

Variations temporelles de l'ADN environnemental pour l'évaluation des espèces piscicoles sur le bassin versant de l'Orgeval

Gaëlle Tallec¹, Evelyne Tales^{1,*}, Axel Flinck¹, Amandine Zham¹, Jérôme Belliard¹,
Céline Le Pichon¹

¹ Irstea, UR HYCAR

* evelyne.tales@irstea.fr

Résumé

Caractériser les communautés piscicoles, diversité et abondance des espèces, est important dans le cadre des plans de conservation et de l'évaluation de l'état écologique des cours d'eau. Les potentialités de l'ADN environnemental comme indicateur de biodiversité, intégratif et déployable à large échelle, le rendent incontournable à brève échéance. Notre étude propose d'évaluer ce nouvel outil à travers un suivi temporel mensuel d'ADNe entre septembre 2016 et février 2018 réalisé sur une station à l'exutoire du bassin de l'Orgeval. Le nombre d'espèces recensées varie de 3 à 21 espèces selon la date considérée. L'analyse des conditions hydroclimatiques (débit et température) précédant la date du prélèvement indique que leurs variations peuvent influencer sur le nombre d'espèces recensées par analyse de l'ADNe : il a tendance à augmenter avec l'augmentation de variation du débit et diminuer avec l'augmentation de variation de température. Une comparaison préliminaire entre échantillons d'ADNe et par pêche électrique indique que le metabarcoding est plus intégrateur.

Points clefs

- ✓ *Le signal ADNe varie au cours du temps (de 3 à 21 espèces de poissons recensées)*
- ✓ *Cette variation peut en partie être expliquée par la variation des conditions hydroclimatiques au cours de la période proche précédant l'échantillonnage*
- ✓ *Les échantillons d'ADNe permettent de recenser plus d'espèces que les méthodes plus classiques*

Introduction

Caractériser les communautés piscicoles, diversité et abondance des espèces, est important dans le cadre des plans de conservation et de l'évaluation de l'état écologique des cours d'eau. Hier, nous avons besoin d'indicateur permettant d'évaluer l'atteinte DCE du bon état écologique. Aujourd'hui, les indicateurs doivent aussi permettre i) l'analyse détaillée des causes de non atteinte du bon état et ii) le suivi précis de l'effet des mesures mises en place pour y revenir. En France, de nombreux travaux sont maintenant orientés vers la mise au point d'indicateurs multi-métriques (Ex : I2M2, IPR+), indicateur global d'évaluation de l'état du système, devant répondre à ces nouveaux besoins. S'il existe déjà un large éventail de méthodes classiques d'inventaire du milieu aquatique (pêches électriques, hydroacoustique, etc.), une nouvelle méthode de détection des espèces, basée sur l'ADN environnemental, se développe depuis quelques années.

L'ADN environnemental (ADNe) est défini comme l'ADN pouvant être extrait d'un échantillon environnemental (sol, eau, air ou contenu stomacal) sans avoir à isoler l'organisme cible en amont (Taberlet et al 2012). Il se caractérise par un mélange d'ADN intracellulaire de cellules vivantes et d'ADN

extracellulaire de cellules dont la structure a été dégradée (Taberlet et al 2012). La méthodologie appliquée à l'ADNe en milieu aquatique consiste à filtrer une quantité d'eau pour récupérer les molécules d'ADNe et à analyser cet échantillon en laboratoire avec des techniques spécifiques de biologie moléculaire. L'ADNe peut se caractériser par un nombre de paires de base très faible (molécule courte < 100 pb) du fait de sa dégradation et nécessite de fait, un protocole particulier (Taberlet et al., 2012). En laboratoire, l'ADNe est d'abord sélectionné à l'aide d'un primer spécifique qui permet de cibler un groupe taxonomique particulier, puis il est amplifié et séquencé. La séquence obtenue est ensuite comparée à une base de données. Lorsque l'on utilise un primer spécifique à une espèce on parle de barcoding. Lorsque l'on utilise un primer spécifique à un taxon on parle de métabarcoding. En 2018, cette méthode de métabarcoding se base sur des connaissances techniques et scientifiques solides et a montré sa fiabilité et son efficacité pour la détection des espèces présentes dans les milieux aquatiques (poissons et amphibiens) (Ficetola et al, 2008 et 2015; Biggs et al., 2014 ; Goldberg et al, 2014; Valentini A et al., 2016). Ses potentialités comme indicateur de biodiversité, intégratif et déployable à l'échelle européenne, la rendent incontournable à brève échéance ; sa mention comme « variable de biodiversité essentielle » est déjà clairement faite par les instances nationales et européennes (FRB et GEO-BON). Ce nouveau suivi permet potentiellement :

- la démultiplication des échantillonnages pour un suivi à large échelle tant spatial que temporel,
- d'englober en quelques échantillons l'ensemble de la biodiversité aquatique d'une station (poissons, amphibiens, odonates, zooplancton...) et d'avoir un indicateur global de biodiversité,
- de mieux suivre les espèces rares ou invasives de par sa sensibilité accrue.

Toutefois, il est important de noter que l'ADNe n'est pas une mesure directe d'inventaire du milieu. De ce fait, des biais spécifiques ou non à la méthode peuvent exister (Darling and Mahon, 2011). L'ADNe peut provenir d'une contamination en laboratoire ou sur le terrain. On parle ici de faux positifs ; une espèce est dite présente alors qu'elle ne se trouve pas en réalité dans le milieu. A l'inverse, il existe des faux négatifs dus par exemple, à une trop faible quantité d'ADNe présent dans l'échantillon ou à la présence d'inhibiteurs de l'amplification moléculaire. Si l'amélioration des techniques d'échantillonnage et d'analyse de l'ADNe permettent aujourd'hui de déjouer ces biais (Ficetola et al., 2015 ; Goldberg et al., 2016), l'analyse du signal dans l'environnement doit être accompagnée d'une connaissance préalable du site et du groupe taxonomique considéré.

L'ADNe est également un outil intégratif. Ainsi il peut être conditionné quantitativement par l'espèce considérée (déchets organiques, déplacement, reproduction, etc.) et qualitativement par les facteurs environnementaux (Strickler et al., 2015 ; Civade et al. 2016). On comprend ici qu'une espèce peut produire des quantités d'ADNe variables suivant son métabolisme, son activité ou le nombre d'individus présents (Goldberg et al., 2016 ; Buxton et al., 2018). Lorsqu'il se retrouve dans le milieu aquatique, l'ADNe est également soumis à différents processus de dégradation, transport, rétention ou resuspension (Dejean et al. 2011 ; Barnes et al., 2014 ; Shogren et al., 2017). Pour évaluer la significativité de ce signal dans le milieu, ses variations spatiales et temporelles doivent être définies au mieux.

