques. Afin de pouvoir identifier une espèce à partir de son ADN, il est donc nécessaire que sa séquence d'ADN pour le marqueur utilisé ait été préalablement répertoriée. Il existe plusieurs bases de données publiques telles que celles du NCBI (National Center for Biotechnology Information), de la DDBJ (DNA Data Bank of

Japan) et de l'ENA (European Nucleotide Archive) qui forment un consortium. Bien qu'elles soient très utilisées et étendues, ces bases comportent des erreurs pouvant affecter la qualité de l'assignation taxonomique. Pour pallier cela et garantir une assignation plus qualitative, il est possible de construire une base de références génétiques en séquençant des tissus d'espèces connues (par exemple, prélevées sur le terrain et identifiées par un taxonomiste, issues de collection ou de débarquements de pêche professionnelle). Nous recommandons d'utiliser des séquences génétiques de référence issues d'organismes de la zone géographique d'intérêt en s'appuyant sur l'expertise des taxonomistes. Enfin, ces données doivent être régulièrement mises à jour afin de suivre les évolutions taxonomiques en lien avec le référentiel taxonomique national TaxRef (<https://inpn.mnhn.fr/programme/referentiel-taxonomique-taxref>).

Pour aller plus loin

Analyses bioinformatiques et regroupement de séquences

L'étape de regroupement des séquences, réalisées lors des analyses bioinformatiques, peut conduire à la formation d'OTUs (ou MOTUs, pour Molecular Operational Taxonomic Units ou unités taxonomiques opérationnelles moléculaires) ou d'ASVs (pour Amplicon Sequence Variants ou variants de séquence d'amplicon). Un OTU est un groupe de séquences identiques

entre elles jusqu'à un certain seuil de similarité. Parallèlement, un ASV consiste en une séquence principale et en plusieurs autres séquences proches, moins abondantes et considérées comme des erreurs de cette séquence principale. La construction d'un ASV nécessite donc une étape préliminaire d'identification des erreurs de séquençage^[39].

Pour aller plus loin

Mise en place d'une base de références moléculaires pour les poissons d'eau douce de l'Hexagone

Gaël Denys, (responsable ichtyofaune de France, PatriNat / OFB),
Vincent Hay, (ichtyologue, MNHN),
Agnès Dettai (ichtyologue, MNHN)

La détection de taxons par ADNe repose sur l'identification des haplotypes obtenus à partir de séquences issues de bases de références moléculaires publiques (exemple : GenBank) ou privées. Actuellement les bases de références sont constituées soit à partir de vouchers en collection, soit à partir de tissus collectés sur du matériel vivant sans qu'il y ait systématiquement de preuve quant à l'exactitude des identifications ; la deuxième option étant actuellement majoritairement appliquée.

La construction d'une base de références moléculaires à partir des données publiques pose certains problèmes. En effet, tous les auteurs n'utilisent pas les mêmes marqueurs. Les approches de metabarcoding utilisent généralement les marqueurs 12S ou 16S, alors que les approches monospécifiques utilisent plus souvent d'autres marqueurs tels que le COI ou le Cytb. De plus, certains marqueurs ne sont pas disponibles pour certains taxons. Des incertitudes demeurent quant à l'identification des espèces car souvent les séquences ne sont pas associées à un spécimen en collection. Seule une base de références moléculaires à partir de mitogénomes pourrait relier les différentes bases de références déjà existantes. Néanmoins, seulement environ 10% des mitogénomes disponibles dans GenBank sont associés à un spécimen enregistré en collection, et sont donc considérés comme fiables.

Depuis ces vingt dernières années, les connaissances taxonomiques ont

fortement évolué dans l'Hexagone en ichtyologie avec 40 nouvelles espèces apparues sur 120 dans le référentiel taxonomique national TaxRef. Certaines sont des espèces introduites (et parfois invasives), d'autres sont des espèces nouvellement décrites ou revalidées selon une approche de taxonomie intégrative : approche combinant les données morphologiques, les analyses moléculaires mais aussi les traits de vie, l'écologie, etc...

Au vu de tous les éléments énumérés précédemment, le Muséum national d'Histoire naturelle, en collaboration avec l'OFB, se donne pour objectif de constituer une base de références moléculaires comprenant notamment les génomes mitochondriaux complets des espèces présentes dans l'Hexagone. Pour cela, lorsque cela est possible, des spécimens types dits « porte-nom » seront inclus afin d'assurer l'affiliation du « bon nom » à la séquence génétique de référence. Quant aux spécimens non-typés, ils seront représentatifs du territoire français, et pourront être enregistrés en collection afin d'attester l'identification.

Cette base de références moléculaires nationale - constituée des marqueurs les plus couramment utilisés - sera accessible à tous et pourra être utilisée pour tout type d'expertise en lien avec l'ADN environnemental mais aussi pour des études utilisant le barcoding par exemple. Le Muséum national d'Histoire naturelle a pour objectif à terme de l'étendre à l'ensemble des eucaryotes de l'Hexagone et des Outre-mer.

CHAPITRE 05.

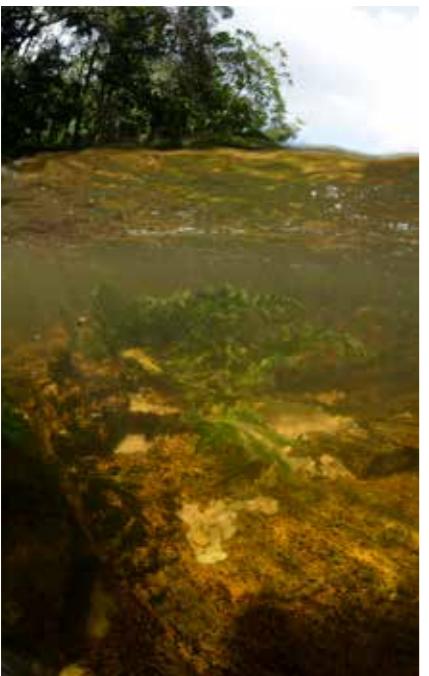
Limites et avantages de l'ADNe

Limites

● Limites biologiques

Les analyses de l'ADNe se basent sur la détection d'ADN dans l'environnement et non sur l'observation directe des organismes dans leur milieu. Ainsi, les données individuelles telles que l'âge, le sexe, la taille ou l'état de santé des individus ne peuvent pas être obtenues. De la même manière, une quantification absolue des espèces détectées ne peut être réalisée. En effet, les quantités d'ADN produites et relarguées par les organismes varient d'un groupe taxonomique mais également d'un individu à l'autre en raison de nombreux facteurs bi-

tiques et abiotiques (état de stress, comportement et âge des individus, température du milieu, etc.). Néanmoins, il existe une corrélation positive entre la biomasse des individus dans le milieu et les concentrations de matériel génétique récoltées^[40]. Ainsi, l'analyse de l'ADNe peut, dans certains cas, être un indicateur, ou proxy, de l'abondance des espèces.



Il est également difficile d'étudier des espèces consommées ou élevées car les traces de leur ADN peuvent être omniprésentes dans l'environnement du fait des rejets anthropiques (stations d'épuration, stations aquacoles, etc.). Au-delà des espèces d'intérêt économique, l'étude de certains taxons peut être limitée en raison d'une résolution taxonomique trop faible pour le marqueur sélectionné (par exemple, certaines espèces génétiquement trop proches ne peuvent pas être distinguées avec des amores classiques) ou d'un manque de complétude des bases de références génétiques utilisées.

Enfin, à l'heure actuelle, aucune technique d'inventaire, qu'elle soit traditionnelle ou basée sur l'analyse de l'ADNe, ne permet d'identifier des espèces hybrides ou l'occurrence d'une introgression génétique au sein d'une population. En effet, ces différents cas de figure nécessitent des analyses génétiques approfondies réalisées à partir de tissus des organismes concernés ainsi qu'une validation par un expert (taxonomiste de préférence) en parallèle.

● Limites techniques

Comme pour la majorité des autres techniques d'inventaires existantes, les outils basés sur l'analyse de l'ADNe sont susceptibles de produire des faux-positifs et des faux-négatifs. Ces biais peuvent découler de choix méthodologiques inadaptés aux besoins de l'utilisateur ou de pratiques inadéquates contribuant à la contamination et la dégradation des échantillons récoltés. En effet, chaque étape du processus, du prélèvement aux analyses bioinformatiques, offre un large panel de méthodes plus ou moins optimisées pour répondre aux objectifs fixés au départ par l'utilisateur (groupe taxonomique ciblé, site d'étude d'intérêt, applications, etc.). Par exemple, les faux-négatifs peuvent être causés par un effort d'échantillonnage insuffisant ou par un plan d'échantillonnage inapproprié ne permettant

pas de collecter l'ADN de(s) (l')espèce(s) ciblée(s). Ils peuvent également résulter d'une dégradation de l'ADN, lorsque les précautions de manipulation et de conservation des échantillons ne sont pas respectées. Inversement, les faux-positifs peuvent être causés par des contaminants extérieurs introduits dès l'échantillonnage ou pendant l'analyse. Ainsi, tout comme pour les méthodes d'inventaire traditionnelles, les résultats issus d'une analyse de l'ADNe peuvent nécessiter une validation par un expert écologue ou une utilisation combinée avec une autre technique complémentaire de recensement de la biodiversité.

Du fait des différentes étapes réalisées au laboratoire, les délais d'une analyse de l'ADNe sont plus longs par rapport aux méthodes traditionnelles (Cf. chapitre 3).

La détection de certaines espèces revêt des enjeux importants lors d'inventaires et de suivis de la biodiversité. Il est donc primordial de s'assurer de l'absence de contamination du matériel utilisé. En conséquence, les analyses ADNe emploient de nombreux consommables à usage unique accumulant ainsi les déchets. Les enjeux pour l'avenir consisteront à limiter ces derniers et promouvoir une filière de recyclage pour limiter les impacts d'un outil destiné à protéger la biodiversité.



Pour aller plus loin

Les données d'absence ou données nulles

Dans le cas des techniques traditionnelles, les données d'absence ou données nulles - dans la mesure où l'absence n'est pas toujours vérifiable - sont rarement bancarisées et diffusées dans les systèmes d'information.

Or l'absence de détection d'une espèce ne signifie pas forcément qu'elle est absente du site, il peut s'agir d'un faux négatif, c'est-à-dire que l'espèce peut être présente sur le site mais ne pas être détectée. Pour diverses raisons

déjà évoquées dans ce guide, ceci est également le cas pour l'ADNe.

Lorsqu'on analyse l'ADNe et qu'une espèce recherchée n'est pas détectée, nous recommandons de noter les données d'absence ou données nulles lorsqu'elles ont été validées par un expert de l'espèce ou du groupe ciblé. Ces dernières peuvent en effet présenter un intérêt pour les suivis et méritent de mener une réflexion pour qu'elles puissent être considérées à l'avenir.

CHAPITRE 05.

Avantages

● Avantages biologiques

Malgré un certain nombre de limites, les méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe ont fait leurs preuves en milieux aquatiques pour la détection simultanée, et à partir d'un seul échantillon d'eau, d'espèces appartenant à différents groupes taxonomiques. Grâce à ces méthodes sensibles, il est désormais possible d'étudier les organismes difficilement observables par les méthodes classiques car rares (très faible densité), trop petites ou présentes uniquement à un stade larvaire. Elles s'avèrent particulièrement utiles dans le cas d'espèces difficilement capturables qui requièrent un échantillonnage trop laborieux, coûteux, dangereux ou invasif. L'analyse de l'ADNe peut également être utile pour la détection précoce d'espèces non indigènes potentiellement invasives ainsi que difficilement différenciables à l'œil nu, surtout dans un contexte où les experts naturalistes et taxonomistes sont trop peu nombreux face aux menaces pesant sur la biodiversité.

