



HAL
open science

Guide méthodologique pour la mise en œuvre de la méthode d'inventaire des peuplements piscicoles de Nouvelle-Calédonie par l'ADN environnemental

Jonathan Grondin, Yannick Dominique, Alice Valentini, Heliott Touron-Poncet, Tony Dejean

► To cite this version:

Jonathan Grondin, Yannick Dominique, Alice Valentini, Heliott Touron-Poncet, Tony Dejean. Guide méthodologique pour la mise en œuvre de la méthode d'inventaire des peuplements piscicoles de Nouvelle-Calédonie par l'ADN environnemental. CNRT Nickel et son environnement. , 20 p., 2019, Programme ADNe NC. [Tome Nickel et Environnement], 10.34928/prqs-2n33 . hal-03413731

HAL Id: hal-03413731

<https://hal.science/hal-03413731>

Submitted on 19 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

GUIDE

méthodologique

**Guide de mise en oeuvre
de la méthode d'inventaire
des peuplements piscicoles
de Nouvelle-Calédonie
par l'ADN environnemental**

GUIDE METHODOLOGIQUE ADN environnemental 2019

MISE EN ŒUVRE DE LA MÉTHODE
D'INVENTAIRE DES PEUPELEMENTS
PISCICOLES DE NOUVELLE-CALÉDONIE PAR
L'ADN ENVIRONNEMENTAL



*Document rédigé dans le cadre des programmes de recherche financés par
le CNRT « Nickel & son environnement »*

CNRT
NICKEL
& son environnement

bioeko
CONSULTANTS

Septembre 2019

SPYGEN[®]

Document rédigé pour le compte de :

CNRT Nickel et son Environnement

101 Promenade Roger Laroque
98 857 Nouméa Cedex
Nouvelle-Calédonie

Dossier suivi par :

France Bailly

Document rédigé par :

Bio eKo Consultants

Dr Yannick DOMINIQUE
Dr Heliott TOURON-PONCET

SPYGEN

Dr Tony DEJEAN
Jonathan GRONDIN
Dr Alice VALENTINI

RÉVISION DU DOCUMENT

Réf.	CSF n° 3PS2015-CNRT.BIOEKO/ADNeNC du 13/03/2017			
Version	Date	Rédacteur(s)	Qualité du rédacteur(s)	Révision pour CNRT
Vf	Septembre 2019	Jonathan GRONDIN SPYGEN	Co-coordonateur du projet	F. Bailly CNRT

CITATION DU DOCUMENT

Mots clés : ADNenvironnemental, inventaire piscicole, ichthyofaune, cours d'eau, ultramafique, Nouvelle-Calédonie

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Grondin, J., Dominique, Y., Valentini, A., Touron-Poncet, H., Dejean, T., 2019 Guide méthodologique pour la mise en œuvre de la méthode d'inventaire des peuplements piscicoles de Nouvelle-Calédonie par l'ADN environnemental. CNRT Nickel et son Environnement. 17 p.

SOMMAIRE

1	<u>INTRODUCTION</u>	4
2	<u>CONTEXTE DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE</u>	4
3	<u>DÉFINITION ET APPLICATION DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL</u>	6
3.1	L'ADN ENVIRONNEMENTAL : DÉFINITION	6
3.1.1	L'ADNE BARCODING OU APPROCHE SPÉCIFIQUE	6
3.1.2	L'ADNE METABARCODING OU APPROCHE MULTISPÉCIFIQUE	6
3.2	PROTOCOLE ET STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE	7
3.2.1	INFORMATIONS PRÉALABLES	7
3.2.2	CAPSULE DE FILTRATION ET POROSITÉ	7
3.2.3	PROTOCOLE D'ÉCHANTILLONNAGE EN MILIEU AQUATIQUE COURANT	7
3.2.4	STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE EN MILIEU AQUATIQUE COURANT	9
3.2.5	SYNTHÈSE DU PROTOCOLE ET DE LA STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE	10
4	<u>ANALYSES EN LABORATOIRE</u>	11
4.1	LABORATOIRES ADNE ET EXIGENCES QUALITÉ	11
4.2	LES ÉTAPES D'ANALYSES	11
4.3	LA BASE DE RÉFÉRENCES GÉNÉTIQUES	12
5	<u>AUTORISATION ET PROCÉDURE DE TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS</u>	15
5.1	TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS	15
5.2	PROCÉDURE ASSOCIÉE AU PROTOCOLE DE NAGOYA	15
6	<u>L'ADN ENVIRONNEMENTAL : AVANTAGES ET LIMITES DE L'APPROCHE MÉTABARCODING</u>	16
7	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	18