Le travail proposé ici se base sur des connaissances techniques et scientifiques solides développées par la société Spygen, avec laquelle collabore Irstea. Dans cette étude, Irstea s'est intéressé aux espèces piscicoles du bassin versant de l'Orgeval (Observatoire ORACLE/BVRE Orgeval, 77). Nous avons suivi mensuellement, sur une période de 18 mois, l'ADNe à l'exutoire du bassin versant, à la station du Theil (H5723011). Ces résultats ont été comparés à ceux des inventaires classiques réalisés sur ce site. Nous avons ainsi pu analyser les variations temporelles de la mesure d'ADNe au regard de différents facteurs environnementaux et écologiques.

1. Matériel et méthode

Notre site d'étude est le bassin versant de l'Orgeval, Observatoire ORACLE / BVRE Orgeval qui suit sur le long-terme l'ensemble des compartiments hydrométéorologiques et la qualité de l'eau. Le bassin versant de l'Orgeval, de 104 km², est situé à 70 km à l'est de Paris, sur le plateau de la Brie. Le ru de l'Orgeval d'une longueur de 1,7 km, est un affluent de rive droite du Grand Morin. Il est constitué par la réunion de deux ruisseaux principaux : le ru de Rognon (grossi du ru de Bourgogne), d'une longueur de 15,6 km et drainant un bassin de 57 km², et le ru des Avenelles, d'une longueur de 11,2 km et drainant un bassin de 46 km². Il existe, par ailleurs, des petits bassins de rétention des eaux de ruissellement à usage d'irrigation répartis sur

le bassin et un étang de pêche notable sur la commune d'Aulnoy directement relié au ru de Rognon. A la confluence des deux principaux ruisseaux se situe la station hydrologique du Theil (Figure 1).

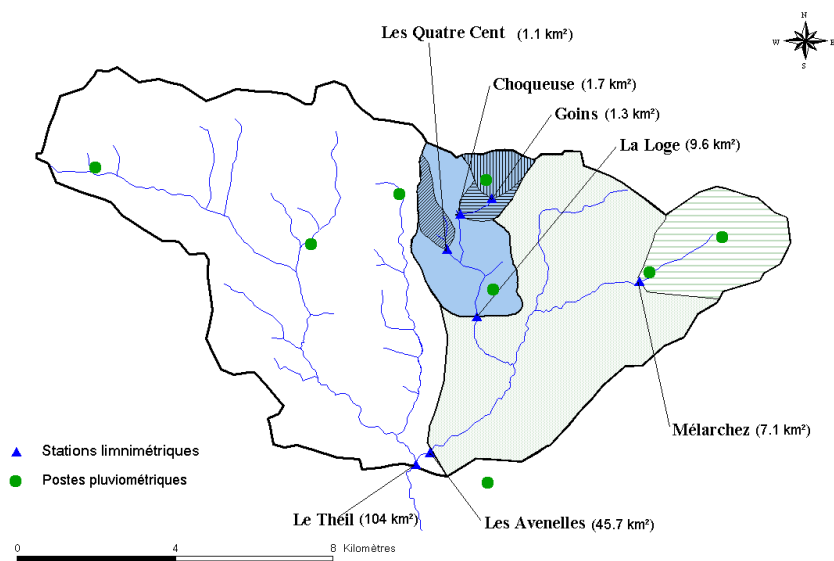


Figure 1. Stations de mesure sur le bassin versant de l'Orgeval (Source : <https://gisoracle.irstea.fr>)

L'ensemble des données hydro-thermiques mesurées par Irstea à cette station et utilisées dans cette étude, débit et températures de l'eau au pas de temps horaire, sont tirées de la base de données BDOH de l'observatoire (<https://bdoh.irstea.fr/ORACLE/>).

Les prélèvements d'ADNe ont été réalisés à l'exutoire du bassin versant à la station du Theil. Un prélèvement d'ADNe a été effectué une fois par mois de septembre 2016 à février 2018. Chaque prélèvement suit un protocole précis développé par Spygen, soit trois filtrations d'eau de rivière, de 30 min environ chacune, à travers une capsule de filtration stérile à usage unique (kit VigiDNA RW) (Figure 2). Pour chaque prélèvement, à l'issue de la filtration, les trois capsules sont remplies d'une solution tampon et envoyées au laboratoire Spygen pour analyse. Au cours de chaque prélèvement sont aussi effectuées, i) une mesure de débit en sortie de filtre lors de la première filtration, et ii) une mesure de la qualité de l'eau (pH, conductivité, oxygène dissous, température) à l'aide d'un analyseur portable WTW, MultiLine® Multi 3620 IDS.

Pour chaque capsule de filtration, le laboratoire Spygen donne, pour chaque échantillon d'ADN extrait via un primer ciblant un groupe taxonomique (téléostéens spécifique dans notre étude), le nombre de répliques PCR positif sur les 12 effectués et donne le pourcentage relatif de séquence ADN correspondant. On note également que lors de l'analyse, des contrôles négatifs pour la PCR sont réalisés pour détecter une éventuelle contamination. Des tests d'inhibition de PCR, due à la présence d'acide humique dans l'échantillon, sont également effectués.



Figure 2. Prélèvement d'ADNe sur le bassin versant de l'Orgeval (source : Irstea)

Pour notre étude, nous nous sommes aussi appuyés sur la connaissance des communautés piscicoles (composition et abondance) dont bénéficie l'observatoire. Plusieurs campagnes de pêches électriques y ont été réalisées par l'équipe HEF (UR HYCAR, Irstea) en 2007, 2008 et 2009. En 2007, des pêches sur 6 stations réparties sur l'ensemble du réseau hydrographique ont été effectuées au cours de deux campagnes (juin et juillet 2007). Des pêches électriques par échantillonnage ponctuel d'abondance (EPA), basé sur la prise en compte d'obstacles majeurs sur le réseau et la présence des confluences, ont été réalisées en 2008 sur le ru de Rognon, et en 2009 sur le ru des Avenelles. Au cours de ces dernières campagnes, des segments de 600 m, représentant 30 EPA environ, ont été répartis sur l'ensemble du réseau (Figure 3). Un point de pêche est réalisé environ tous les 20 m, à l'aide d'un matériel portable de type "Martin pêcheur". Les poissons capturés sont identifiés et mesurés individuellement *in situ*, puis remis à l'eau. Chaque point de pêche est localisé au GPS et fait l'objet d'une description rapide de ses caractéristiques d'habitat local: faciès hydro géomorphologique, hauteur d'eau, substrat du fond, présence d'abris, nature de la ripisylve, colmatage. Ainsi en 2007, 2008 et 2009, 255, 264 et 315 EPA ont été respectivement réalisés. La communauté piscicole du bassin de l'Orgeval est constituée de populations de truites et des espèces qui les accompagnent : loches, vairons et chabots (Le Pichon et al., 2012). Toutefois, s'agissant d'un cours d'eau anthropisé, la truite se retrouvera moins abondamment dans ce bassin par rapport à d'autres populations de milieux de même taille (Le Pichon et al., 2012). Des espèces moins adaptées au milieu ont également été observées telles que la vandoise et le chevaine qui proviennent du Grand Morin ou des étangs (Le Pichon et al., 2012).