● Avantages techniques

Au-delà de la sensibilité accrue des méthodes ADNe, elles sont faciles à mettre en œuvre sur le terrain et ne nécessitent que des autorisations d'accès aux sites d'échantillonnage à l'inverse d'autres méthodes d'inventaire plus invasives. Elles permettent de réduire les biais dus aux conditions de terrain potentiellement défavorables (conditions d'observation), aux erreurs associées à l'expérience de l'observateur et à la variabilité des efforts de prospection et ce alors que l'échantillonneur peut être formé en seulement quelques heures. Les périodes passées sur le terrain peuvent être plus larges sur la saison et plus flexibles sur la journée. Les prélèvements sont non invasifs et peuvent être réalisés sans toucher les individus, réduisant ainsi les éventuelles sources de stress et le transfert de potentiels pathogènes. Pour ces mêmes raisons, il est également possible d'échantillonner dans des zones où la pêche est interdite, ou en raison de la dangerosité ou du niveau de pollution du site. Lorsque les courants sont trop forts pour naviguer en sécurité, le prélèvement peut être réalisé depuis la berge ou les ouvrages (tels que les ponts). Les méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe assurent ainsi une plus grande sécurité du personnel impliqué. Sur le terrain, elle permet donc un gain de temps et d'énergie dont découle un ratio coûts/rentrées souvent plus intéressant.



Prélèvement à Saint-Simon le 12/06/2023

exemple, pour obtenir un signal fort alors qu'il y a en réalité très peu d'individus à cet endroit. Un développement intéressant serait de pouvoir aboutir à des informations plus précises sur l'abondance des espèces et la taille des populations. De plus, pour notre territoire, il serait intéressant de pouvoir distinguer la grande alose de l'aloise feinte, sachant que sur certains sites bloquant, les deux espèces peuvent se reproduire ensemble et donner naissance à des hybrides. Or l'ADNe, aujourd'hui, ne permet pas d'identifier les hybrides. Comme inconvénient on peut aussi citer l'absence de mesures biométriques des individus, le besoin d'avoir des bases génétiques fiables, complètes et accessibles et enfin les délais d'obtention des résultats. En effet, ils ne sont pas disponibles rapidement après les prélèvements, la saison migratoire et la reproduction des aloises sont terminées empêchant de valoriser les informations en adaptant/complétant les suivis de terrain de l'année en cours. Enfin il faut signaler que le coût des analyses est tout de même assez élevé et peut constituer un obstacle pour envisager des suivis d'envergure en routine.

Cette technique est utilisée sur la Charente en complément de suivis sur le terrain : suivi de l'activité de reproduction des grandes aloises la nuit, observations en pied d'ouvrages, recherche de cadavres post-reproduction, recueil d'informations auprès des acteurs locaux (pêcheurs, exploitants de micro-centrales, etc.). Le choix des sites se fait la semaine précédant les prélèvements vers la mi-juin, en fonction des informations récoltées sur le terrain. Le point aval est placé au niveau du dernier indice de présence obtenu et un point est ensuite placé tous les 5 à 10 km, vers l'amont, de préférence en pied d'ouvrage où sur des sites connus de regroupement. Le principe de positionner les points de prélèvement en aval des barrages est lié au point de blocage qu'ils constituent et au mélange de l'eau occasionné par la chute.

Nous sommes convaincus par l'utilité de ce nouvel outil et espérons beaucoup des développements à venir. A ce titre l'EPTB Charente a également utilisé cette technique en 2022 pour cartographier les populations de bivalves sur le fleuve entre Chaniers et Aunac-sur-Charente dans le cadre d'un appel à projet porté par la DREAL Nouvelle-Aquitaine.

★ Paroles d'expert

Audrey Postic-Puivif
Cheffe de projet Poissons
Migrateurs – EPTB Charente

Avantages et limites des outils

ADNe par rapport aux méthodes traditionnelles

L'ADNe est un nouvel outil qui est apparu au bon moment pour les suivis effectués sur la Charente sur les poissons migrateurs. L'EPTB Charente travaille en partenariat avec l'Association Migrateurs Garonne Dordogne Charente Seudre et le Centre pour l'Aquaculture, la Pêche et l'Environnement de Nouvelle-Aquitaine autour d'un programme d'actions unique, pour la sauvegarde et la restauration des poissons migrateurs des bassins Charente et Seudre. Nous approfondissons les connaissances sur ces espèces depuis 2008 et malheureusement nous constatons un déclin « rapide » des effectifs, notamment sur les aloises et les lampreys marins. Là où des prospections

de terrain pouvaient suffire à caractériser la présence des espèces au printemps tous les ans, il y a 10 ans, aujourd'hui cela devient plus compliqué au regard du faible nombre d'individus dans le milieu. Depuis 2019, nous utilisons l'ADNe afin de déterminer les fronts de migration de la grande alose et cela nous permet aussi d'en apprendre davantage sur les autres espèces présentes, qu'elles soient patrimoniales ou invasives comme le silure par exemple.

Cette nouvelle technique de prospection présente de nombreux avantages : performance et fiabilité de détection, facilité de mise en œuvre sur le terrain, gain de

temps et réduction du coût des inventaires, méthode non invasive, outil de surveillance pour la biodiversité, préservation d'introduction de pathogènes dans le milieu. Une spécificité de notre suivi est d'utiliser une embarcation qui nous permet de bien échantillonner les sites sur la Charente. En effet, celle-ci peut être large selon les secteurs, avec des îles voir des bras multiples et le choix des sites est primordial. Il faut bien connaître la répartition des débits, les bras attractifs, le comportement des poissons et les points de blocage.

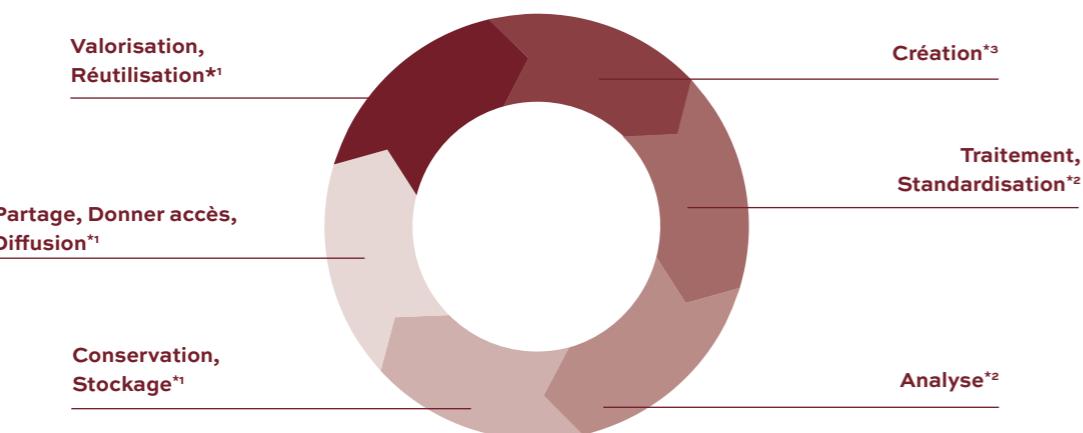
Cette technique présente toutefois quelques inconvénients et il convient d'être prudent dans l'analyse des résultats obtenus et l'utilisation des données. En effet, aujourd'hui il n'est pas possible d'accéder à des informations d'abondance absolue des espèces à partir des données fournies par l'ADNe. L'information obtenue est de type présence/absence ou proportion relative d'espèces, et ce, le jour du prélèvement. Pour l'instant cela nous suffit car nous attendons que la saison de migration soit engagée et la reproduction bien démarrée, afin que les poissons laissent des traces d'ADN dans le milieu. Notre objectif est d'identifier le gradient d'abondance d'Aloses productrices d'aval en amont, afin de déterminer la section du fleuve la plus propice au frai des Aloises. Le nombre de lectures permet d'appréhender ce gradient, mais il suffit de tomber sur 1 cadavre d'aloise post-reproduction très en amont, par

CHAPITRE 06.

Le cycle de la donnée ADNe

Les études fondées sur l'analyse de l'ADNe montrent une hétérogénéité des pratiques dans la gestion et la mise à disposition des données et des bases de références. En parallèle, les principes FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, Reusable) constituent des guides pour que les données

scientifiques deviennent facilement trouvables, accessibles, interopérables avec les outils et les systèmes d'information et réutilisables. Il est donc nécessaire de consigner et de conserver certaines informations au cours du cycle de la donnée.



Définitions

• Données issues d'ADNe

Une donnée d'occurrence d'espèce se compose à minima d'un nom d'espèce, d'un nom d'observateur, d'un lieu et d'une date d'observation.

Un nom d'espèce + **Un observateur**

+ **Un lieu** + **Une date**

Dans le cas d'une donnée issue d'ADNe, l'observateur est la personne qui préleve l'échantillon d'ADNe tandis que le lieu et la date correspondent au lieu et à la date du prélèvement et non d'une observation directe d'espèce. Il est donc nécessaire de bien indiquer que la donnée est issue d'ADNe et de préciser un certain nombre d'informations supplémentaires. Une "donnée élémentaire d'échange" issue d'ADNe se constitue d'un ensemble d'informations minimales indispensables à associer pour considérer que la donnée est de qualité suffisante,

c'est-à-dire en respectant au maximum les principes FAIR. Il s'agit donc, d'une part, de définir les informations obligatoires et facultatives à transmettre et, d'autre part, à quel niveau les transmettre (au niveau de la donnée ou de la métadonnée).

• Notion de métadonnées

Les métadonnées sont des informations relatives au jeu de données (qui est défini comme un regroupement homogène de données ayant des caractéristiques communes et issues d'un même protocole d'acquisition). Elles renseignent notamment sur le processus de collecte, sur les acteurs impliqués (exemple : producteurs et fournisseurs) et sur les modalités de diffusion. Les métadonnées ont pour objectifs de faire le lien avec les autres fichiers, de valoriser les acteurs ayant contribué à l'acquisition des données et de permettre la réutilisation des données dans des méta-analyses.

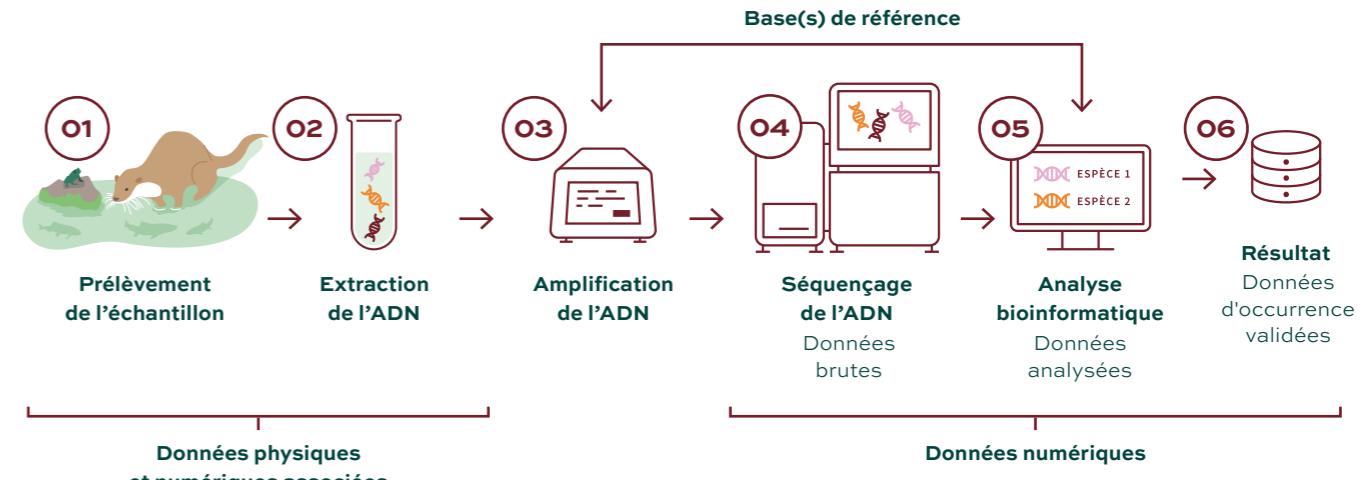
• Types de données issues d'ADNe

Une donnée issue d'ADNe peut se définir par plusieurs types de données en fonction des différentes étapes d'échantillonnage et d'analyse.