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Capsule de filtration VigiDNA® - porosité 0,45µm (©SPYGEN).....	7
Figure 2 : Protocole d'échantillonnage en milieu aquatique courant consistant i) à filtrer de l'eau à travers une capsule de filtration (VigiDNA® 0,45 µm) à l'aide d'une pompe péristaltique (a, b, c) et ii) à remplir la capsule avec une solution de conservation VigiDNA® CL1 Buffer (d). (©SPYGEN, ©AFB).....	8
Figure 3 : Présentation des laboratoires SPYGEN.	11
Figure 4 : Schéma explicatif de l'expertise ADNe metabarcoding en milieu aquatique (©SPYGEN).....	12
Figure 5 : Photographie de <i>Kulia rupestris</i> (a), <i>Glossogobius illimis</i> (b) et de <i>Protogobius attiti</i> (c) (© BioEko).....	14

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Protocole et stratégie d'échantillonnage pour l'inventaire de faune piscicole des cours d'eau de Nouvelle-Calédonie par l'ADNe.....	10
Tableau 2 : Liste des espèces de poissons présentes dans la base de références ADNe de Nouvelle-Calédonie.....	13

LISTE DES SIGLES & ABREVIATIONS

ADNe	ADN Environnemental
AFB	Agence Française pour la Biodiversité
CNRT	Centre National de Recherche Technologique
HER	Hydroécorégions
NGS	Next Generation Sequencing
NMDS	Non-metric Multidimensional Scaling
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction

1 INTRODUCTION

Ce document a été réalisé dans le cadre d'un programme de recherche financé par le CNRT « Nickel & son environnement » visant à étudier la faisabilité de l'application de la méthode ADN environnemental en Nouvelle-Calédonie.

Ce projet ciblait les poissons dulçaquicoles des cours d'eau de Nouvelle-Calédonie. Il a permis de constituer la première base de références génétiques et de réaliser des tests d'échantillonnages et d'analyses ADNe (porosité des membranes, nombre de réplicats, nombre de stations et fréquence des échantillonnages).

Le présent guide méthodologique a ainsi pour objectif de présenter l'ADNe, les exigences qualité associées et les recommandations pour sa mise en œuvre (échantillonnage et analyse) pour l'inventaire des populations de poissons dulçaquicoles des cours d'eau de Nouvelle-Calédonie.

2 CONTEXTE DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE

A l'image du reste de la biodiversité calédonienne, la faune piscicole des cours d'eau de l'archipel est composée de nombreuses espèces rares et menacées. Parmi ces espèces on peut noter la présence de plusieurs espèces endémiques (*Protogobius attiti*, *Sicyopterus sarasini*, *Galaxia neocaledonicus*), ainsi que la présence d'espèces à répartition restreinte à la zone Nouvelle-Calédonie / Vanuatu (*Schismatogobius fuligimentus*, *Lentipes Kaaea*), pour lesquelles le territoire a donc une responsabilité importante en termes de conservation.

Les principales menaces qui pèsent aujourd'hui sur ces milieux sont l'érosion des bassins versants liée à la modification et l'altération de la couverture végétale par les feux de forêt et les espèces envahissantes, ainsi que les exploitations minières anciennes et actuelles. De nombreux cours d'eau présentent aujourd'hui une hydrologie et un transport solide altérés, modifiant ainsi l'habitat des différentes espèces de poissons qui y vivent.