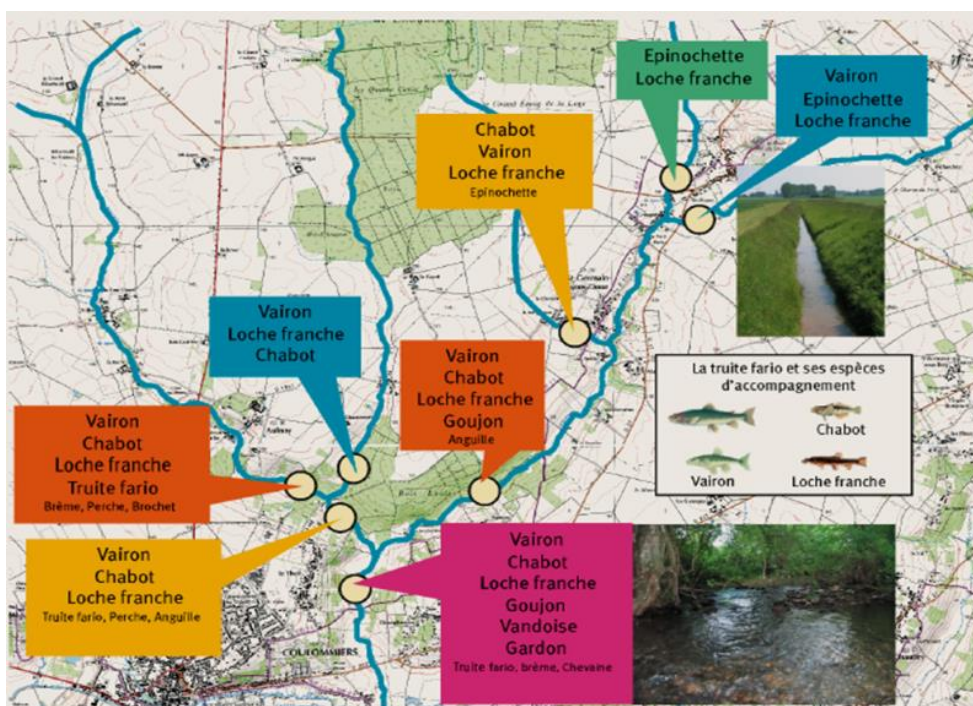


Figure 3. Répartition des espèces piscicoles sur le bassin versant de l'Orgeval, en gras les espèces majoritaires (Le Pichon et al., 2012).

2. Résultats et discussions

2.1 Estimation de la richesse spécifique à partir des analyses d'ADNe

Les analyses moléculaires de l'ensemble de nos prélèvements ont identifié au total 26 espèces de poissons, mais toutes n'ont pas le même pourcentage d'occurrence, ni la même probabilité de détection (Figure 4).

Pour éviter les faux positifs, lors de l'analyse moléculaire un grand nombre de réplicas de PCR (12 pour notre étude) ont été effectués et un filtre d'occurrence sur les séquences d'ADN a été appliqué (toutes les séquences avec une fréquence d'occurrence inférieure à 0,003 par taxon ont été rejetées ; Valentini et al., 2016). Comme suggéré par Ficetola et al. (2015), nous avons également appliqué sur chacun des résultats de métabarcoding (3 par prélèvement), moyenné ensuite sur l'ensemble de la période de prélèvement, un filtre de 5 % sur la moyenne des réplicas PCR positifs (Figure 4) et sur le calcul de probabilité de détection des espèces (données non montrées).

Que cela soit sur la moyenne des réplicas PCR positifs ou sur le calcul de probabilité de détection, le filtre appliqué exclut les mêmes quatre espèces, ce qui les place dans les faux positifs : La Brème bordelière, la Carpe argentée, l'Able de Heckel et le Sandre. Ainsi la richesse spécifique totale sur l'ensemble de la période de mesure est de 22 espèces. Ces espèces sont majoritairement des espèces constitutives du bassin de l'Orgeval. On y retrouve la truite commune et ses espèces d'accompagnements telles que le Chabot, le Vairon et la Loche (Le Pichon et al., 2012). Le chabot et le vairon sont les deux espèces détectées sur tous les prélèvements, souvent sur 100% des réplicas de l'échantillon (Figure 4). La truite commune (Truite Fario) et la Loche franche font également partie des espèces les plus détectées, même si elles peuvent ne pas apparaître dans certains échantillons, voire prélèvements (Figure 4). Le suivi de l'ADNe nous permet bien d'évaluer les espèces représentatives du bassin versant étudié.

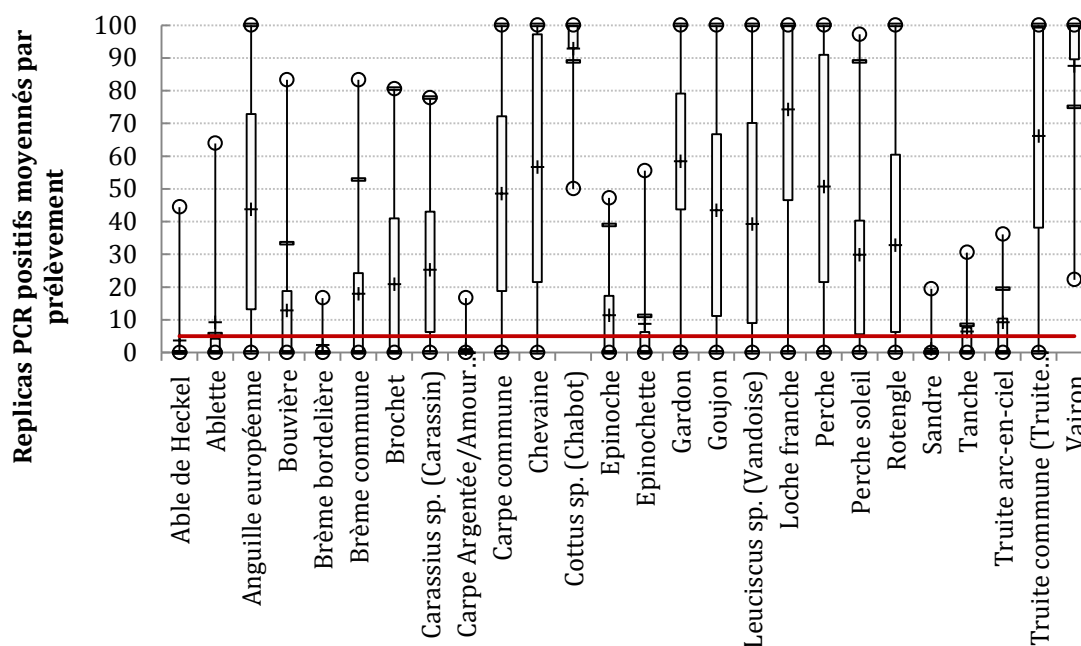


Figure 4. Box plot des réplicas PCR positifs moyennés par prélèvement sur l'ensemble de la période (septembre 2016 à février 2018) : moyenne (croix), 25^e et 75^e percentile (boite), 9^e et 91^e percentile (tiret), maximum et minimum (rond), seuil appliqué (trait rouge).