Pour une approche spécifique :



Pour une approche multispécifique :



Pour aller plus loin

Certains principes concernant la qualité des données d'observation et des métadonnées sont rappelés sur le site internet de l'INPN (Inventaire National du Patrimoine Naturel). Des informations supplémentaires concernant les principes FAIR sont disponibles sur les sites internet du PNDB (Pôle National de Données de Biodiversité) et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

1/ Qualité des données



<https://inpn.mnhn.fr/programme/donnees-observations-espences/references/qualite>

2/ Métadonnées



<https://inpn.mnhn.fr/programme/donnees-observations-espences/references/metadonnees>

3/ Cycle de vie des données



<https://www.pnbd.fr/fr/ressources/principes-fair-et-cycle-de-vie-des-donnees>

4/ les principes FAIR



<https://www.ouvrirla.science.fr/fair-principles/>

CHAPITRE 06.

À chaque type de donnée peuvent être rattachées plusieurs informations relatives aux différentes étapes nécessaires pour passer d'un prélèvement sur le terrain à l'obtention éventuelle d'un nom d'espèce. Pour le moment, des discussions sont en cours sur le type d'information à collecter. Nous proposons ici une liste non exhaustive pour alimenter ces pistes de réflexion quant aux données issues d'ADNe.

01 Prélèvement de l'échantillon sur le terrain

Métadonnées :

- Informations sur le projet (nom, objectifs, description, identifiant, groupes taxonomiques visés, commanditaire, financeur, porteur de projet, préleveur, partenaires, liens vers les publications et différents types de données associées, etc.)
- Identifiant et lieu de stockage du ou des échantillon(s)

Campagne de prélèvement :

- Nombre de sites échantillonnés

Site échantillonné :

- Identifiant unique pour chaque échantillon
- Matrice de prélèvement (eau)
- Paramètres physico-chimiques de l'eau : température, pH, turbidité, etc.
- Stratégie d'échantillonnage (échantillon indépendant ou pool d'échantillons, transect, point fixe, etc.)
- Volume par échantillon
- Date / heure du prélèvement de l'échantillon et durée de filtration
- Point gps, profondeur
- Typologie des milieux (annexe hydraulique, cours principal, faciès d'écoulement (exemple: radier, plat, profond), etc.)
- Habitats (voir référentiel des habitats HabRef)
- Zone de prélèvement : rives, distance à la berge
- Matériel de collecte (kit / nom du laboratoire)
- Option : condition météo (champ fermé) dont Température (optionnelle)

02 Extraction d'ADN

- Conditions de conservation des échantillons avant et après extraction de l'ADN
- Réalisée sur le terrain ou au laboratoire
- Laboratoire qui fait l'extraction
- Protocole d'extraction
- Quantité d'ADN extraite
- Contrôles négatif / positif
- Identifiant et localisation de l'extrait d'ADN s'il est conservé

03 Phase d'amplification de l'ADN

- Réalisée sur le terrain ou au laboratoire
- Laboratoire qui fait la PCR
- Approche spécifique (PCR, qPCR ou dPCR) ou multispécifique
- Nombre de cycles PCR
- Nombre de répliques PCR
- Répliques rassemblés ou individualisés pour le séquençage (système de tagging)
- Température d'hybridation/cycle PCR
- Machine thermocycleur
- Marqueur (+ région)
- Amorces et base de références utilisée : global/local + version de la base
- Dilution/quantité ADN
- Contrôles négatif/positif
- Si utilisation d'amorces de blocage
- Si qPCR: type de sonde utilisé (Taqman ou autre?)

04 Séquençage

- Réalisé sur le terrain ou au labo
- Identifiant laboratoire/compagnie
- Protocole de préparation des librairies (PCR en 1 étape, PCR en 2 étapes ou ligation)
- Index de séquençage
- Nom et modèle du séquenceur (+ pour Illumina: type de technologie de séquençage: paired-end ou single-read)
- Profondeur de séquençage

05 Bioinformatique

- Outil : script + software/package + version + laboratoire qui fait la bioinformatique (+ optionnel : nom de la personne qui réalise la bioinformatique)
- + Séquences ASV/OTU
- Base de références : noms, version et date de consultation
- % de similarité de regroupement de séquences et/ou d'assignation taxonomique
- Nom du validateur/ expert qui valide si l'espèce assignée est possible
- Nom du taxon validé
- Quantité de données perdues pendant le nettoyage des données, si possible à chaque étape de la procédure bioinformatique.
- Liste des contaminations identifiées
- Optionnel : Nom du taxon assigné avant validation

Conserver, diffuser et utiliser les données

Propriété des données

La propriété des données est à définir au moment de la conception de l'étude. Il s'agit de définir à qui appartiennent les données - voire chaque type de données - et notamment d'indiquer lors de la transmission d'une donnée le rôle de chaque personne intervenue pour l'acquisition de cette donnée : financeurs, donneurs d'ordre, opérateurs de terrain et de laboratoire, etc. Lorsque le commanditaire est une infrastructure publique, la propriété des données répond à un certain nombre d'obligations légales de mise à disposition.

Lieu et temps de stockage des échantillons bruts, des extraits d'ADN et des données de séquençage

Pour les données physiques, des congélateurs peuvent être nécessaires pour éviter la dégradation de l'ADN. Pour les données numériques, des capacités de stockage importantes sont nécessaires, notamment pour conserver les données brutes (sorties de séquenceur). Dans le cadre d'une publication scientifique, les revues demandent aux auteurs que les données brutes soient accessibles via des liens pérennes, notamment afin de pouvoir refaire ultérieurement les analyses (par exemple, avec de nouvelles bases de références génétiques). Des serveurs en ligne proposent leur service avec des liens pour télécharger les fichiers. Les données brutes peuvent être conservées dans les entrepôts de données et les métadonnées dans les catalogues comme le Pôle National de Données de Biodiversité (PNDB). Même si les données ne sont pas ou plus disponibles (par exemple, dans le cas d'un embargo), il est important que les métadonnées restent accessibles.

Comment diffuser et mettre à disposition les données ?

Les données physiques peuvent être conservées par le propriétaire ou le laboratoire qui a fait l'extraction d'ADN, en fonction de ce qui est convenu dans le cadre des charges de la prestation ou du partenariat. Certains échantillons d'intérêt pourraient être conservés dans des musées comme un témoin du milieu à un instant donné, ce qui demande une logistique et une organisation qui restent à mettre en place.

Parmi les données numériques, les données brutes (sorties de séquenceur) et les données analysées (sorties de la phase de bioinformatique) peuvent être déposées dans des bases de données nationales ou internationales (ENA, NCBI, GBIF - Global Biodiversity Information Facility, INPN - Inventaire National du Patrimoine Naturel, etc.). Il est également possible de déposer les données sur une plateforme (type plateforme privée par exemple) mais, par manque de référencement, leur utilisation rend plus difficile l'accès aux données. Pour faciliter leur visibilité, les données peuvent être valorisées dans le cadre de publications scientifiques (exemple : data paper) et mises à disposition dans les systèmes d'information nationaux et internationaux (exemple : GBIF).

Les données validées peuvent être diffusées par les voies « classiques » via les systèmes d'informations sous réserve de bien renseigner qu'elles sont issues d'ADNe et de renseigner un maximum d'informations dans les métadonnées associées. Des réflexions et travaux sont en cours pour améliorer et faciliter la gestion des données issues d'ADNe obtenues dans le cadre de la recherche et des politiques publiques. Des standards et outils dédiés devront peut-être être définis pour garantir une qualité des données et respecter les principes FAIR. Comme pour les données d'espèces obtenues par méthodes traditionnelles, lorsqu'une donnée validée issue d'ADNe est transmise, un identifiant unique et persistant (DOI - Digital Object Identifier, UUID - Universally Unique Identifier, etc.) doit permettre de faire le lien avec les autres types de données qui ont permis de l'obtenir.

Pour aller plus loin

Mise à disposition des données

Pour le territoire français, la mise à disposition de données issues d'ADNe peut se faire via les plateformes régionales ou via les différents entrepôts de données. Des recommandations sont disponibles :



<https://hal.science/PATRINAT/hal-05008115v1>



Pour les données hors territoire français, un guide explicatif du GBIF est disponible.
<https://doi.org/10.35035/doc-vfa-nr22>

PARTIE 03.

Interpréter

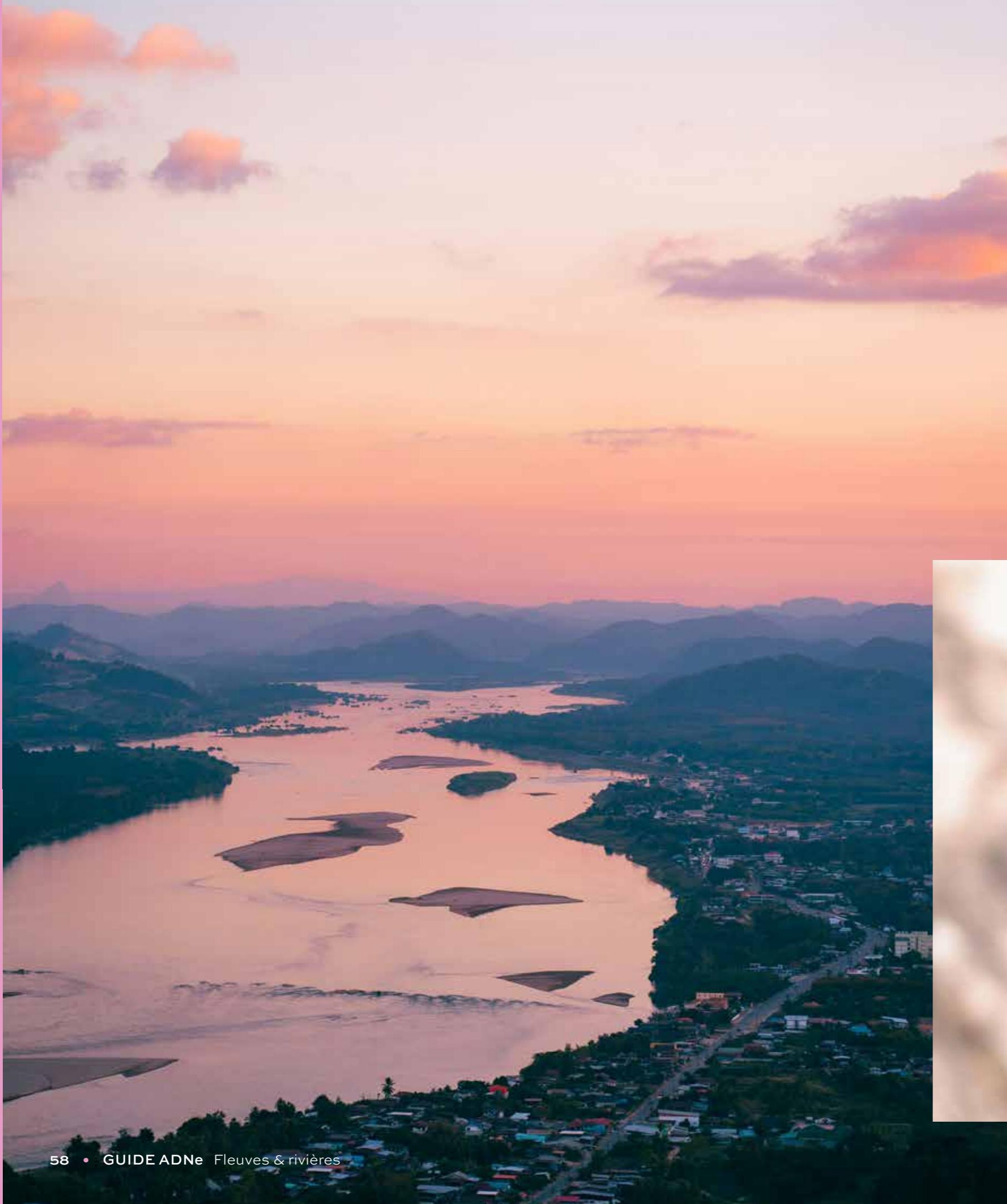
LES DONNÉES OBTENUES

& agir

DANS LES TERRITOIRES



Tithémis annelé (Tithemis annulata) (©F. Jiguet - MNHN)



CHAPITRE 07.

Quelques exemples d'applications & d'interprétations

Bien que les méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe offrent une puissance analytique accrue, il est nécessaire de garantir la validité écologique des résultats obtenus. Il s'agit d'une étape essentielle pour assurer l'exactitude, la fiabilité et la signification biologique des conclusions tirées à partir des analyses. Alors que les progrès technologiques ont

considérablement amélioré la quantité et la qualité des données disponibles, il est impératif de s'assurer que ces données sont interprétées avec précision et dans un contexte pertinent sur le plan biologique et écologique. A travers quelques retours d'expérience, ce chapitre vise à donner des exemples d'interprétation réalisée à partir de données issues de l'ADNe.

