RAPPORT D’ANALYSE

Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Poissons et Mammifères aquatiques en Milieu(x) Courant(s)

UMR-5175 CEFE - DE-23-0608- avril 2024

Une image contenant plein air, nuage, paysage, nature

Description générée automatiquement

**SOMMAIRE**

[1. Description du projet 3](#_Toc157083710)

[2. Fiche terrain (Informations sur l’échantillonnage) 4](#_Toc157083711)

[3. Résultats 5](#_Toc157083712)

[4. Commentaires : 6](#_Toc157083713)

[5. Méthodologie 7](#_Toc157083714)

Rédacteur : Alice Furnari Date de rédaction : 9 avril 2024

Validateur : Julien PLANCHON Date de validation : 9 avril 2024

# Description du projet

**Code étude :** DE-23-0608

**Client :** UMR-5175 CEFE

* **Adresse :** Equipe BEV - CNRS - 1919 Route de Mende - 34293 MONTPELLIER
* **Contact :** Monsieur Claude Miaud
* **Email :** claude.miaud@cefe.cnrs.fr

**Responsable de l’étude :** Alice Furnari [**service.client@spygen.com**](mailto:service.client@spygen.com)

**Type d’analyse :** Analyses VigiDNA M pour l’inventaire des Poissons et Mammifères aquatiques en Milieu(x) Courant(s)

**Nombre d’échantillons : 24**

# Fiche terrain (Informations sur l’échantillonnage)

Voir en PJ le fichier « SPYGEN\_Terrain\_UMR CEFE\_DE230608\_0904\_VigiDNA M\_SC23360\_Mammifères-Poissons »

Date de dernière formation à l’échantillonnage par SPYGEN :

Autres commentaires :

# Résultats

Les résultats sont présentés ci-dessous dans les tableaux en annexes.

* **VigiDNA M Poissons et Mammifères aquatiques**

La liste des espèces ne pouvant pas être différenciées est présentée dans le chapitre [5. Méthodologie](#Méthodologie).

**Tableau I** : Liste des taxons de Poissons détectés -

Voir en PJ le fichier « Résultats\_UMR CEFE\_DE230608\_0904\_VigiDNA M\_SC23360\_Mammifères-Poissons »

(" \* " : Quantité d’ADN insuffisante pour certifier la détection du taxon dans l'échantillon).

**Tableau II :** Liste des taxons de Mammifères aquatiquesdétectés -

Voir en PJ le fichier « Résultats\_UMR CEFE\_DE230608\_0904\_VigiDNA M\_SC23360\_Mammifères-Poissons »

# Commentaires :

L’ADN d’espèces consommées ou d’aquariums peut se retrouver dans le milieu même si les individus ne sont pas réellement présents (suite à des rejets de station d’épuration ou de pisciculture par exemple). Si des espèces consommées des données obtenues avec GenBank® sont présentes dans vos résultats, il convient donc de les interpréter avec précaution.

Les taxons peuvent être détectés avec les bases de références SPYGEN® ou GenBank®. Les données présentes dans la base de références SPYGEN® ont été validées par SPYGEN® et ses partenaires. La base de références GenBank® est cependant une base de référence publique et SPYGEN® ne peut garantir la fiabilité des données qu’elle contient.

# Méthodologie

Spécialisée dans la détection de l'ADN environnemental (ADNe) et plus précisément dans l'ADNe des espèces rares, SPYGEN conçoit depuis 2011 des protocoles d'échantillonnage et d'analyse permettant de maximiser la capacité de détection des traces d'ADN libérées par les taxons recherchés tout en limitant les risques de contaminations. Nos capsules de filtration, développées pour filtrer de grands volumes d'eau, possèdent une membrane de 500 cm2 de surface avec une porosité de 0.45 µm et permettent de réaliser un échantillonnage intégrateur sur plusieurs habitats aquatiques.

## Rappel des préconisations d’échantillonnage :

Les stratégies d'échantillonnage à mettre en place dépendent du milieu étudié. Un rappel de la méthodologie employée est donné ci-après pour les 3 types de milieux étudiés : les milieux courants, les petits milieux stagnants et les grands milieux stagnants.