2.2 Evolution temporelle de la richesse spécifique

Nous avons pris en compte pour le calcul de la richesse spécifique, le cumul des 22 espèces retenues après application des filtres et ayant donc au moins 5% de réplicas PCR positifs sur les 36 effectués par prélèvement. La campagne de suivi temporel de l'ADNe à la station du Theil nous montre une richesse spécifique variable sur le bassin de l'Orgeval, allant de 3 à 21 espèces entre septembre 2016 et février 2018 (Figure 5). Si la richesse spécifique est en moyenne de 16 espèces sur l'ensemble du suivi, nous notons 4 mois consécutifs de prélèvements singuliers (cf. Figure 5, d'octobre 2016 à janvier 2017). Lors de cette

période particulière nous retrouvons principalement la truite commune et ses espèces accompagnatrices (Déc-16 et Janv-17, Figure 6). En novembre 2016, seuls le Chabot et le Vairon sont détectés en nombre significatif (Figure 6). Ces variations peuvent être dues à des problèmes d'échantillonnage et d'analyse ou à des facteurs environnementaux susceptibles de dégrader le signal ADNe ou d'influencer le comportement et la physiologie des espèces piscicoles (Goldberg et al., 2016 ; Strickler et al., 2015 ; Jane et al., 2015).

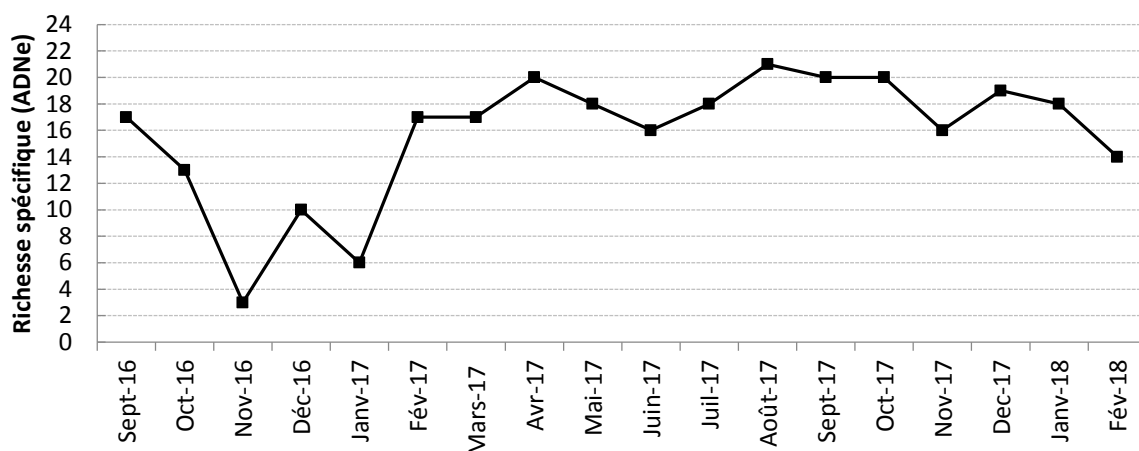


Figure 5. Evolution de la richesse spécifique de la population piscicole sur l'Orgeval à la station du Theil de septembre 2016 à février 2018 par prélèvement d'ADNe

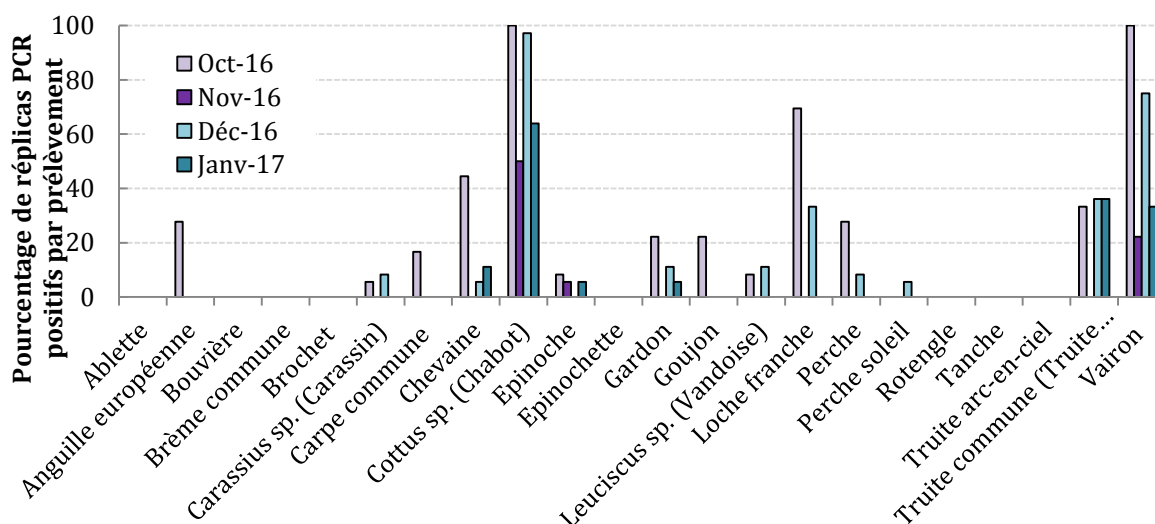


Figure 6. Pourcentage de répliques PCR positifs par prélèvement pour chaque espèce sur la période d'octobre 2016 à janvier 2017.

On pourrait imaginer que ces faibles détections d'ADNe à l'automne et début d'hiver 2016 pourraient être la conséquence d'événements antérieurs et notamment de la crue de juin 2016 qui aurait pu entraîner la dérive exceptionnelle d'une part importante des communautés de poissons et du stock d'ADNe du bassin versant. Cette hypothèse est très improbable car les premiers échantillons, en septembre 2016 (et dans une moindre mesure celui d'octobre 2016) correspondent à la valeur moyenne détectée de la richesse spécifique sur l'ensemble du suivi.

2.3 Facteurs de variation temporelle

Lors des trois filtrations réalisées pour chaque prélèvement, le temps de filtration ainsi qu'une estimation du débit filtré est effectué. Le temps de filtration pour l'ensemble des prélèvements est de 25 ± 06 min en moyenne à un débit moyen de 0.72 ± 0.20 l/min. Sur la période particulière d'octobre 2016 à janvier 2017, le temps moyen de filtration a été de 28 ± 03 min avec un débit moyen de 0.84 ± 0.17 l/min. La forte baisse de richesse spécifique ne s'explique donc pas ici par l'étape de filtration.