Paroles d'expert

Sébastien Brosse,
Professeur à l'Université de Toulouse



Pour en savoir plus : Cartera*, Coutant* et al. 2022. Low level of anthropopization linked to harsh vertebrate biodiversity declines in Amazonia. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30842-2> (*contributions équivalentes)

Analyse de l'ADNe dans un hotspot de biodiversité - Cas de la Guyane

L'ADNe pour révéler un déclin de la biodiversité des poissons et des grands mammifères de Guyane

Avec plus de 90 % du territoire couvert de forêt primaire, la Guyane constitue l'une des zones équatoriales les moins impactées par les activités humaines. Pourtant, l'accroissement démographique et le développement de l'activité minière pourraient non seulement affecter localement la biodiversité, mais également avoir des impacts spatialement étendus, en modifiant par exemple la qualité de l'eau des cours d'eau.

Pour répondre à ces questions, nous avons mesuré l'intensité et l'étendue spatiale des perturbations sur la biodiversité. Nous avons ainsi analysé les relations entre la biodiversité locale, mesurée par analyse de l'ADNe, et les perturbations

agissant entre le voisinage immédiat des sites d'inventaire de faune et 90 km en amont de ces sites. L'utilisation de l'ADNe nous a permis d'effectuer simultanément des inventaires de poissons et de mammifères (aussi bien terrestres que aquatiques) dans 74 sites dispersés sur le Maroni et l'Oyapock, les fleuves frontières entre Guyane, Brésil et Surinam.

Les résultats montrent que la déforestation cumulée sur une distance de 30 km en amont des inventaires de faune était le meilleur prédicteur du déclin de la biodiversité. En d'autres termes, une déforestation légère et éparses - moins de 11 % de surface déboisée entre le site d'échantillonnage faunistique et 30 km en amont de ce site - génère un déclin important de la biodiversité chez les poissons (-25 % des espèces) et les



Saut Lavaud, situé sur le Haut Maroni, est l'un des sites d'inventaire de biodiversité utilisé dans l'étude. L'ADNe collecté sur ce site, exempt de perturbations humaines, a révélé une biodiversité particulièrement élevée, tant en poissons qu'en mammifères (© Mathieu Rhoné OEG/VIGILIFE

Opale Coutant,
Chercheuse postdoctorante,
Institut de Recherche pour le
Développement



Pour en savoir plus : Coutant et al. 2021. Amazonian mammal monitoring using aquatic environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13393>



Site d'échantillonnage sur la partie amont du Sinnamary
© Opale Coutant

mammifères (-41 % des espèces). De plus, ce déclin affecte préférentiellement les poissons détritivores et herbivores, ainsi que les grands mammifères prédateurs tels que les loutres géantes d'Amazonie ou les jaguars, qui sont également des espèces reconnues comme menacées par l'IUCN.

Cet impact drastique d'un faible taux de déforestation sur les animaux tant aquatiques que terrestres est associé à la déforestation engendrée par l'exploitation d'or. En effet, cette activité est connue pour altérer la qualité des cours d'eau en déversant massivement des particules fines et des polluants dans l'eau. Nous montrons ici que l'impact de ces altérations

environnementales va bien au-delà des environs des sites dégradés par l'activité minière. De plus, ces altérations affectent tout autant la biodiversité aquatique que terrestre, soulignant les liens étroits entre écosystèmes.

Plus généralement, cette étude montre que l'analyse de l'ADNe permet d'évaluer la vulnérabilité de la biodiversité amazonienne aux faibles niveaux de perturbations. La capacité de l'ADNe à inventorier rapidement et efficacement de nombreux sites, souvent difficiles d'accès, fournit une opportunité unique de suivi de la biodiversité et de ses changements sur l'ensemble des linéaires de grands cours d'eau et sur les écosystèmes terrestres avoisinants.

dées. Ainsi, les loutres géantes d'Amazonie, connues pour leur sensibilité aux activités humaines, sont préférentiellement rencontrées dans les zones isolées. Au contraire, les kinkajous, nocturnes, arboricoles, peu chassés et peu sensibles aux activités humaines, sont largement répartis.

Depuis cette étude, plusieurs améliorations ont été suggérées pour augmenter la représentativité des inventaires. En effet, avec les organismes non aquatiques, les quantités d'ADN relâchées dans l'eau sont plus faibles et sont dépendantes de l'affinité de chaque espèce avec l'eau. Les recommandations majeures pour augmenter les probabilités de détection des espèces terrestres visent à optimiser l'effort d'échantillonnage à travers le volume d'eau filtré, le nombre d'échantillons et la profondeur de séquençage. Une autre recommandation est de favoriser l'échantillonnage durant une période pendant laquelle les sols sont lessivés, favorisant le transit de l'ADNe vers l'eau, par exemple après des pluies conséquentes ou pendant les saisons humides. Bien que les inventaires ADNe ne permettent pas d'obtenir des données aussi précises que les observations visuelles, ils permettent de compléter les inventaires traditionnels avec les espèces aquatiques, arboricoles, nocturnes ou cryptiques. L'ADNe offre l'opportunité de réaliser des suivis de biodiversité multi-taxons et régionaux, tout en étant moins chronophage que les méthodes traditionnelles. Ces caractéristiques sont particulièrement intéressantes dans les écosystèmes riches en espèces et les zones reculées, difficiles d'accès.

CHAPITRE 07.

Paroles d'expert

Michaël Cagnant,
Ingénieur connaissance - Eau
et milieux aquatiques, Office
Français de la Biodiversité
(OFB)



Pour en savoir plus : Cagnant & Marty. 2019. Aloses feintes en Corse. Recherche de présence grâce à l'ADN environnemental. Rapport technique AFB (DIR PACA-Corse), 28p. + annexes.

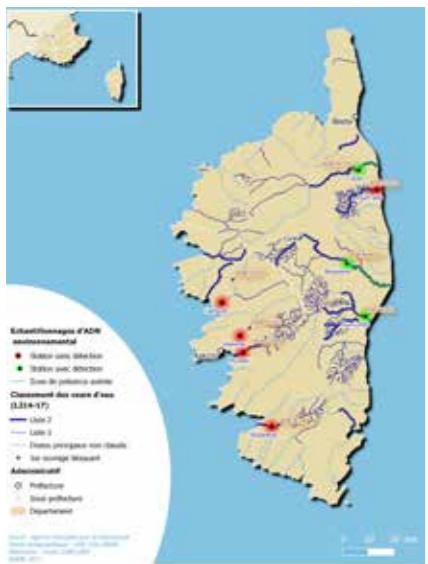


Figure 1 - Résultats d'analyses ADNe - Recherche d'aloise feinte (*Alosa agone*) en Corse - mai 2016. Les résultats suggèrent une présence de l'espèce sur 3 fleuves de la plaine orientale (Golo, Tavignano et Fium'Orbo)

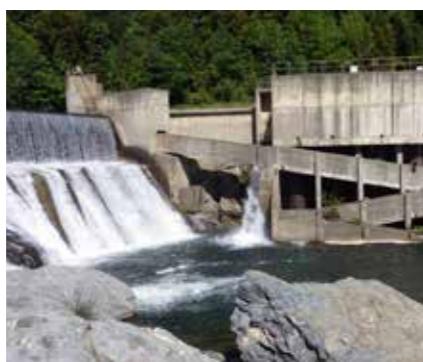


Figure 2 - Barrage de Cardiccia sur le Tavignano - mai 2016 (© OFB/Vincent MARTY). La rupture de continuité induite par les barrages est l'une des causes de raréfaction des grands migrateurs amphihalins comme l'aloise feinte de Méditerranée.



Figure 3: Prélèvement ADNe en milieu aquatique continental (© OFB)

Paroles d'expert

Héloïse Verdier,
Ingénierie de Recherche,
Université Lyon 1, Laboratoire
d'Ecologie des Hydro-systèmes
Naturels et Anthropisés
(LEHNA), équipe E3S



Pour en savoir plus : Verdier. 2022. L'ADN environnemental pour la bioindication du futur : aspects fondamentaux, méthodologiques et applicabilité en rivière intermittente. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1

L'ADNe des macro-invertébrés dévoile l'impact d'une pollution de station d'épuration en rivière intermittente

Les rivières intermittentes, qui cessent de s'écouler ou s'assèchent périodiquement au cours de l'année, représentent plus de la moitié des rivières mondiales. En France, environ un tiers des rivières sont intermittentes, un chiffre susceptible d'augmenter en raison du réchauffement climatique et de la demande croissante en eau. La surveillance et la détection des impacts dans ces hydro-systèmes posent cependant des défis majeurs. Les méthodes actuelles d'évaluation de la qualité écologique, principalement conçues pour les rivières pérennes, ne tiennent pas compte des spécificités des habitats intermittents. Elles ignorent souvent la biodiversité particulière et sa capacité de résistance face à l'assèchement, ainsi que la variabilité spatio-temporelle des conditions hydrologiques. Par conséquent, l'impact de perturbations anthropiques est souvent indéetectable en contexte intermittent.

Les avancées dans le domaine de l'ADNe offrent une perspective prometteuse pour surmonter ces limitations. Le séquençage de l'ADNe extrait à partir d'échantillons de l'environnement permet d'accéder à une vaste diversité d'organismes avec une résolution taxonomique fine. Son utilisation dans les systèmes intermittents permettrait d'identifier

des espèces difficiles à échantillonner, comme celles sous forme de résistance ou à des stades juvéniles (e.g. larves), qui réagissent différemment aux multiples stress. Cette approche pourrait faciliter la détection des impacts anthropiques de manière indépendante des effets liés à l'assèchement des rivières.

Dans le cadre d'une étude in situ, nous avons évalué la capacité de l'ADNe, extrait de plusieurs matrices naturelles (eau, sédiments et biofilms), à détecter l'impact d'une pollution en rivière intermittente et à identifier de potentiels bioindicateurs. Pour cela, nous avons prélevé des échantillons environnementaux à l'amont et à l'aval de stations d'épuration le long de l'Albarine, une rivière de l'Ain présentant un gradient d'intermittence. Une fois extrait, l'ADNe a été séquencé en ciblant les macro-invertébrés, un groupe couramment utilisé en bioindication pour évaluer l'état écologique des cours d'eau.

Les résultats préliminaires indiquent que l'ADNe, isolé à partir de certaines matrices environnementales, peut révéler l'impact de la pollution sur les communautés d'invertébrés, même dans des contextes d'intermittence. De plus, cette étude a identifié des taxons qui pourraient servir de bioindicateurs pertinents pour la détection de la pollution dans ces milieux, tels que les Chironomidae.

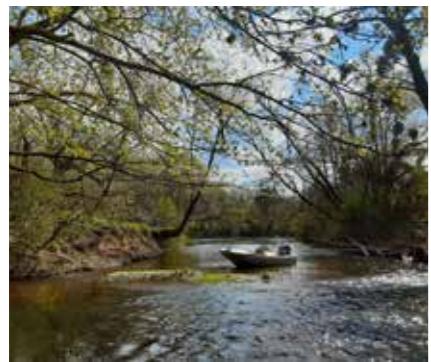
Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives pour l'évaluation écologique des rivières intermittentes et l'amélioration de leur gestion. Elles soulignent l'importance d'adapter nos méthodes de surveillance aux particularités de ces écosystèmes complexes afin de mieux les protéger et les préserver dans le contexte de changements environnementaux rapides.



CHAPITRE 07.

✿ Paroles d'expert

Sylvain Besson,
technicien de l'environnement
OFB



La Saône à Cendrecourt – secteur aval barrage de Cendrecourt (© Mélodie Tort - OFB)

L'ADNe pour détecter une espèce exotique envahissante - Cas du Gobie à tâche noire en Bourgogne-Franche-Comté

Le Gobie à tâche noire a officiellement été détecté pour la première fois en Bourgogne-Franche-Comté lors d'une pêche électrique menée par l'OFB le 23 juillet 2019 sur la Saône, à Cendrecourt. En juin 2020, sa présence a été confirmée grâce à un échantillonnage standardisé réalisé sur cette même station. Les pêches électriques annuelles réalisées depuis 1996 n'avaient jamais détecté l'espèce auparavant, suggérant une arrivée entre août 2018 et juillet 2019.