**En milieux courants :**

L’ADNe est plus difficile à détecter dans les milieux en mouvements, ce dernier est moins disponible dans le temps et l’espace. Les recommandations suivantes permettent de palier à cette difficulté et de maintenir une détectabilité satisfaisante de l’ADNe :

* Réalisation d’un réplica obligatoire (deux capsules de filtration utilisées pour chaque point d’échantillonnage souhaité) ;
* Utilisation d’un système de pompage péristaltique (débit 1 L/min) et du kit tuyau associé, fixé sur une perche ;
* Prospection sur plusieurs allers-retours de berge à berge, à pied ou en embarcation, à contre-courant, c’est-à-dire en direction de l’amont, en positionnant la crépine de prélèvement à distance de toute source de contamination, sur une durée d’une demi-heure par filtre (30 L filtré). En cas d’impossibilité de prospecter le chenal central, il est possible de ne prospecter que les deux rives (un réplica par rive). Dans ce cas, les espèces situées dans le chenal principal pourraient ne pas être détectées ;
* Si ces conditions ne peuvent pas être respectées (fleuves, canaux, milieux semi-stagnants, bras morts…), le protocole donc doit être adapté avec un(e) de nos experts ADNe pour maintenir la qualité des rendus ;
* Dans le cas d’une étude sur des espèces aquatiques, il convient d’intervenir en conditions hydrologiques stabilisées pour la réalisation des échantillonnages. Cette précaution permet d’éviter les colmatages des filtres et renforce la représentativité des résultats. Eviter, dans la mesure du possible, les conditions de forte productivité végétale comme les blooms, les zones riches en matières organiques ou minérales en suspension, etc…, qui peuvent causer un colmatage des filtres et masquer l’ADNe recherché ;
* Dans le cas d’une étude sur des espèces aquatiques, semi-aquatiques et terrestres, il peut être envisagé d’intervenir suite à des précipitations afin de récupérer l’ADNe des berges dans le cours d’eau ;
* Dans le cas où les filtres se colmateraient avant que la filtration ait atteint 30 L (soit 30 minutes), il est conseillé lorsque cela est possible de continuer la filtration en utilisant la pompe à un débit moindre afin de maximiser la quantité d’ADNe récupéré. Une estimation du volume supplémentaire filtré de cette façon est facilement réalisable grâce à une écope et il est utile de mentionner le colmatage et le volume filtré en supplément de cette manière.

## Protocole d’analyse et contrôles qualité :

Les expertises ADN environnemental (ADNe) offrent aujourd’hui des perspectives extraordinaires pour le suivi et la conservation de la biodiversité. Néanmoins, travailler sur de l’ADN rare et/ou dégradé occasionne des contraintes importantes au laboratoire. En effet, il est nécessaire de garantir que l’ADN amplifié à partir d’un échantillon environnemental n’est pas lié à une contamination. Pour cela, la plateforme d’analyse ADNe de SPYGEN est composée de plusieurs salles de laboratoires dont certaines sont de type « salle blanche » et possèdent tout particulièrement deux salles dédiées à l’analyse de l’ADN rare et/ou dégradé. Le personnel utilisant ces laboratoires est formé aux différentes techniques utilisées au sein de SPYGEN et doit respecter des pratiques spécifiques à ce type d’analyses en particulier porter les équipements de protection adaptés et l’utilisation des appareils et matériels développés pour les analyses de l’ADNe.

**Métabarcoding – VigiDNA M**

Notre processus standard de traitement d’un échantillon en VigiDNA M est le suivant :

Une image contenant capture d’écran, panorama

Description générée automatiquement

Le protocole d’extraction de l’ADN a été développé et optimisé sur ces 10 dernières années par les experts de SPYGEN afin de récupérer la plus grande quantité d’ADN y compris le rare et/ou dégradé, issue des capsules de filtration VigiDNA®. Ce savoir-faire inclus tout un processus de limitation des contaminations croisées entre échantillons ainsi que la présence systématique de contrôles négatifs en parallèle des échantillons.

L’étape de l’amplification de l’ADNe est une des étapes cruciales du processus d’analyse de l’ADNe, les extraits ADN sont amplifiés à l’aide de couples d’amorces universels développés et validés par nos experts afin de garantir un équilibre entre la détection d'ADN dégradé (fragments courts) et une résolution taxonomique maximale (détection à l’espèce). L’une des spécialités de SPYGEN est la recherche d’espèces rares, afin d’augmenter la possibilité d’observer ces espèces rares dans les échantillons d’ADNe, les PCR sont réalisées 12 fois, on parle alors de réplicas PCR. Ainsi une espèce observée dans 1 réplica sur 12 est plus rare qu’une espèce observée dans 11 réplicas sur 12. SPYGEN pionnier dans son domaine est aussi le détenteur exclusif de 5 brevets sur des couples d’amorces universels qui ont démontrés leurs efficacités dans les différentes publications scientifiques (disponibles sur demande).