On sait également que les acides humiques (en quantité plus importante lors de la chute automnale de feuilles) peuvent être inhibiteurs de la PCR lors de l'analyse moléculaire (Jane et al., 2015). Toutefois, un contrôle PCR permet d'évaluer cette inhibition potentielle, qui n'a pas été observée par le laboratoire Spygen sur ces échantillons particuliers. Cette forte baisse de détection d'espèce ne serait donc pas a priori due à un biais lié au prélèvement ou à l'analyse.

D'un point de vue hydrologique, on note une période sèche inhabituelle de septembre 2016 à janvier 2017, et une période hydrologique à fort débit de novembre 2017 à février 2018 (Figure 7). Pour évaluer l'effet du débit sur la richesse spécifique, nous avons testé plusieurs types de corrélation (Tableau 1). Il apparaît que la meilleure corrélation entre le débit et la richesse spécifique se fait avec le coefficient de variation des débits de la semaine précédant le prélèvement (cf. Tableau 1 ; $R^2 = 0.451$, $y = 2,4 \ln(x) + 9,0$). La richesse spécifique estimée par le signal ADNe augmente quand le débit est plus variable.

Jane et al. (2015), qui ont travaillé sur la persistance du signal ADNe, montrent que celui-ci serait indépendant du débit lorsqu'il est important. Ils n'observent pas de dégradation du signal ; ce dernier étant faible dès le départ par effet de dilution. Nous constatons également que les plus fortes pluies et débits survenus d'octobre 2017 à janvier 2018 n'ont pas entraîné de diminution de détection des espèces (Figure 7). Jane et al. (2015) notent également que le signal ADNe diminue lorsqu'il s'éloigne de sa source avec de faibles débits, en raison probablement d'un processus de décantation. Les mécanismes affectant la détection de l'ADNe sur cette période de novembre 2016 à janvier 2017, peuvent être effectivement liés à différents processus de sédimentation, dégradation ou rétention (Dejean et al. 2011 ; Barnes et al., 2014 ; Jane et al., 2015 ; Shogren et al., 2017). D'autres facteurs tels que la chimie de l'eau et la température peuvent également influencer ces processus (Goldberg et al., 2016). Strickler et al. (2015) ont mené une expérience pour déterminer les effets des rayons UV-B, de la température et du pH sur le taux de dégradation de l'ADNe. Ils montrent que l'ADNe a une durée de vie plus longue dans des conditions froides, sombres et alcalines. Les processus sur la période considérée, plutôt froide, seraient donc plus liés à de la sédimentation qu'à de la dégradation. Le faible nombre d'espèces trouvé sur la période de novembre 2016 à janvier 2017, peut aussi être le fait d'une production moindre d'ADNe. Sur cette période on remarque que les espèces détectées souvent sur 100% des répliques PCR, tel que le chabot et le vairon, ne le sont plus que sur 20 à 50% des répliques PCR (Figure 6). La source d'ADNe est variable suivant le métabolisme, l'activité ou le nombre d'individus présents (Goldberg et al., 2015 ; Buxton et al., 2018). Laramie et al. (2015) ont examiné plusieurs facteurs susceptibles d'influencer les concentrations d'ADNe, dont la température de l'eau en relation avec les préférences et la tolérance de l'habitat chez le saumon. Ils montrent que les concentrations d'ADNe diminuent de façon exponentielle lorsque la température de l'eau dépasse 18° C ($R^2 = 0,87$) pour le saumon. La détection de l'ADNe peut être reliée aux préférences de températures de l'espèce considérée. Les poissons se déplacent en réponse à la lumière du jour, à la température et à la saison; pour éviter la capture ou la prédation; et par rapport à d'autres facteurs à court et à long terme (Stoeckle et al., 2017).

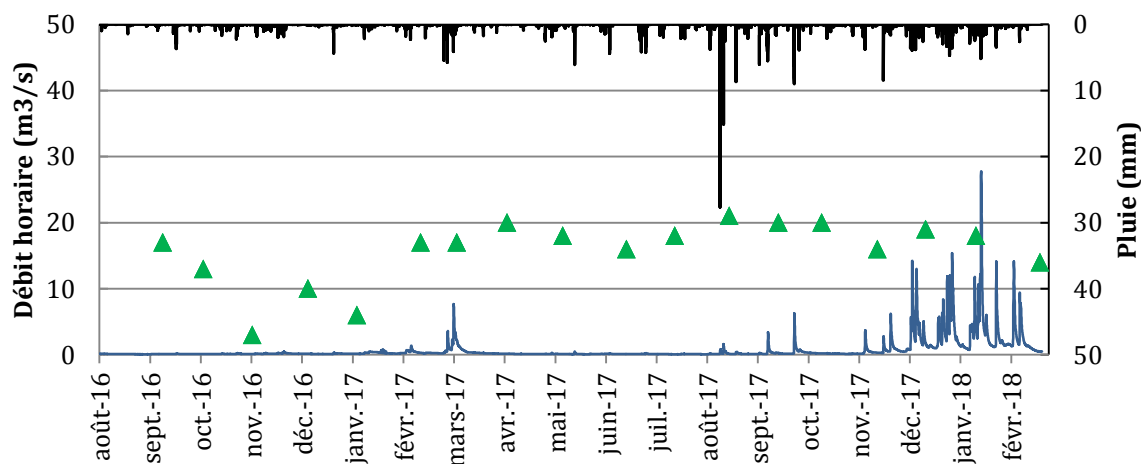


Figure 7. Débit à la station du Theil (trait bleu) et pluie (trait noir) au pas de temps horaire d'août 2016 à février 2018. Les triangles représentent les dates de prélèvement.

Tableau 1. Coefficient de corrélation (R^2) entre la moyenne (moy) et le coefficient de variation (cv) du débit horaire et la richesse spécifique.

Débits testés		R^2	Equation
Débits horaires sur le jour du prélèvement	moy	0.010	
	cv	0.11	
Débits horaires sur le jour précédant le prélèvement	moy	0.061	
	cv	0.295	
Débits horaires sur le mois correspondant au mois de prélèvement	moy	0.029	
	cv	0.117	
Débits horaires sur le mois précédant le mois de prélèvement	moy	0.047	
	cv	0.224	
Débits horaires sur les 3 semaines précédant le prélèvement	moy	0.065	
	cv	0.214	
Débits horaires sur la semaine précédant le prélèvement	moy	0.105	
	cv	0,451	$y = 2,4 \ln(x) + 9,0$

Si l'on regarde les températures de l'eau, on observe des valeurs inférieures à 4°C pour les mois de novembre 2016 à janvier 2017, avec des écarts très importants pour le mois de novembre 2016 (Figure 8). Ces variations importantes et ces valeurs de températures basses sont singulières par rapport à l'ensemble de la période, avec le mois de février 2018 (Figure 8).