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à son point et à son mode d'entrée dans la région :

- Colonisation « naturelle » par le canal du Nord-Est dont la confluence se situe quelques kilomètres en amont de Cendrecourt
- Transport fluvial dans les eaux de ballast des bateaux ou accroché à leur coque
- Déversement lors de repeuplements pour la pêche
- Apport par des pêcheurs l'utilisant comme vif (pour rappel, cette pratique est interdite).

Plusieurs de ces hypothèses laissaient penser que Cendrecourt pouvait ne pas être le seul point d'entrée du Gobie à tâche noire dans la région.

Des investigations à large échelle ont donc été menées sur l'ensemble de la Saône par l'OFB et la DREAL BFC. La technique de recherche par ADNe a été choisie, car elle permet de détecter la présence d'espèces de poisson, même faiblement représentées, avec des moyens moins importants que la pêche électrique, notamment dans des cours d'eau comme la Saône, prospectable à l'électricité uniquement en bateau et en berge.

Neuf points ont été sélectionnés pour la réalisation des prélèvements d'ADNe, six sur la Saône et trois sur les affluents (le Coney, la Lanterne à proximité de Cendrecourt et le Doubs). Ces points ont été choisis pour leur représentativité des différents secteurs de la Saône et pour comparer les résultats obtenus à ceux des pêches électriques. Un point témoin a également été placé à Cendrecourt, où la présence de l'espèce était avérée.

Les résultats obtenus par analyse de l'ADNe ont montré la présence du Gobie à tâche noire uniquement à Cendrecourt, avec des résultats négatifs pour tous les autres points considérés. Bien que le maillage reste lâche à l'échelle de la Saône, ces résultats, corroborés par les pêches électriques annuelles, suggèrent que le Gobie à tâche noire n'est entré que dans le secteur de Cendrecourt. Cependant, ces conclusions doivent être prises avec prudence et la veille des réseaux de suivi de la DCE permettra de suivre l'évolution de la situation sur le cours de la Saône.

"La technique de recherche par ADNe a été choisie, car elle permet de détecter la présence d'espèces de poisson, même faiblement représentées."



Gobie à tâche noire (*Neogobius melanostomus*) (© Frédéric Melki - Biotope)



Localisation des stations d'échantillonnage avec l'ADNe et résultats quant à la présence de Gobie à tâche noire

Légende

- Prélèvement ADNe Saône POSITIF
- Prélèvement ADNe Saône NEGATIF
- Prélèvement ADNe affluent de la Saône NEGATIF
- Saône
- Réseau hydrographique
- Canal du Nord-Est

CHAPITRE 08.

Mise en place d'actions concrètes en faveur de la biodiversité

Ces nouvelles technologies basées sur l'analyse de l'ADNe ouvrent de nouvelles opportunités pour améliorer notre compréhension du vivant. Au-delà des frontières de la science, ces avancées offrent des connaissances inédites et robustes, éléments indispensables à toutes décisions et actions sociétales. Elles offrent des perspectives encore ja-

mais atteintes en termes de changement d'échelles temporelle, spatiale et dans le spectre du vivant puisqu'elles permettent d'explorer toutes les ramifications de l'arbre phylogénétique. Il est donc important de transformer ces connaissances en actions tangibles en couplant un besoin exprimé par un utilisateur avec une réponse scientifique adaptée.

Paroles d'expert

Vincent Prié,
SPYGEN / MNHN (attaché)

Réévaluation des enjeux de conservation des bivalves d'eau douce de France

Les bivalves d'eau douce sont des espèces méconnues du grand public. On compte pourtant 45 espèces en France, certaines d'à peine 2 millimètres de diamètre, d'autres pouvant peser près d'un kilogramme et représentant les plus gros invertébrés continentaux d'Europe. Beaucoup de ces espèces sont sensibles aux activités humaines : pollution, recalibrage des cours d'eau, grands barrages, etc. Les bivalves d'eau douce figurent parmi les groupes les plus me-

nacés au monde. Leur étude se heurte à trois obstacles de taille : (i) la détermination des espèces est délicate, parfois impossible, sur des bases morphologiques ; (ii) leur détection est très difficile en particulier dans les grands milieux, les grands fleuves de l'aval qui concentrent l'essentiel de la biodiversité. Turbidité, profondeur, embâcles, objets dérivants, navigation... rendent les prospections difficiles et dangereuses. Qui plus est, certaines espèces passent le plus clair



Pour en savoir plus : Prié et al. 2023. Conservation assessment based on large-scale monitoring of eDNA: application to freshwater mussels. *Biological Conservation*. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2023.110089>

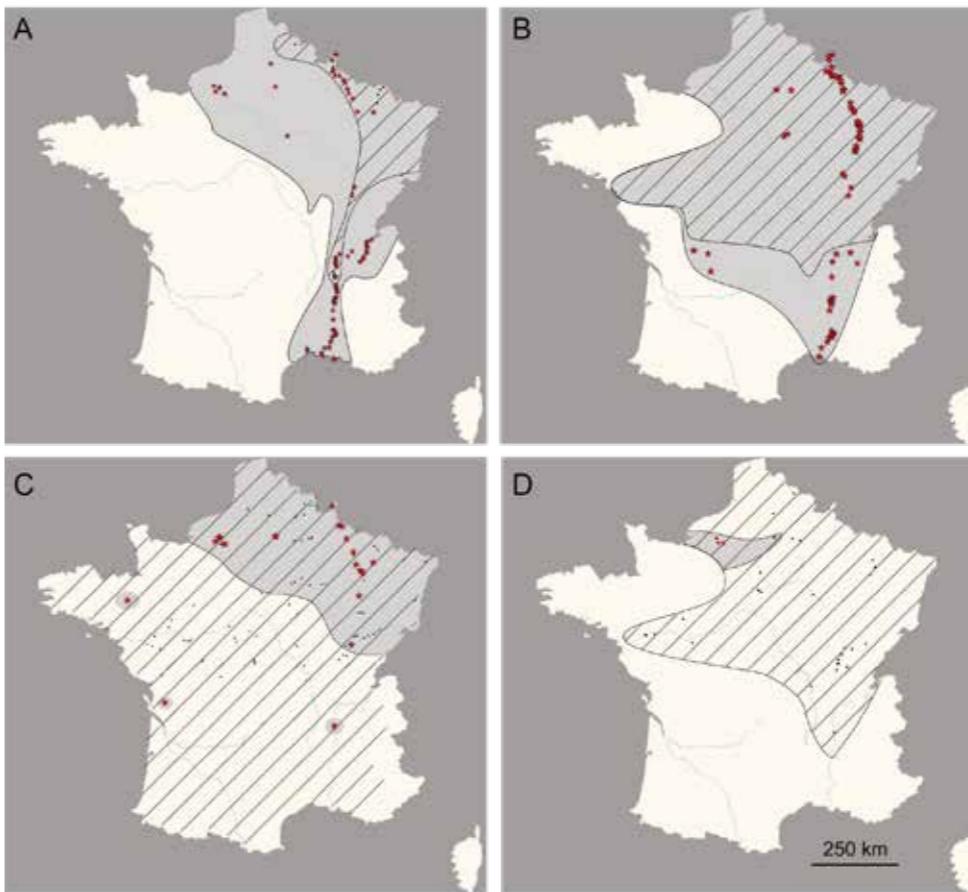
de leur temps enfouies dans le sédiment. Enfin (iii), la plupart des données disponibles sont issues de l'observation de coquilles, et non d'individus vivants. Les coquilles pouvant se conserver pendant des années après la mort de l'animal, voire être transportées par le courant, les données disponibles donnent donc une image biaisée de la réalité.

L'ADNe est l'outil idéal pour répondre à ces problématiques. (i) Les identifications sont fournies sur une base génétique. Hormis pour quelques espèces présentant des haplotypes communs, la détermination par ADNe est garantie pour la grande majorité des espèces, même pour les espèces nouvellement décrites. (ii) La probabilité de détection est nettement supérieure, surtout pour les petites espèces, à celle d'une équipe de malacologues-plongeurs aguerris. Enfin (iii), l'ADNe ne détecte que les individus vivants et non les populations éteintes.

Depuis 2015, des prélèvements ADNe ont été réalisés un peu partout en France, fournissant leur lot de données nouvelles sur la répartition des différentes espèces.

Nous disposons aujourd'hui de plus de 600 points de prélèvement en France, permettant de réactualiser les aires de répartition, et subséquemment de réévaluer les enjeux de conservation. Certaines espèces supposées menacées, comme la Mulette épaisse (Fig. 1A), ont des aires de répartition plus étendues que ne le laissaient supposer les données traditionnelles. Tant mieux. Même constat pour une espèce introduite envahissante comme la Moule quagga (Fig. 1B), qui a déjà colonisé la Seine et les fleuves côtiers méditerranéens sans qu'on s'en aperçoive. Tant pis... Au contraire, certaines espèces comme l'Anodonte comprimée ou la Cyclade des fleuves (Fig. 1C-D) semblent avoir disparu dans l'indifférence générale de la majorité de leur répartition historique. Leur statut de conservation UICN est ainsi passé de "quasi-menacé" à "en danger d'extinction" sur la liste rouge française élaborée en 2021.

Figure 1 - Amélioration des connaissances sur la répartition de 4 espèces de bivalves d'eau douce grâce à l'ADNe. Points noirs et zones hachurées : répartition basée sur les données disponibles avant ADNe. Étoiles rouges et zones grisées : répartition actualisée sur la base des données ADNe. A : la mulette épaisse *Unio crassus*, espèce protégée et d'intérêt communautaire, a une aire de répartition plus grande que ce que laissaient supposer les données d'inventaire traditionnels, notamment à l'aval du Rhône où peu de plongeurs s'aventurent. B : la moule quagga *Dreissena polymorpha*, espèce introduite envahissante, a déjà colonisé beaucoup plus de cours d'eau que ne le laissaient penser les observations naturalistes. C : l'anodonte comprimée *Pseudanodonta complanata* était présente presque partout en France d'après la littérature. Elle semble avoir disparu des deux-tiers de son aire de répartition historique. D : la petite Cyclade des Fleuves *Sphaerium solidum* a subi un déclin encore plus drastique. Si ses coquilles sont collectées ça et là encore aujourd'hui dans le sédiment des fleuves, les données ADNe suggèrent qu'elle est aujourd'hui réduite à trois populations.



CHAPITRE 08.

Paroles d'expert

Jordi Gil,
Chargé de projets APRON,
Conservatoire d'Espaces
Naturels Rhône-Alpes

Un outil supplémentaire pour le suivi des populations d'apron du Rhône

L'Apron du Rhône *Zingel asper* est un Percidae endémique du bassin du Rhône. Classé en danger critique d'extinction sur la liste rouge mondiale de l'IUCN, il a bénéficié depuis 1998 de deux programmes LIFE et de deux Plans Nationaux d'Actions (PNA) dont le dernier est actuellement en cours jusqu'en 2030. C'est durant le premier PNA (2012-2016) que le Conservatoire d'Espaces Naturels Rhône-Alpes, animateur du PNA, s'est associé à SPYGEN pour une étude de faisabilité de détection de l'Apron du Rhône par ADNe qui s'est terminée de manière concluante en 2015.

La capacité de cette méthode à explorer un grand nombre de stations est intéressante dans le cas d'une espèce comme l'Apron qui présente des densités naturellement faibles ainsi qu'un comportement cryptique et donc une probabilité de détection en milieu naturel assez faible. La détection de l'ADNe a été utilisée comme une méthode exploratoire, un outil d'alerte pour permettre ensuite d'orienter le déploiement de moyens humains et logistiques pour la mise en œuvre d'inventaires de terrain. L'ADNe s'est en effet avérée très

complémentaire des méthodes d'inventaires classiques (pêches électriques par points sur la Durance, prospections nocturnes à la lampe - les yeux des aprons reflétant très bien la lumière - sur les autres cours d'eau) qui, elles, permettent d'estimer les effectifs et de recueillir des paramètres individuels (taille, sexe, etc.).