Le séquençage de l’ADNe nouvellement amplifié est la continuité du processus d’analyse. Cette étape permet d’obtenir une lecture des nucléotides qui composent les fragments d’ADNe. Cela se réalise avec des protocoles, spécifiquement développés et optimisés pour favoriser la détection d’espèces rares et limiter les erreurs de séquençage. Aujourd’hui le séquençage se réalise sur des appareils dit « haut rendement » qui permettent l’obtention d’un grand nombre de séquences, rapidement et d’une grande qualité.

S’en suit l’étape de l’analyse bio-informatique, SPYGEN a développé un logiciel bio-informatique qui permet de trier et filtrer les séquences obtenues afin d’éliminer les erreurs dues à l’amplification ou au séquençage. SPYGEN s’est appuyé sur ses 10 années d’analyses de l’ADNe pour l’établissement des seuils bio-informatiques permettant de différencier une séquence réelle d’une espèce rare, d’un bruit de fond issu d’une erreur de séquençage ou d’une erreur d’amplification, minimisant ainsi les faux positifs et les faux négatifs.

C’est également lors de cette analyse que les séquences sont comparées aux bases de références d’espèces. Aujourd’hui SPYGEN possède plusieurs bases de références privées contenant plus de 2000 espèces de vertébrés à l’échelle mondiale. Ces bases sont en partie construites sur des spécimens fournis par nos partenaires institutionnels tels que l’OFB et le MNHN et sont dûment vérifiées et validées génétiquement par nos experts en interne ainsi que confirmées par les données de terrain. SPYGEN utilise également la base de références internationale GenBank afin de compléter ses bases de références internes et dans un souci d’être le plus exhaustif possible dans la détermination des espèces. Il est à noter que l’ensemble des bases de références (internes et mondialement partagées) font l’objet de mises à jour régulières par nos experts en interne.

Dans le cas de l’analyse VigiDNA M, les résultats se présentent sous la forme d’une liste d’espèces par échantillon associées à une nombre de réplicas PCR positif quand il est disponible (pour les amphibiens et les poissons) et un nombre de séquence ADN.

**Aide à l’interprétation des résultats VigiDNA M (Métabarcoding) :**

Les résultats d’analyse sont présentés sous forme de tableau comme dans les exemples suivants. La ou les bases de référence génétiques utilisées (bases de références de SPYGEN et /ou bases de référence mondialement partagées ainsi que leurs numéros de versions) sont rappelés dans les tableaux de résultats :

Tableau 1: Exemple de résultats d'analyses ADNe pour les poissons

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | **Station n°1** | | **Station n°2** | |
|  |  | **SPYXX1234** | | **SPYXX1235** | |
| **Nom scientifique** | **Base de référence** | **Nbr de réplicas positifs** | **Nbr de séquences ADN** | **Nbr de réplicas positifs** | **Nbr de séquences ADN** |
| *Anguilla anguilla* | SPYGEN |  |  | 12 | 59195 |
| *Oncorhynchus mykiss* | SPYGEN |  | \* | 6 | 3854 |
| *Oncorhynchus sp.* | GenBank v247 |  |  | 2 | 1235 |
| *Phoxinus sp.* | SPYGEN |  |  | 12 | 215077 |
| *Pseudorasbora parva* | SPYGEN |  |  | 7 | 3527 |
| *Salaria fluviatilis* | SPYGEN |  |  | 12 | 23375 |
| *Salmo trutta* | SPYGEN | 11 | 324240 | 12 | 164497 |

Tableau 2: Exemple de résultats d'analyses ADNe pour les bivalves

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | **Station n°1** | **Station n°2** | **Station n°3** |
|  |  |  | **SPYXX1234** | **SPYXX1235** | **SPYXX1236** |
| **Ordre** | **Nom scientifique** | **Base de référence** | **Nombre de séquences ADN** | **Nombre de séquences ADN** | **Nombre de séquences ADN** |
| *Unionida* | *Unio mancus* | SPYGEN | 14 511 | 14 511 | 14 511 |
| *Venerida* | *Euglesa milium* | SPYGEN | 1 166 | 1 166 | 1 166 |
| *Venerida* | *Euglesa subtruncata* | SPYGEN | 926 | 926 | 926 |
| *Venerida* | *Sphaerium lacustre* | SPYGEN | 1 766 | 1 766 | 1 766 |
| *Venerida* | *Sphaerium ovale* | SPYGEN | 57 | 57 | 57 |
| *Venerida* | *Sphaerium sp.* | SPYGEN | 126 | 126 | 126 |