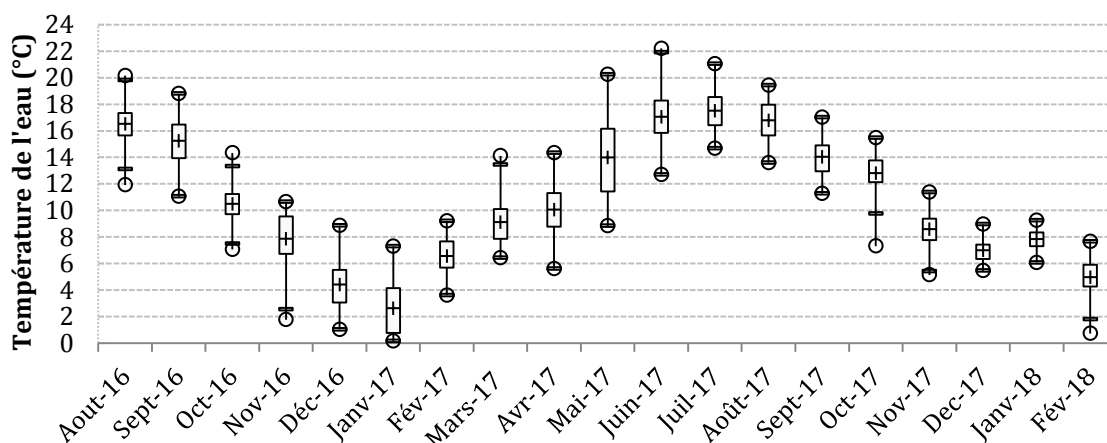


Figure 8. Box plot des températures horaires de l'eau observées au Theil d'Août 2016 à Février 2018 : moyenne (croix), 25e et 75e percentile (boîte), 9e et 91e percentile (tiret), maximum et minimum (rond).

Pour évaluer l'effet de la température, nous avons testé plusieurs types de corrélation de ce paramètre avec la richesse spécifique (Tableau 2). Si ces résultats sont peu significatifs, on constate une tendance ; la variation de température dans la période proche précédant le prélèvement à un effet négatif sur la richesse spécifique. La variation des températures jouerait un rôle plus important que la température elle-même. Si la molécule d'ADNe est sensible à la température, elle aurait tendance à être mieux conservée aux températures les plus faibles (Strickler et al., 2015). Ainsi, cette relation à la température s'expliquerait mieux avec le comportement et la physiologie des espèces piscicoles qu'avec les processus de dégradation.

Tableau 2. Coefficient de corrélation (R^2) entre la moyenne (moy) et le coefficient de variation (cv) de la température de l'eau horaire et la richesse spécifique.

Températures testées		R^2
Températures horaires sur le mois précédant le mois de prélèvement	moy	0.119
	cv	0.084
Températures horaires sur les 3 semaines précédant le prélèvement	moy	0.134
	cv	0.166
Températures horaires sur la semaine précédant le prélèvement	moy	0.269
	cv	0.268

Chaque espèce possède des préférences thermiques propres. Il faut noter que ces préférences diffèrent notablement d'un stade de vie à un autre (Souchon et Tissot, 2012). Souchon et Tissot (2012) ont inventorié pour différents stades, les températures optimales des principales espèces piscicoles qui nous intéressent. Ces données sont présentées par la Figure 9. Dans le cadre de ces gammes de températures dites optimales le poisson est dans ses conditions idéales de développement. Au-delà ou en-deçà des températures optimales, le poisson peut se déplacer vers un habitat mieux adapté (mais les distances parcourues seront proportionnelles à la taille et à l'espèce) ou ralentir son activité, voire mourir. Pour exemple, les anguilles entrent dans un état de torpeur à des températures variant de 3 ° C pour les poissons acclimatés à 29 ° C, à moins de 1 ° C pour les poissons acclimatés à 23 ° C ou moins (Sadler, 1979). On note également que la Truite commune (truite fario TRF) a une température optimale de 18 à 24°C pour son développement, mais a besoin, lors de sa reproduction, de températures plus basses comprises entre 4 et 10 ° C (Figure 9). Sur l'Orgeval, il existe des espèces thermophiles, comme la carpe, et des espèces intermédiaires, comme le vairon, le goujon ou encore le chevaine (Figure 9). Il existe aussi des espèces privilégiant les faibles températures, telles que la loche franche et le chabot. On constate, à travers les préférences thermiques, que la majorité des espèces recensées sont adaptées aux températures du bassin de l'Orgeval, à l'exception de l'ablette et de la perche dont le préférendum thermique est supérieur à la température moyenne du bassin (Figure 9).

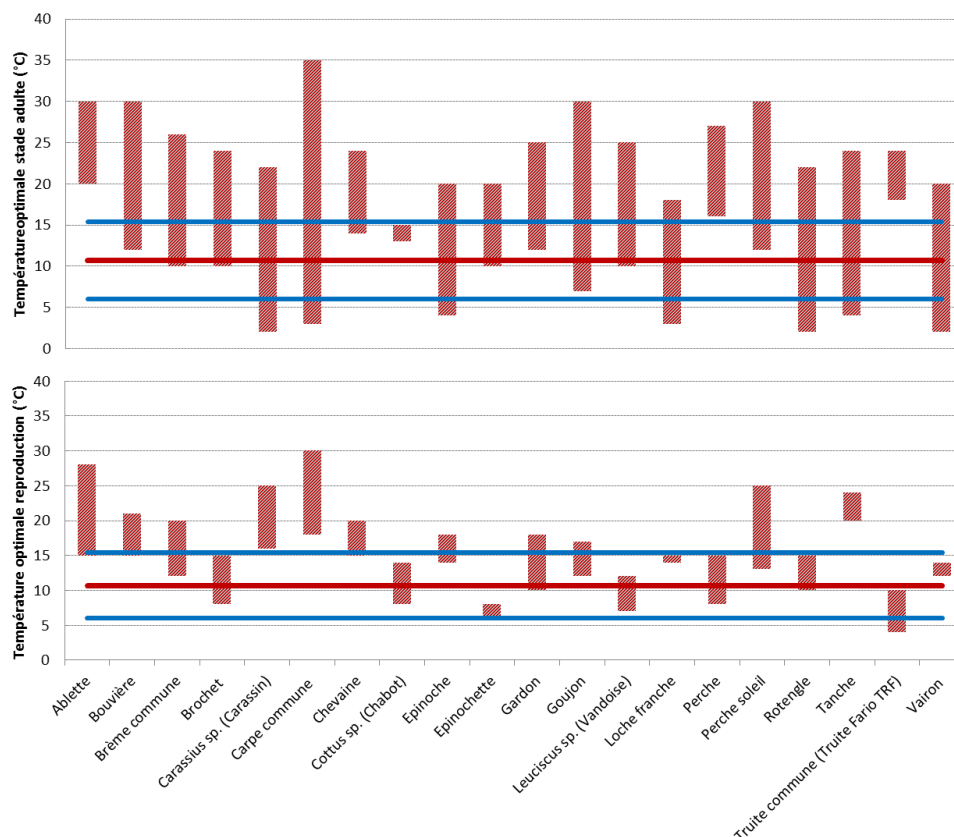


Figure 9. Gammes de température optimale des différentes espèces pour le stade adulte (en haut) et la reproduction (en bas) et température mensuelle moyenne de l'eau (trait rouge) et écart type (trait bleu) sur l'ensemble de la période.