Les inventaires et suivis de la faune piscicole de l'archipel se développent depuis le début des années 2000. Plusieurs missions d'inventaires ont été conduites et ont permis un premier recensement de la biodiversité piscicole du territoire (Marquet *et al.*, 2003). Le suivi de ces communautés demeure néanmoins encore sporadique. Peu de réseaux de suivi pérennes existent à ce jour en Nouvelle-Calédonie.

En effet, on ne recense qu'un seul réseau permanent de suivi des poissons d'eau douce localisé autour du site métallurgique et minier de Vale-NC dans le Sud de la Grande Terre. Quelques suivis ponctuels existent également sur d'autres régions du territoire, autour de certains sites miniers (projet Koniambo, Thio et Tiebaghi pour la SLN) ou sur des bassins versants à forte anthropisation (Néra, La Foa, Koné, Pouembout, Voh). L'ensemble de ces suivis est réalisé par pêche électrique, principale méthode quantitative reproductible utilisée pour inventorier la biodiversité piscicole en milieux tempéré et tropical (Tomanova *et al.*, 2013). En l'absence de normes adaptées aux conditions rencontrées dans les cours d'eau calédoniens, les normes nationales étaient jusqu'à présent utilisées. En 2018, à la demande de différents gestionnaires de la ressource en eau et de la biodiversité, une mission de l'Agence Française pour la Biodiversité (AFB) a été menée afin de proposer une adaptation de la norme nationale aux spécificités des cours d'eau calédoniens.

Cependant, cette méthode de suivi de la biodiversité piscicole présente des limites car elle est sensible à :

- La conductivité des eaux : son efficacité diminue pour des valeurs de conductivité inférieures à $60 \mu\text{S.cm}^{-1}$;
- La taille et la profondeur du cours d'eau : la méthode se prête bien à l'échantillonnage des cours d'eau dont la largeur est inférieure à 10 m et pour les zones où la profondeur n'excède pas 1 m. Au-dessus de ces valeurs, son efficacité diminue (Murphy et Willis, 1996 ; Allard *et al.*, 2014) ;
- Aux caractéristiques intrinsèques des poissons :
 - Les espèces de grande taille sont plus sensibles au champ électrique que les petites (Copp, 1989 ; Cowx et Lamarque, 1990) ;
 - La morphologie, la physiologie ainsi que le comportement des espèces peut également influencer leur sensibilité au champ électrique (Zweimüller, 1995 ; Reyjol *et al.*, 2005).

Ces limites portent atteinte à l'efficacité de la méthode pour le suivi de certaines masses d'eau calédoniennes. Certains petits cours d'eau de la Côte Est présentent de faibles conductivités (proches de $30 \mu\text{S.cm}^{-1}$) et une hydromorphologie cascadante où des trous d'eau à forte profondeur séparent les cascades. Les masses d'eau constituant les parties les plus en aval des cours d'eau présentent souvent de fortes profondeurs rendant difficile leur prospection par pêche électrique. Il apparaissait donc nécessaire de proposer des méthodes d'inventaire alternatives ou complémentaires à la pêche électrique afin de faciliter les inventaires et suivis de la faune piscicole des cours d'eau calédonien.

3 DÉFINITION ET APPLICATION DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL

3.1 L'ADN ENVIRONNEMENTAL : DÉFINITION

L'ADN environnemental (ADNe) est l'ADN qui peut être extrait à partir d'échantillons environnementaux tels que le sol, l'eau ou l'air, sans avoir besoin d'isoler au préalable des individus cibles (Taberlet *et al.* 2012). Il est constitué d'ADN intracellulaire provenant de cellules vivantes et d'ADN extracellulaire issu de cellules dont la structure a été dégradée. Il est caractérisé par un mélange complexe d'ADN nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique provenant de différents organismes. Il existe deux principales approches basées sur l'ADNe : l'ADNe barcoding et l'ADNe metabarcoding.