Les résultats des analyses pour les espèces piscicoles (*Cf.* tableau 1) et pour les amphibiens (non présentés ici) mettent en évidence deux paramètres, le nombre de réplicas positifs et le nombre de séquences lues par espèce et par échantillon lors de l’analyse associée. Dans le cas des analyses VigiDNA M réalisées sur les autres groupes taxonomiques, seul le nombre de séquences lues est présenté dans les résultats (*Cf.* tableau 2).

Nombre de réplicas positifs (cas des analyses sur les poissons et les amphibiens) :

* Le nombre de réplicas positifs correspond au nombre de fois où, sur les 12 amplifications réalisées par échantillon, l'ADN du taxon indiqué, a été détecté,
* Plus ce nombre est élevé, plus la quantité d'ADN pour ce taxon est importante dans l'échantillon,
* Une case vide correspond à une absence de détection, soit aucune amplification positive sur les 12 réalisées,
* Une case remplie du symbole « \* » indique la détection d’une faible quantité d’ADN de l’espèce considérée dans l’échantillon de base mais pas en quantité suffisante pour permettre de conclure à la présence avérée de l’ADN de cette espèce dans l’échantillon ou à la positivité d’un réplica.

Nombre de séquences (cas général) :

* Le nombre de séquences affiché dans le tableau représente le nombre de séquences ADN lues lors du séquençage. Il est corrélé au nombre de brins d’ADN initialement présents dans l’échantillon de base et constitue donc l’abondance de ces derniers dans l’échantillon.
* Cette valeur peut être comparée au sein d’un même échantillon et d’un même groupe taxonomique. Par exemple, dans le tableau 1, il peut être conclu qu’il y a une proportion relativement comparable de *Pseudorasbora parva* et *d’Oncorynchus mykiss* dans le milieu d’où est issu l’échantillon à droite du tableau. D’autre part, dans le cas de nombre de séquences différentes, l’abondance des espèces les unes par rapport aux autres peut être déduit directement de ces valeurs,
* Il est possible de comparer les nombres de séquences d’un échantillon à l’autre, au sein d’un même groupe taxonomique mais seulement en regard de l’abondance relative des séquences d’un échantillon à l’autre. Par exemple, dans le tableau 1, les 324 240 séquences d’ADN de *Salmo trutta* représentent la totalité des séquences dénombrées dans le premier échantillon et 164 497 séquences dans le second. Conclure que l’abondance relative de l’ADN de *Salmo trutta* dans le premier échantillon est le double de celle du second est erroné. L’abondance relative de séquences de cette espèce dans le second échantillon est de l’ordre de 35 % (164 497 / 469 525), contre 100 % dans le premier, dans lequel il y avait donc 3 fois plus de brins d’ADN dans le milieu 1 que dans le milieu 2.

## Limites des bases de références :

**Amphibiens**

**Tableau annexe** : Liste des taxons d’Amphibiens présents dans la base de références SPYGEN et ne pouvant pas être identifiés à l’espèce.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nom scientifique tel que présenté dans les rapports** | **Nom scientifique** | **Nom vernaculaire** |
| *Bufo sp.* | *Bufo bufo / Bufo spinosus* | Crapaud commun / Crapaud épineux |
| *Pelophylax complexe 1* | *Pelophylax bedriagae / Pelophylax ridibundus / Pelophylax rid. kurtmuelleri* | Grenouille de Bedriaga / Grenouille rieuse / Grenouille des Balkans |
| *Pelophylax complexe 2* | *Pelophylax kl. esculentus / Pelophylax lessonae bergeri / Pelophylax lessonae lessonae* | Grenouille commune / Grenouille de Berger / Grenouille de Lessona |
| *Pelophylax complexe 3* | *Pelophylax kl. grafi / Pelophylax perezi* | Grenouille de Graf / Grenouille de Pérez |

**Bivalves**

**Tableau annexe** : Liste des taxons de Bivalves présents dans la base de références SPYGEN et ne pouvant pas être identifiés à l’espèce.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Ordre** | **Nom scientifique tel que présenté dans les rapports** | **Nom scientifique** | **Nom vernaculaire** |
| ***Unionida*** | *Unio crassus spp.* | *Unio crassus crassus / Unio crassus courtillieri* | Mulette épaisse / Mulette ligérienne |
| *Unio mancus spp.* | *Unio mancus mancus / Unio mancus requienii / Unio mancus turtonii* | Mulette méridionale / Mulette rhodanienne / Mulette corse |
| ***Venerida*** | *Corbicula sp.* | *Corbicula fluminalis / Corbicula fluminea / Corbicula leana* | Corbicule striée / Corbicule asiatique / Corbicule japonaise |

**Mammifères aquatiques et semi-aquatiques**

En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible de différencier le campagnol amphibie (*Arvicola sapidus*) des autres campagnols du genre *Arvicola sp.*.