D'après nos résultats, le débit aurait un effet plus immédiat sur le signal de l'ADNe, au contraire de la température. Cela peut s'expliquer par un effet direct du débit sur la probabilité de capture de la molécule d'ADNe (Goldberg et al, 2016) et par un effet indirect de la température sur le comportement et la physiologie des espèces piscicoles. Si certains auteurs ont mis en relation un certain nombre de facteurs influençant les résultats d'ADNe, il est encore difficile de les relier tous convenablement (Stoeckle et al., 2017).

2.4 Comparaison avec la pêche électrique

Au cours de notre étude nous avons également comparé les résultats obtenus par métabarcoding, en termes de richesse spécifique, avec les résultats des pêches électriques effectuées au cours des années 2007, 2008 et 2009 sur le bassin de l'Orgeval. A noter donc que ces données de pêche sont relativement antérieures par rapport aux données issues du métabarcoding. Nos résultats montrent une sensibilité importante du métabarcoding pour évaluer la richesse spécifique d'un bassin versant (Figure 10). Le nombre d'espèces recensées au Theil par métabarcoding est en effet supérieur à celui recensé par pêche électrique quelle que soit la stratégie d'échantillonnage adoptée (échantillonnage ponctuel EPA ou pêche en continu classique). Wilcox et al. (2016) ont déjà montré que la prédiction de détection d'une espèce est plus forte pour l'ADNe que pour les pêches électriques lorsque l'abondance est faible (<5 individus). Toutefois, les résultats comparés sur une station (station du Theil, Figure 11) nous montrent que le métabarcoding est avant tout un outil intégratif. En tenant compte non pas seulement des données de pêche à la station (figure 11), mais de l'ensemble des données de pêche réalisées sur le bassin de l'Orgeval (figure 10), l'écart entre le nombre d'espèces recensées par métabarcoding et celui par pêche électrique se réduit. Cette observation suggère que la mesure du signal ADNe à l'exutoire de ce bassin fournit un inventaire de la biodiversité piscicole présente sur l'ensemble du bassin plutôt qu'un recensement de la diversité locale, contrairement aux échantillons par pêche électrique. Il convient donc d'évaluer cette intégration spatiale du signal ADNe avant toutes interprétations. Certaines études ont montré que les distances de détection d'ADNe depuis sa source sont très variables, allant de quelques mètres à plusieurs kilomètres (Laramie et al., 2015 ; Jane et al., 2015 ; Civade et al., 2016 ; Shogren et al., 2017).

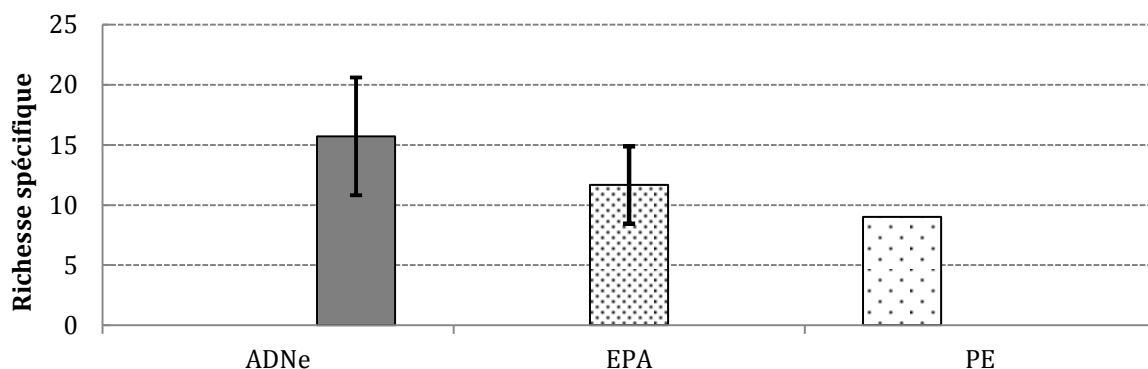


Figure 10. Nombre d'espèces détectées par les différentes méthodes de métabarcoding et de pêches électriques sur tout le bassin versant de l'Orgeval (pour l'ADNe uniquement à la station du Theil).

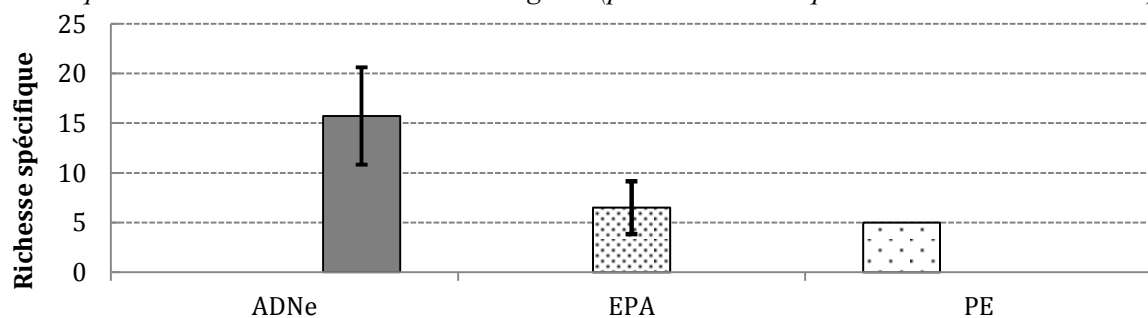


Figure 11. Nombre d'espèces détectées par les différentes méthodes de métabarcoding et de pêches électriques à la station du Theil

3. Conclusions et perspectives

Le suivi temporel du signal ADNe, nous montre qu'il existe une variabilité de la mesure due à différents facteurs (Figure 12). Nos résultats montrent que le signal semble lié, sur l'Orgeval, au coefficient de variation du débit sur la semaine précédant le prélèvement et à la physiologie et au comportement piscicole liés au coefficient de variation des températures de l'eau sur la période précédant le prélèvement.

Si les protocoles d'échantillonnage (efficacité de la filtration et précaution contre la contamination) et les méthodes d'analyse en laboratoire (sensibilité, contamination et inhibition) ont été largement développés depuis ces dernières années, les facteurs environnementaux demandent encore à être étudiés. Ces derniers sont soit site-dépendants, soit espèces-dépendants et comme on l'a vu dans cette étude peuvent également interagir. Nos résultats montrent également que ces facteurs peuvent avoir une temporalité différente. De ce fait, l'estimation de la biomasse par métabarcoding ne peut être aujourd'hui réaliste, même si certaines études permettent d'avancer dans ce sens (Evans et Lamberti, 2011 ; Stoeckle et al., 2017).