Concernant l'interprétation des résultats, il a été décidé par le Conseil Scientifique et Technique du PNA Apron qu'une détection par ADNe ne suffisait pas à valider définitivement la présence de l'espèce sur un secteur : une confirmation visuelle est donc nécessaire pour que sa présence soit considérée comme avérée.

Depuis 2016, l'ADNe a permis la découverte d'Aprons sur des secteurs où sa présence était inconnue. Par exemple, les prélèvements réalisés en 2016 sur le Verdon ont permis une détection d'ADN en aval de Castellane, sur un secteur situé en dehors de l'Arrêté Interpréfectoral de Biotope (AIPB) destiné à protéger l'apron. Les prospections réalisées depuis ont confirmé la présence de l'espèce, et la question d'un nouvel AIPB « Apron » est en cours de discussion.

Plus récemment (2022), une détection d'ADN sur la partie aval de Loue a permis à l'OFB d'observer l'année suivante un Apron sur ce secteur, soit plus de 20 km en aval de la limite de répartition estimée jusqu'alors.

L'ADNe s'avère un outil très utile dans les suivis des populations d'Aprons, et notamment pour explorer de nouveaux cours d'eau ou de nouveaux secteurs. La principale limite méthodologique aujourd'hui que nous rencontrons est celle des grands milieux pour lesquels ni la pêche électrique ni les prospections ne sont envisageables pour apporter une confirmation visuelle.

L'Apron du Rhône *Zingel asper*
© Marianne Georget



Paroles d'expert

Pierre Campton,
Directeur technique de
l'association Migrateurs Rhône
Méditerranée

L'ADNe pour suivre les poissons migrateurs

Créée en 1993, l'association Migrateurs Rhône Méditerranée œuvre pour contribuer à la connaissance, la sensibilisation, la restauration et la gestion des populations de poissons migrateurs et de leurs milieux de vie sur les bassins Rhône-Méditerranée et Corse, soit plus de 23 % du territoire national. Les poissons migrateurs sont au nombre de 3 sur notre territoire : on retrouve la Lamproie Marine (*Petromyzon marinus*) classée en danger critique d'extinction et à l'état relictuel sur le territoire, l'Alose feinte de Méditerranée (*Alosa agone*) espèce endémique et l'Anguille européenne (*Anguilla anguilla*) également classée en danger critique d'extinction. L'utilisation de l'ADNe présente un intérêt pour suivre deux de ces espèces : la lamproie et l'aloise.

MRM a pour la première fois utilisé la technique de l'ADNe en 2016 avec l'objectif de compléter son réseau de suivi de la Lamproie Marine sur son territoire. Des échantillonnages sont réalisés au

printemps sur les zones les plus susceptibles d'accueillir l'espèce qui vient se reproduire dans nos cours d'eau. Malheureusement, à ce jour aucun des prélèvements n'a permis de détecter sa présence. Ce résultat est surtout lié à la situation critique de l'espèce sur le territoire, la méthode d'échantillonnage ayant été testée avec succès dans des secteurs de présence de la Lamproie Marine sur le bassin versant de la Loire.

L'Alose feinte de Méditerranée remonte les cours d'eau au printemps pour se reproduire. Ces dernières décennies, de nombreux efforts pour rétablir la continuité écologique des cours d'eau ont été réalisés (destruction d'ouvrage, aménagement de passe à poissons, etc.). Le territoire disponible pour l'Alose est donc de plus en plus vaste et l'analyse de l'ADNe est l'un des outils utilisés pour suivre annuellement le « front de colonisation » de l'Alose sur le Rhône et certains de ses affluents ou encore sur des fleuves côtiers méditerranéens comme l'Hérault

ou l'Orb. La technique de l'ADNe est également utilisée de manière régulière pour détecter la présence de l'Alose sur des territoires où les observations se font rares comme sur le Tech par exemple (Pyrénées Orientales).

L'utilisation de l'ADNe fait aujourd'hui pleinement partie des suivis annuels portés par notre association, les résultats sont partagés avec l'ensemble des partenaires techniques de notre réseau et valorisés au travers de l'observatoire des poissons migrateurs.



Anguilla anguilla © F. Melki, Biotope

CHAPITRE 08.

✿ Paroles d'expert

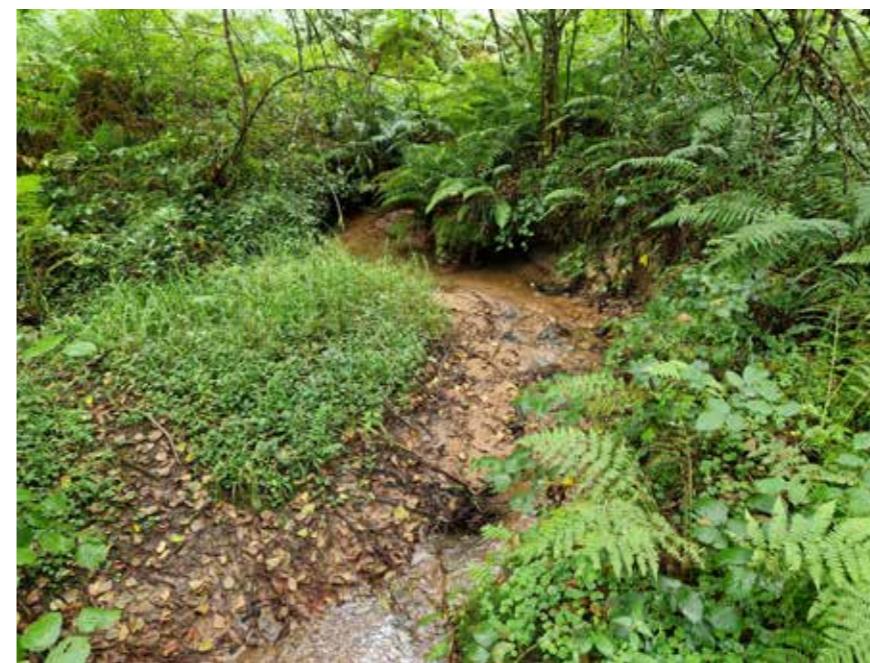
Thomas Baudry
(postdoctorant),
Frédéric Grandjean
(Professeur),
Carine Delaunay
(Ingénieur d'Etude) de
l'Université de Poitiers et
Valentin Vasselon
(Chef de projet SCIMABIO
Interface)

L'ADNe pour appuyer la gestion et la conservation de l'écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*)

L'écrevisse à pattes blanches (*A. pallipes*) est une espèce emblématique des cours d'eau d'Europe de l'Ouest, considérée comme bioindicatrice de la bonne qualité du milieu. Depuis le début des années 2000, les populations d'*A. pallipes* ont vu leur nombre chuter drastiquement (50 %), à cause de l'effet combiné de la perte – ou dégradation – d'habitats et la compétition avec les espèces américaines introduites (*Faxonius limosus*, *Pacifastacus leniusculus* et *Procambarus clarkii*), vectrice de l'agent pathogène (*Aphanomyces astaci*) responsable de la peste de l'écrevisse. De ce fait, l'écrevisse à pattes blanches est

classée « en danger » sur la liste rouge mondiale de l'IUCN depuis 2010 et cette espèce fait l'objet de mesures de protection et de programmes de conservation. Cependant, ces programmes nécessitent d'avoir des données de suivis robustes, bien souvent difficiles à mettre en place compte tenu du rythme de vie nocturne de cette espèce, des densités souvent (très) réduites des populations et de linéaires difficiles à prospecter en tête de bassin.

L'analyse de l'ADNe pour le suivi d'espèces à enjeux de conservation se démocratise, même si leur déploiement reste



Exemple d'habitat potentiel à *A. pallipes* sur le Gursin @ FDPPMA 71



A. pallipes @ PNR Corbières Fenouillèdes



Pour en savoir plus : Baudry et al. 2024. When Methodological Innovation Changes the Game: A 10 Year Review of Environmental DNA (eDNA) Applied to Crayfish. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. <https://doi.org/10.1002/aqc.4245>



Baudry et al. 2023. Influence of distance from source population and seasonality in eDNA detection of white-clawed crayfish, through qPCR and ddPCR assays. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.435>

encore limité par manque de connaissances sur les avantages et limites opérationnelles. Le projet eCray'ON 2023-2025 (OFB, SCIMABIO Interface, équipe EES du laboratoire EBI UMR-CNRS 7267 de l'université de Poitiers) a pour objectif de coordonner une action à l'échelle de la métropole pour répondre à ces attentes et sensibiliser les gestionnaires aux approches ADNe. Il permet de faire le point sur des questions méthodologiques, la possibilité de déployer l'approche sur des milieux variés, avec pour finalité de donner les éléments de compréhension suffisants aux gestionnaires pour construire un suivi ADNe sur leur bassin. Plus de 250 structures de gestion ont été impliquées dans les dis-

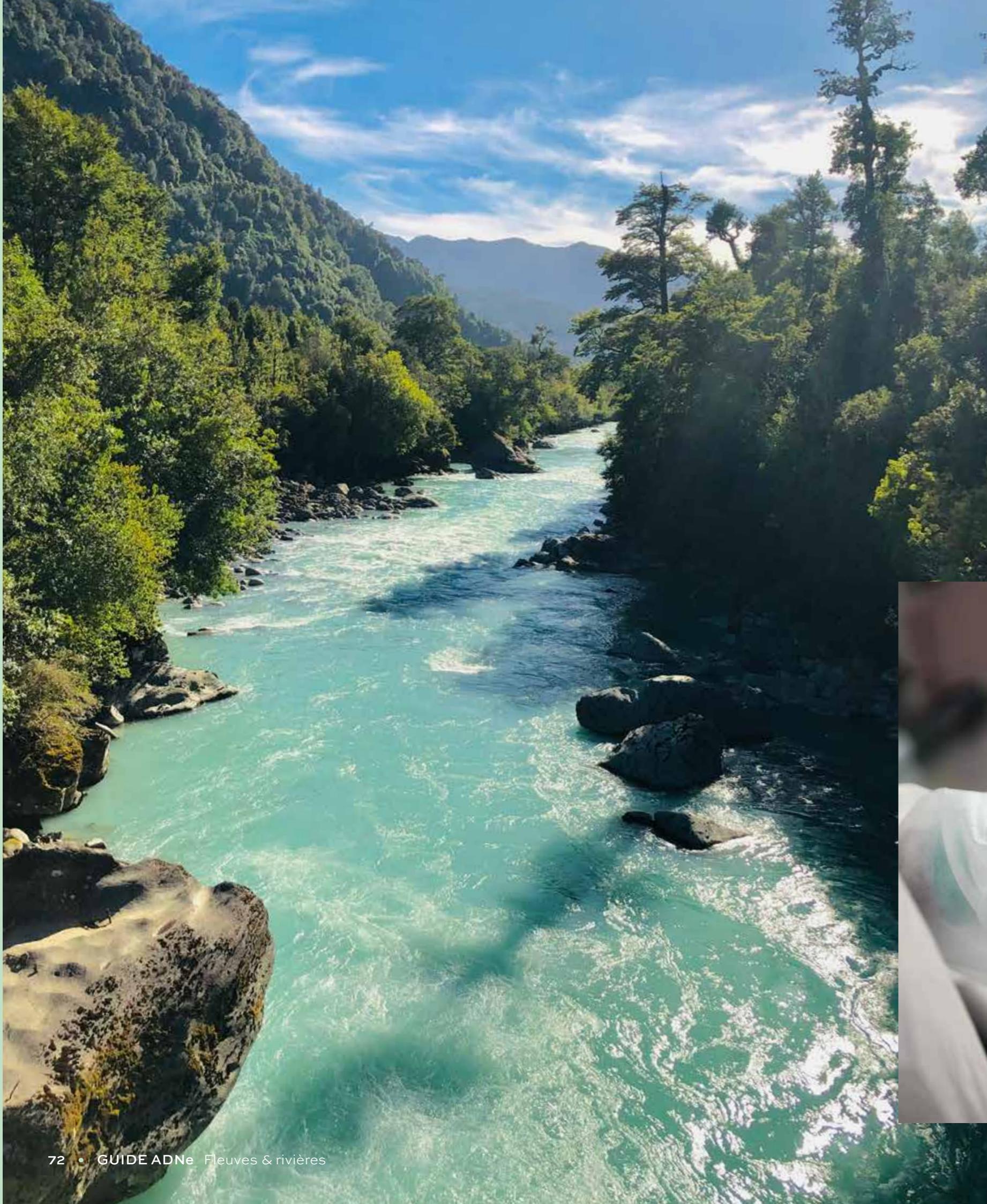
cussions et 25 ont participé activement au projet en permettant de sélectionner 60 sites d'études en rivières réparties sur 20 bassins.