**Poissons**

Certains taxons de Poissons peuvent être identifiés au genre ou à la famille. Tous les taxons non identifiés à l’espèce dans la base de références SPYGEN sont détaillés dans le Tableau annexe ci-dessous. Il convient d'être vigilant lorsque *Barbus meridionalis* est détecté dans un échantillon où *Barbus barbus* est présent car ces deux espèces sont génétiquement proches (mélange de leur ADN mitochondrial).

**Tableau annexe** : Liste des taxons de Poissons présents dans la base de références SPYGEN et ne pouvant pas être identifiés à l’espèce.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nom affiché sur les rapports** | **Nom scientifique** | **Nom vernaculaire** |
| *Alosa sp.* | *Alosa alosa / Alosa fallax* | Grande alose / Alose feinte |
| *Ammodytidae* | *Ammodytes marinus / Ammodytes tobianus / Hyperoplus lanceolatus* | Lançon équille / Lançon commun |
| *Barbatula sp.* | *Barbatula barbatula / Barbatula quignardi* | Loche franche / Loche du Languedoc |
| *Barbus barbus* | *Barbus barbus* | Barbeau fluviatile |
| *Barbus meridionalis* | *Barbus meridionalis* | Barbeau méridional |
| *Carassius sp.* | *Carassius auratus / Carassius carassius / Carassius gibelio* | Carassin doré / Carassin commun / Carassin argenté |
| *Coregonus sp.* | *Coregonus lavaretus / Coregonus oxyrinchus* | Lavaret / Bondelle |
| *Cottus sp.* | *Cottus aturi / Cottus duranii / Cottus gobio / Cottus hispaniolensis / Cottus perifretum / Cottus petiti / Cottus rhenanus* | Chabot du Béarn / Chabot d'Auvergne / Chabot commun / Chabot des Pyrénées / Chabot fluviatile / Chabot du Lez / Chabot de Rhénanie |
| *Cyprinidae - Complexe 1* | *Chondrostoma nasus / Parachondrostoma toxostoma / Telestes souffia* | Hotu / Toxostome / Blageon |
| *Cyprinidae - Complexe 2* | *Ctenopharyngodon idella / Hypophthalmichthys molitrix* | Amour blanc / Carpe argentée |
| *Cyprinidae - Complexe 3* | *Abramis brama / Blicca bjoerkna* | Brème commune / bordelière |
| *Cyprinidae - Complexe 4* | *Alburnus alburnus / Scardinius erythrophthalmus* | Ablette / Rotengle |
| *Gobio sp.* | *Gobio alverniae / Gobio gobio / Gobio lozanoi / Gobio occitaniae* | Goujon d'Auvergne / Goujon / Goujon de l'Adour / Goujon occitan |
| *Lampetra sp.* | *Lampetra fluviatilis / Lampetra planeri* | Lamproie fluviatile / Lamproie de Planer |
| *Leuciscus sp.* | *Leuciscus idus / Leuciscus leuciscus* | Gardon rouge / Vandoise |
| *Phoxinus sp.* | *Phoxinus bigerri / Phoxinus phoxinus / Phoxinus septimaniae* | Vairon basque / Vairon / Vairon du Languedoc |
| *Pleuronectidae - Complexe 1* | *Platichthys flesus / Pleuronectes platessa* | Flet d’Europe / Plie d’Europe |
| *Pleuronectidae - Complexe 2* | *Hippoglossoides platessoides / Limanda limanda* | Balai / Limande |
| *Pomatoschistus sp.* | *Pomatoschistus microps / Pomatoschistus minutus* | Gobie tacheté / Gobie buhotte |
| *Salvelinus sp.* | *Salvelinus fontinalis / Salvelinus alpinus* | Omble de fontaine / Omble chevalier |

Une image contenant texte, art, grenouille

Description générée automatiquement