3.1.1 L'ADNE BARCODING OU APPROCHE SPÉCIFIQUE

L'ADNe barcoding vise à détecter une espèce cible dans l'environnement. Avec cette approche spécifique, l'ADN est extrait à partir d'un échantillon environnemental puis amplifié par PCR ou qPCR en utilisant un couple d'amorces spécifique pour l'espèce recherchée. L'espèce ciblée est considérée comme étant présente dans l'écosystème étudié lorsque son ADN est amplifié par les amorces. La première étude d'ADNe barcoding en milieu aquatique a été réalisée en France sur la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*), une espèce exotique envahissante (Ficetola *et al.* 2008). Depuis, elle a été utilisée avec succès pour détecter des espèces invasives ou patrimoniales d'amphibiens (Goldberg *et al.*, 2011 ; Dejean *et al.*, 2012 ; Olson *et al.*, 2012 ; Thomsen *et al.*, 2012a ; Pilliod *et al.*, 2013, 2014 ; Santas *et al.*, 2013), de poissons (Jerde *et al.*, 2011 ; Takahara *et al.*, 2012 ; Thomsen *et al.*, 2012a ; Thomsen *et al.*, 2012b ; Takahara *et al.*, 2013 ; Mahon *et al.*, 2013), de reptiles (Piaggio *et al.*, 2014), d'invertébrés (Thomsen *et al.*, 2012a ; Tréguier *et al.*, 2014), de mollusques (Lance & Carr, 2012 ; Goldberg *et al.*, 2013) et de mammifères (Foote *et al.*, 2012 ; Thomsen *et al.*, 2012a).

Plusieurs études ont montré que l'approche ADNe barcoding permettait une détectabilité plus élevée que les méthodes traditionnelles, à un coût souvent inférieur (Darling & Mahon, 2011 ; Dejean *et al.*, 2012 ; Biggs *et al.*, 2015). Cependant, la principale limite de cette approche est qu'elle permet de détecter uniquement l'espèce recherchée, ce qui rend impossible la détection d'espèces non attendues dans l'écosystème étudié, comme par exemple des espèces exotiques.

3.1.2 L'ADNe METABARCODING OU APPROCHE MULTISPÉCIFIQUE

L'ADNe metabarcoding (ou approche multispécifique) a été développé pour pallier aux limites de l'approche ADNe barcoding. L'ADN est extrait à partir d'un échantillon environnemental, amplifié en utilisant des amorces spécifiques à un groupe taxonomique donné (poissons, vertébrés, bactéries, etc.), puis séquencé à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération (NGS). Cette approche « en aveugle » permet d'identifier simultanément plusieurs taxons appartenant à un même groupe taxonomique sans connaissance "a priori" des espèces susceptibles d'être présentes dans le milieu étudié (Taberlet *et al.* 2012). De plus, à partir du même échantillon environnemental, plusieurs groupes taxonomiques peuvent être étudiés. L'ADNe metabarcoding se révèle donc être un outil de veille environnementale performant pour étudier la biodiversité dans son ensemble tout en détectant efficacement la présence d'espèces exotiques ou menacées.

3.2 PROTOCOLE ET STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE

Cette étude a permis de mettre en évidence que les protocoles ADNe établis par SPYGEN pour le suivi de la faune piscicole en métropole sont également applicables en Nouvelle-Calédonie.

3.2.1 INFORMATIONS PRÉALABLES

Compte tenu des risques importants de contamination des prélèvements lors des missions de terrain, l'échantillonnage ADNe doit être réalisé par du personnel formé aux méthodes d'échantillonnage ADNe. Les prélèvements doivent être idéalement effectués dans les habitats les plus favorables pour les espèces recherchées et lorsque celles-ci sont les plus actives et libèrent un maximum d'ADN dans leur environnement (par exemple pendant la période de reproduction).