Les résultats de la première campagne 2023 ont permis de valider la possibilité de détecter par ADNe la présence de l'écrevisse à pattes blanches, bien que cette dernière soit peu émettrice d'ADN dans le milieu. Nous avons également mis en évidence une certaine spatialisation du signal, détectable jusqu'à > 1km en aval de la population, ce qui a une forte incidence sur la construction d'un suivi spatial à l'échelle d'un bassin. La détection simultanée d'espèces invasives potentiellement co-occurrences (*F. limosus*, *P. clarkii*, *P. leniusculus* et l'agent pathogène *A. astaci*) en multiplex a permis d'alerter sur certains sites de potentiels dangers pour les populations natives d'écrevisses à pattes blanches. Ces premiers éléments montrent la pertinence des approches ADNe appliquées au contexte de l'écrevisse à pattes blanches.

"Les résultats ont permis de détecter par ADNe la présence de l'écrevisse à pattes blanches, bien que cette dernière soit peu émettrice d'ADN dans le milieu."



Conclusions et perspectives



Conclusions

L'analyse de l'ADNe consiste à prélever et identifier des fragments d'ADN des organismes dans leur environnement. Depuis 2008, cette méthode novatrice, complémentaire aux techniques conventionnelles de recensement de la biodiversité, a démontré son efficacité dans le domaine de la biologie de la conservation, notamment pour la réalisation d'inventaires et de suivis de la biodiversité. Cependant, en milieu aquatique, les quantités d'ADNe tendent à être très faibles dans l'eau. Elles peuvent même être infimes dans le cas d'espèces peu abondantes dans l'environnement (menacées, cryptiques, etc.). Or, la détectabilité des espèces dépend de la probabilité de prélever leur ADN dans le milieu, de la préservation de cet ADN au cours du processus analytique et de l'absence de contamination des échantillons considérés. Ainsi, lorsque

l'objectif de l'utilisateur est d'obtenir une liste d'espèces la plus exhaustive possible tout en limitant les risques de faux-négatifs et de faux-positifs, il est nécessaire de choisir des méthodes d'échantillonnage et d'analyse respectant les plus hauts niveaux de précaution possibles. Ce guide fournit une synthèse simplifiée des méthodes couramment utilisées, ainsi que des instructions opérationnelles pour le choix de méthodes adaptées à la réalisation d'inventaires et de suivis de biodiversité. Il est prévu de le mettre à jour régulièrement, au gré des améliorations technologiques et des avancées de la recherche scientifique qui, compte tenu de l'importance croissante de l'analyse de l'ADNe dans les études de biodiversité, sont susceptibles d'être nombreuses dans les années à venir.



Perspectives

Perspectives techniques

→ Déetecter de nouveaux taxons

Les analyses de l'ADNe présentent l'avantage de pouvoir identifier un large panel d'organismes, allant des bactéries aux grands mammifères en passant par les plantes. Ces approches novatrices offrent ainsi de nouvelles perspectives d'application pour les groupes taxonomiques jusqu'à présent sous-représentés voire ignorés par les méthodes d'inventaire traditionnelles. Cependant, la littérature révèle des disparités dans les taxons ciblés par les techniques de biologie moléculaire en milieu aquatique. En effet, si certains groupes tels que les poissons et les amphibiens sont bien étudiés, d'autres organismes comme la faune non aquatique et les mammifères sont, en revanche, moins communément pris en compte^[20]. Le développement de nouvelles méthodes d'échantillonnage conjugué à l'élaboration de nouvelles amores et de bases de références génétiques plus adaptées à ces espèces, pourrait fournir des données complémentaires essentielles pour une meilleure compréhension de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes.

→ Obtenir des données quantitatives

Bien que l'analyse de l'ADNe ne soit pas adaptée pour caractériser l'état des populations ni pour fournir des informations individuelles, elle offre, en revanche, des perspectives intéressantes pour l'estimation de l'abondance et de la biomasse des espèces. En effet, il existe une corrélation positive entre ces paramètres et les quantités d'ADNe. Les méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe permettent ainsi de déterminer l'abondance relative des organismes^[40]. Cependant, une étude récente menée sur des populations piscicoles propose, en utilisant les mêmes amores, de combiner le metabarcoding et la quantification de l'ADNe total récolté^[41]. Cette approche permet de standardiser les données obtenues par metabarcoding de l'ADNe et d'obtenir des informations sur le nombre de copies d'ADN récoltées, allant plus loin que les proportions de séquences détectées généralement rapportées.

Perspectives d'application

L'initiative Fleuves Sentinelles (Cf. l'onglet "paroles d'expert" ci-après), dont l'objectif est de structurer des suivis à long terme de la biodiversité des grands fleuves à l'aide de l'ADNe, illustrent parfaitement le potentiel de cette méthode pour mener des projets

→ Déployer de nouvelles méthodes d'échantillonnage

En s'inspirant des innovations testées à l'heure actuelle en milieu marin, les milieux dulcicoles pourraient bénéficier de l'élaboration de méthodes d'échantillonnage par robot autonome type drone. En effet, ce genre d'innovation technologique pourrait permettre d'appuyer le changement d'échelle permis par les analyses de l'ADNe dans l'étude de la biodiversité, tant au niveau spatial que temporel. A plus court terme, les analyses de l'ADNe en milieu aquatique pourraient bénéficier d'études portant sur la profondeur d'échantillonnage en se basant sur les méthodes déjà existantes. En effet, aucune étude n'est disponible à l'heure actuelle sur l'impact de la profondeur d'échantillonnage sur les espèces mises en évidence dans les grands cours d'eau. Résoudre cette problématique pourrait être particulièrement pertinent pour certains taxons tels que les invertébrés benthiques comme les bivalves.

→ Analyser l'ARN environnemental

Au-delà de l'ADN environnemental, l'ARN (Acide RiboNucléique) environnemental (ARNe) est aujourd'hui de plus en plus considéré pour les analyses de biodiversité. L'analyse des molécules d'ARN présentes dans les écosystèmes offre des perspectives intéressantes pour le développement de marqueurs génétiques fonctionnels et pour l'évaluation des risques de biosécurité^{[42], [43]}. Cependant, l'ARN est plus rapidement dégradé et a une durée de vie réduite dans l'environnement par rapport à l'ADN, ce qui implique des contraintes supplémentaires en termes de conservation et d'analyse des échantillons (respect de la chaîne du froid, travail sur blocs de glace au laboratoire, etc.).

Paroles d'expert

Sébastien Brosse,
Professeur à l'Université de
Toulouse

Pour en savoir plus : Condachou et al. 2024. Monitoring the threatened *Harttiella* (Siluriformes, Loricariidae) with eDNA: a comparison between metabarcoding and targeted dPCR. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater ecosystems*. In press.
Murienne et al. In prep.
Phylogenomic of the critically endangered *Harttiella* (Siluriformes, Loricariidae) based on complete mitochondrial genomes.

Détection d'une espèce nouvelle grâce à l'ADNe

En 2019 a eu lieu une expédition scientifique, organisée par le Centre d'Etude de la Biodiversité Amazonienne (Labex CEBA), visant à inventorier la biodiversité du Mont Galbao. Cette montagne isolée, située au centre de la Guyane, est en effet susceptible d'abriter une faune et une flore encore peu connues.

Au cours de cette expédition, nous avons prospecté les torrents qui dévalent les flancs de cette montagne à l'aide de l'analyse de l'ADNe, à la recherche, en particulier, de poissons du genre *Harttiella*. Ces petits poissons chats de quelques centimètres de long, au corps recouvert de plaques osseuses, sont en effet endémiques de la Guyane et du Surinam. Ils sont inféodés aux milieux torrentiels et tous considérés par l'IUCN comme menacés d'extinction. Ils font également l'objet d'un Plan National d'Action visant à leur inventaire et leur conservation.

Nous avons donc passé deux semaines à prospector des torrents pouvant potentiellement abriter des *Harttiella*, à l'aide de l'ADNe, mais également par des captures à l'épuisette. Nous avons ainsi découvert 7 nouvelles populations de *Harttiella*, identifiées sur le terrain

comme appartenant à l'espèce *Harttiella lucifer*, la seule attendue dans cette zone. L'analyse des données d'ADNe a confirmé la présence de 5 populations de l'espèce attendue, mais les deux dernières populations, découvertes sur le flanc ouest de la montagne, n'étaient assignées à aucune espèce connue de *Harttiella*.

Nous avons alors cherché à comprendre les liens phylogénétiques entre espèces de *Harttiella* à partir du génome mitochondrial complet de spécimens capturés sur le terrain ou conservés en collection. A notre grande surprise, les 2 populations non assignées à une espèce connue découvertes sur le versant Ouest du Mont Galbao se distinguaient nettement des *H. lucifer*, et se rapprochaient plutôt d'une espèce de *Harttiella* connue uniquement de quelques individus capturés dans les monts Kottica à plus de 100 km du Mont Galbao.

Ainsi cette nouvelle population indéterminée de *Harttiella* a été temporairement nommée *Harttiella* nsp « Makwali », du nom du seul cours d'eau connu pour abriter ces poissons, dans l'attente d'une description formelle de cette nouvelle espèce.

Cette étude souligne l'importance d'établir des bases de références comportant l'ensemble des espèces connues dans une région, non seulement pour obtenir des inventaires précis de biodiversité, mais également pour potentiellement identifier des espèces nouvelles. Ce type d'approche prend tout son sens dans les milieux à forte diversité biologique qui pourraient encore abriter des espèces inconnues, comme c'est le cas en Amazonie.



Harttiella nsp "Makwali", une probable nouvelle espèce de Loricariidae découverte en 2019 sur les flancs du Mont Galbao (Guyane) grâce à l'ADN environnemental

Paroles d'expert

Franck Pressiat,
Responsable du Département
Environnement - Direction de
l'Ingénierie - Maintenance -
Projets à CNR (Compagnie
Nationale du Rhône)



Pour en savoir plus : Le projet Rhône Fleuve Sentinel : <https://www.youtube.com/watch?v=mh4GoYYdEik>



Pont et al. 2018. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>



Le projet BiORhône : <https://www.youtube.com/watch?v=GhNYK-TQ8mU>

Le programme Vigilife Fleuves et Rivières Sentinelles

Les fleuves ont toujours représenté une force pour les territoires qu'ils traversent. Empreintes vivantes des civilisations peuplant leurs rives depuis la nuit des temps, ils constituent également une maison naturelle exceptionnelle pour de nombreuses espèces animales et végétales. Aujourd'hui, alors que nous faisons face à des défis climatiques, écologiques et sanitaires sans précédent, ils révèlent la fragilité de nos modes de vie et nous interrogent. Qu'ont-ils à nous apprendre sur notre relation avec le monde vivant et comment pouvons-nous mieux les connaître pour améliorer leur protection ?

Au travers du programme scientifique « Fleuves et Rivières Sentinelles » (FRS), Vigilife ambitionne de développer un outil au service de la biodiversité des eaux douces grâce à la mise en place de réseaux de suivi pérennes utilisant la technologie de l'ADNe. Plusieurs collaborations internationales dans le cadre de Vigilife ont déjà été menées ou sont en cours de réalisation sur divers fleuves du monde : Rhône, Danube, Maroni, Amazonie, Magdalena, Mékong, etc. Elles sont le fruit de partenariats nationaux et internationaux, et font l'objet de publications scientifiques internationales. Le programme FRS doit permettre d'aller plus loin dans les coopérations internationales. Il est un axe majeur de l'alliance Vigilife en vue de partager les données scientifiques obtenues et de faire dialoguer ces résultats et ces équipes pour une approche globale de la préservation et de la restauration des cours d'eau dans le monde.