Les résultats de notre étude montrent que le métabarcoding peut être un outil efficace et fonctionnel pour le suivi de la richesse spécifique d'un bassin versant. Si cet outil semble plus sensible que les méthodes de pêches traditionnelles, il reste avant tout intégratif. Ces observations seront affinées à l'issue de l'exploitation des données recueillies lors d'une campagne snapshot réalisée en septembre 2018. Lors de cette campagne, des échantillons d'ADNe et des pêches électriques ont été réalisées simultanément sur 9 stations réparties sur l'ensemble du réseau hydrographique de l'Orgeval. La comparaison entre les deux méthodes sera donc plus pertinente. Pour que l'outil soit robuste il ne peut être interprété sans une connaissance préalable des caractéristiques des communautés piscicoles et du site étudiés. Enfin, ce suivi temporel indique que la période la plus favorable pour inventorier les espèces de poissons dans le bassin de l'Orgeval à l'aide de l'ADNe est comprise d'avril à septembre en l'absence de variations majeures hydro-climatiques.

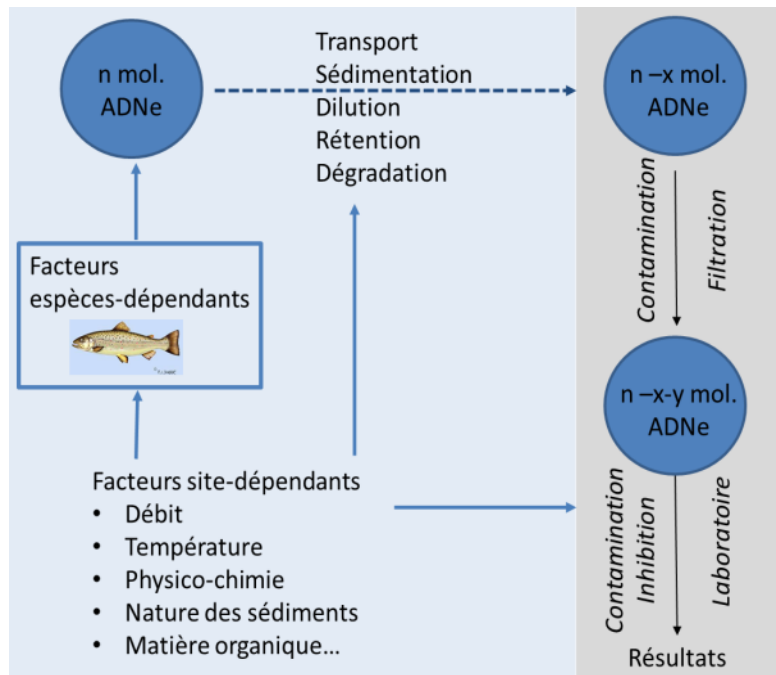


Figure 12. Schéma des différents facteurs pouvant intervenir sur le signal ADNe

Bibliographie

- Barnes, M.A., Turner, C.R., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Chadderton, W.L., Lodge, D.M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1819–1827.
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths R.A., Foster, J., Wilkinson J.W., Arnell A., Brotherton P., Williams P., Dunn F. (2014). Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183, 19-28.
- Buxton A.S., Groombridge J.J., Griffiths R.A. (2018). Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples. *PLoS One* 13(1): e0191737.
- Civade, R., Dejean, T., Roset, N., Raymond, J.C., Bonin, A., Taberlet, P., Pont, D. (2016). Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PLoS One*, 11(6): e0157366.
- Darling J.A., Mahon A.R. (2011). From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring logical invasions in aquatic environments. *Environmental Research* 111:978-988.
- Dejean T., Valentini A., Duparc A., Pellier-Cuit S., Pompanon F., Taberlet, P., Miaud, C. (2011). Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 6: e23398.
- Evans, N. T., & Lamberti, G. A. (2017). Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. *Fisheries Research*, 60-66.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4:423-425.
- Ficetola, G.F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Guiguet-Covex, C., De Barba, M., Gielly, L., Lopes C.M., Boyer F., Pompanon F., Rayé G., Taberlet P. (2015). Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 543–556.
- Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Pilliod, D. S. (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, 1-3.
- Goldberg C.S., Turner C.R., Deiner K., Klymus K.E., Thomsen P.F., Murphy M.A., Spear S.F., McKee A., Oyler-McCance S.J., Cornman R.S., Laramie M.B., Mahon A.R., Lance R.F., Pilliod D.S., Strickler K.M., Waits L.P., Fremier A.K., Takahara T., Herder J.E., Taberlet P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA to detect aquatic species. *Methods in Ecology & Evolution*, 7, 1299 - 1307.
- Jane, S.F., Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Schwartz, M.K., Lowe, W.H., Letcher, B.H., Whiteley, A.R. (2014). Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular ecology resources*, 15(1), 216-227.
- Laramie, M. B., Pilliod, D. S., & Goldberg, C. S. (2015). Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biological Conservation*, 183, 29-37.
- Le Pichon C., Tales E., Belliard J., Gorges G., Zahm A., Clement F. (2012). La distribution spatiale des peuplements de poissons dans les petits bassins versants. *Sciences Eaux and Territoires (spécial n° 3)* 24-33.
- Sadler, K. (1979). Effects of temperature on the growth and survival of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of fish biology*, 15(4), 499-507.

Shogren A.J., Tank J.L., Andruszkiewicz E., Olds B., Mahon A.R., Jerde C.J., Bolster D. (2017). Controls on eDNA movement instreams: Transport, Retention, and Resuspension. *Scientific Reports*, 7(1), 5065.

Souchon Y., Tissot L. (2012) Synthesis of Thermal Tolerances of the Common Freshwater Fish Species in Large Western Europe Rivers. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, EDP sciences/ONEMA, 2012, 405 (3), 48 p.

Stoeckle, M.Y., Soboleva, L., CharlopPowers, Z. (2017). Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. *PLoS One* 12(4): e0175186.

Strickler K. M., Fremier A. K., and Goldberg C. S. (2015). Quantifying effects of UVB, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation* 183:85-92.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain E., Besnard A., Coissac E., Boyer F., Gaboriaud C., Jean P., Poulet N., Roset N., Copp G.H., Geniez P., Pont D., Argillier C., Baudoin JM., Peroux T., Crivelli A.J., Olivier A., Acqueberge M., Le Brun M., Møller P.R., Willerslev E., Dejean T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929-942.

Wilcox TM., McKelvey K. S., Young M.K. , Sepulveda A. J. , Shepard B. B., Jane S. F., Whiteley A.R., Lowe W.H. , Schwartz M. K. (2016). Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation* 194, 209–216