Depuis 2015, la Compagnie Nationale du Rhône (CNR), aux côtés de ses partenaires, est un acteur reconnu dans le développement des méthodes d'inventaires de la biodiversité par ADNe dans

les milieux fluviaux de grande ampleur, et notamment sur le fleuve Rhône. Un des objectifs est de faire du Rhône le premier fleuve au monde à bénéficier d'un suivi intégral de sa biodiversité sur les 812 km de son cours en Suisse et en France, depuis son glacier dans les Alpes jusqu'à la Méditerranée. C'est le projet « Rhône Fleuve Sentinel ».

Cet objectif s'appuie sur l'antériorité des initiatives portées par la CNR dans le déploiement de cette nouvelle technologie dans nos actions d'inventaires et de gestion opérationnelle comme l'investigation ADNe poissons et bivalves du fleuve Rhône depuis la sortie du Lac Léman jusqu'à la Méditerranée en 2015 ou le projet franco-Suisse BiORhône mené entre 2018 et 2021 avec SPYGEN, HEPIA (Haute École du Paysage, d'Ingénierie et d'Architecture de Genève), INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement) et financé par CNR, les SIG (Services Industriels de Genève), le fond Électricité Vital Vert et le fond INTERREG de l'Union Européenne .

La création d'un réseau pérenne de stations de suivi ADNe à des fins scientifiques et opérationnelles passe par différentes étapes à commencer par la mise en place d'un démonstrateur à échelle plus réduite, avant une mise en œuvre ultérieure sur l'ensemble des stations du Rhône puis un possible déploiement de la méthodologie sur les autres fleuves et rivières sentinelles identifiés. Cette phase de démonstration en cours de structuration sur le Rhône permettra de poursuivre la recherche et la mise en place de partenariats scientifiques, techniques, institutionnels et financiers en Suisse et en France pour une mise en œuvre opérationnelle en 2025/2026.

Glossaire

● **Adaptateur de séquençage :**
Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées pour permettre leur fixation sur le support du séquenceur²².

● **ADN (Acide DésoxyriboNucléique) :**
Molécule universelle et commune à tous les êtres vivants mais contenant l'information génétique propre à chaque individu.

● **ADN environnemental ou ADNe :**
ADN pouvant être extrait à partir d'échantillons environnementaux tels que le sol, l'eau ou l'air, sans nécessiter d'isoler, au préalable, les organismes ciblés⁵. Il est caractérisé par un mélange complexe d'ADN génomique provenant de nombreux organismes différents et par une possible dégradation (c'est-à-dire que les molécules d'ADN sont coupées en petits fragments). L'ADNe total contient de l'ADN cellulaire provenant de cellules ou d'organismes vivants et de l'ADN extracellulaire.

● **Analyses bioinformatiques :**
Ensemble d'analyses informatiques réalisées à partir des données de séquençage issues de l'analyse de l'ADNe extrait des échantillons considérés.

● **Amorce :**
Courtes séquences synthétiques d'ADN permettant de cibler un marqueur génétique et d'initier son amplification par PCR (ou autres méthodes dérivées).

● **Amplicon :**
Fragment d'ADN amplifié par PCR (ou autres méthodes dérivées).

● **Approche spécifique :**
Détection de la présence d'une espèce d'intérêt par détection d'une séquence précise de son ADN.

● **Approche multispécifique (ou metabarcoding) :**
Détection simultanée et sans a priori de plusieurs espèces différentes appartenant à un même groupe taxonomique⁵.

● **ASV (Amplicon Sequence Variant) :**
Variant de séquence d'amplicon consistant en un regroupement d'une séquence principale avec plusieurs autres séquences proches, moins abondantes et considérées comme des erreurs de la séquence principale.

● **Base de références génétiques :**
Banques de séquences d'ADN d'espèces connues.

● **Capsule de filtration :**
Capsule renfermant une membrane filtrante.

● **Contamination :**
Procédé par lequel de l'ADN exogène est introduit dans un échantillon.

● **Contrôle :**
Échantillon dont le matériel génétique est absent ou connu. Un contrôle négatif est un échantillon sans matériel génétique utilisé pour vérifier que l'analyse est exempte de contamination. Un contrôle positif est un échantillon contenant un matériel génétique connu, utilisé pour vérifier que l'étape de l'analyse (extraction ou amplification) s'est déroulée correctement.

● **Décontamination :**
Ensemble des étapes nécessaire pour enlever/nettoyer les traces d'ADN sur le matériel d'échantillonnage ou sur toutes les surfaces pouvant entrer en contact avec l'échantillon au laboratoire.

● **Extraction ADN :**
Étape permettant d'isoler l'ADNe contenu dans les échantillons environnementaux.

● **Faux-négatif :**
Absence de détection d'une espèce présente dans l'environnement étudié.

● **Faux-positif :**
Détection d'une espèce absente de l'environnement étudié.

● **Index :**
Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées et consistant en un identifiant unique pour chaque librairie de séquençage²².

● **Librairie de séquençage :**
Ensemble des amplicons (séquences d'intérêt amplifiées) à séquencer et comportant à leurs extrémités des tags, des adaptateurs de séquençage et des index³³.

● **Marqueur génétique :**
Région spécifique et connue de l'ADN ayant une localisation précise dans le génome (par exemple, un gène ou une partie d'un gène).

● **OTU (Operational Taxonomic Unit) :**
Unité taxonomique opérationnelle consistant en un regroupement de séquences identiques entre elles jusqu'à un certain seuil. Le terme MOTU (Molecular Operational Taxonomic Unit) peut également être rencontré.

● **PCR (Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne) :**
Méthode d'amplification d'un fragment spécifique d'ADN permettant d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

● **PCR digitale (dPCR) :**
Méthode dérivée de la PCR quantitative, où le mélange réactionnel est fractionné en milliers de microréactions.

● **PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) :**
Méthode dérivée de la PCR quantitative, où le mélange réactionnel est fractionné en milliers de gouttelettes par des émulsions d'huile et d'eau.

● **PCR quantitative (qPCR) :**
Méthode dérivée de la PCR se basant sur la mesure d'un signal fluorescent émis lors de l'amplification du fragment d'ADN ciblé.

● **Profondeur de séquençage :**
Nombre total de séquences lues attendues par échantillon.

● **Réplicas :**
Échantillons prélevés sur un même site d'étude ou générés dans des conditions expérimentales identiques.

● **Reads :**
Lecture d'une séquence par le séquenceur.

● **Stratégie d'échantillonnage :**
Planification de la collecte des échantillons permettant de déterminer le nombre d'échantillons à collecter, leur répartition spatio-temporelle ainsi que les méthodes et les réglementations à respecter.

● **Séquençage :**
Détermination de la séquence constituant un fragment d'ADN.

● **Séquence :**
Succession de nucléotides constituant la molécule d'ADN (ou d'ARN).

● **Tag :**
Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées et consistant en un identifiant unique pour chaque échantillon ou chaque réplica PCR³³.

Bibliographie

- Ogram, A., Sayler, G. S. & Barkay, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, 57-66 (1987).
- Ficetola, G. T., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Population genetics* 4, (2008).
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, J., Mächler, L. & Altermatt, F. Environmental DNA applications for biomonitoring and bioassessment in aquatic ecosystems. (2020) doi:10.5167/uzh-187800.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L. H. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793 (2012).
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L. & Altermatt, F. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Mol. Ecol.* 29, 4258-4264 (2020).
- Stewart, K. A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodivers. Conserv.* 28, 983-1001 (2019).
- Barnes, M. A. & Turner, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics* 17, 1-17 (2015).
- Dejean, T. et al. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *Plos One* 6, e23398 (2011).
- Harrison, J. B., Rogers, J. M. S. and S. M. & Rogers, S. M. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B* (2019) doi:10.1098/rspb.2019.1409.
- Pilliard, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S. & Waits, L. P. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources* 14, 109-116 (2014).
- Strickler, K. M., Fremier, A. K. & Goldberg, C. S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biol Conserv* 183, 85-92 (2015).
- Wilcox, T. M. et al. Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation* 194, (2016).
- Pont, D. et al. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Sci. Rep.* 8, 10361 (2018).
- Laporte, M. et al. Caged fish experiment and hydrodynamic bidimensional modeling highlight the importance to consider 2D dispersion in fluvial environmental DNA studies. *Environ. DNA* 2, 362-372 (2020).
- Jane, S. F. et al. Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Mol Ecol Resour* 15, 216-227 (2015).
- Civade, R. et al. Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. *Plos One* 11, e0157366 (2016).
- Deiner, K. & Altermatt, F. Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *Plos One* 9, e88786 (2014).
- Cantera, I. et al. Characterizing the spatial signal of environmental DNA in river systems using a community ecology approach. *Mol Ecol Resour* (2021) doi:10.1111/1755-0998.13544.
- Cantera, I. et al. Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers. *Sci Rep-uk* 9, 3085 (2019).
- Takahashi, M. et al. Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Sci. Total Environ.* 873, 162322 (2023).
- Bruce, K. et al. A Practical Guide to DNA-Based Methods for Biodiversity Assessment. (2021). doi:10.3897/ab.e68634.
- Morris, L. et al. Active eDNA Is More Cost-Effective Than Fyke Nets or Passive eDNA Collection When Monitoring the Invasion of an Alien Freshwater Fish. *Environ. DNA* 6, (2024).
- Kirtane, A., Atkinson, J. D. & Sassoubre, L. Design and Validation of Passive Environmental DNA Samplers Using Granular Activated Carbon and Montmorillonite Clay. *Environ. Sci. Technol.* 54, 11961-11970 (2020).
- Chen, X., Li, S., Zhao, J. & Yao, M. Passive eDNA sampling facilitates biodiversity monitoring and rare species detection. *Environ. Int.* 187, 108706 (2024).
- Li, J., Handley, L. L., Read, D. S. & Häneling, B. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 18, 1102-1114 (2018).
- Wilcox, T. M. et al. Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation* 194, (2016).
- Pont, D. et al. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Sci. Rep.* 8, 10361 (2018).
- Laporte, M. et al. Caged fish experiment and hydrodynamic bidimensional modeling highlight the importance to consider 2D dispersion in fluvial environmental DNA studies. *Environ. DNA* 2, 362-372 (2020).
- Milhau, T. et al. Seasonal dynamics of riverine fish communities using eDNA. *J. Fish Biol.* 98, 387-398 (2021).
- Lopes-Lima, M. et al. Rapid eDNA survey reveals a unique biodiversity hotspot: The Corubal River, West Africa. *BioScience* biae036 (2024) doi:10.1093/biosci/biae036.
- Bessey, C. et al. Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. *Environ. DNA* 2, 493-504 (2020).
- Ali, N., Rampazzo, R. de C. P., Costa, A. D. T. & Krieger, M. A. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Res. Int.* 2017, 9306564 (2017).
- Guri, G. et al. Quantifying the Detection Sensitivity and Precision of qPCR and ddPCR Mechanisms for eDNA Samples. *Ecol. Evol.* 14, e70678 (2024).
- Ficetola, G. F. et al. Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. 15, (2015).
- Biggs, J. et al. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biol. Conserv.* 183, 19-28 (2015).
- Herder, J. et al. Environmental DNA: A Review of the Possible Applications for the Detection of (Invasive) Species. (2014).
- Thalinger, B. et al. A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. *Environ. DNA* 3, 823-836 (2021).
- Bohmann, K. et al. Strategies for sample labelling and library preparation in DNA metabarcoding studies. *Mol. Ecol. Resour.* (2021) doi:10.1111/1755-0998.13512.
- Piper, A. M. et al. Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *GigaScience* 8, giz092 (2019).
- Antich, A., Palacin, C., Wangensteen, O. S. & Turon, X. To denoise or to cluster, that is not the question: optimizing pipelines for COI metabarcoding and metaphylogeography. *BMC Bioinform.* 22, 177 (2021).
- Rourke, M. L. et al. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environ. DNA* 4, 9-33 (2022).
- Pont, D. et al. Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Mol. Ecol. Resour.* 23, 396-409 (2023).
- Cristescu, M. E. Can Environmental RNA Revolutionize Biodiversity Science? *Trends Ecol. Evol.* 34, 694-697 (2019).
- Miyata, K. et al. Comparative environmental RNA and DNA metabarcoding analysis of river algae and arthropods for ecological surveys and water quality assessment. *Sci. Rep.* 12, 19828 (2022).