3.2.2 CAPSULE DE FILTRATION ET POROSITÉ

Quel que soit le type de milieu aquatique étudié, l'échantillonnage consiste à filtrer de l'eau au travers d'une capsule contenant une membrane à très faible porosité. La porosité de cette membrane joue un rôle crucial dans la capacité à capturer l'ADN en fonction du milieu étudié. Pour les cours d'eau de Nouvelle-Calédonie, la porosité de 0,45 μm a été validée pour une détection optimale des espèces de poissons dulçaquicoles (Grondin *et al*, 2019).



Figure 1 : Capsule de filtration VigiDNA® - porosité 0,45 μm (©SPYGEN)

3.2.3 PROTOCOLE D'ÉCHANTILLONNAGE EN MILIEU AQUATIQUE COURANT

Les prélèvements doivent être réalisés systématiquement à l'aval de la zone étudiée. L'ADN retenu dans les échantillons prélevés reflète la présence des espèces sur une certaine distance en amont.

Le protocole d'échantillonnage consiste à filtrer 30 litres d'eau au travers d'une capsule de filtration (porosité 0,45 μm), à l'aide d'une pompe péristaltique (débit d'environ 1 litre par minute) et d'un tuyau à usage unique (conditionné au préalable en laboratoire) (Figure 2).

Deux réplicats par station d'échantillonnage sont recommandés (2 échantillons l'un à la suite de l'autre ou en simultané selon le nombre de pompes disponibles).

Après filtration, la capsule est remplie d'une solution de conservation, fermée, agitée, avant d'être envoyée au laboratoire pour analyse. Le mode de conservation dépend de la nature de la solution tampon utilisée et des recommandations du fabricant.

Dans le cadre de l'étude menée par SPYGEN et Bio eKo, les filtres VigiDNA® 0,45 µm et la solution tampon VigiDNA® CL1 Buffer ont été utilisés. Cette solution tampon permet une conservation à température ambiante. Cette étude a permis de mettre en évidence que deux réplicats permettent d'être très représentatif des communautés de poissons présentes sur le site étudié (94,2 % de la richesse totale) Cet effort d'échantillonnage permet également d'optimiser les moyens matériels, humains et le coût des analyses associées.



Figure 2 : Protocole d'échantillonnage en milieu aquatique courant consistant i) à filtrer de l'eau à travers une capsule de filtration (VigiDNA® 0,45 µm) à l'aide d'une pompe péristaltique (a, b, c) et ii) à remplir la capsule avec une solution de conservation VigiDNA® CL1 Buffer (d). (©SPYGEN, ©AFB)

3.2.4 STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE EN MILIEU AQUATIQUE COURANT

La distance du signal ADN est une des questions principales qui se pose dans les études basées sur l'ADNe. Cette question a été traitée pour la première fois en utilisant la méthode ADNe metabarcoding dans l'article de Civade *et al.* 2016, puis ensuite dans celui de Pont *et al.* 2018.

Ces études ont montré que la distance de détection de l'ADN en milieu courant peut varier en fonction des caractéristiques hydrologiques du cours d'eau (profondeur et vitesse du courant) et de la quantité d'ADN « source » libérée dans le milieu. Ainsi, dans des petits cours d'eau, la distance de détection est de l'ordre de quelques kilomètres (Civade *et al.* 2016). Dans des grands cours d'eau, comme le Rhône, la distance de détection est de plusieurs dizaines de kilomètres (Pont *et al.* 2018).

Cette notion de distance du signal ADN a pu être abordée dans le cadre de cette étude. En effet, une forte différenciation des peuplements piscicoles a été mise en évidence entre l'amont et l'aval des cours d'eau étudiés. Par exemple, sur le Thio, des espèces ont été détectées sur la station amont, mais pas sur la station aval distante d'environ 5 km (Grondin *et al.*, 2019). Nous désignons ici l'aval comme étant le cours d'eau inférieur, situé dans la plaine littorale. L'amont correspond au cours d'eau cours moyen situé entre 50 et 450 m d'altitude et présentant des pentes inférieures à 10%. Le cours supérieur, qui se situe au-delà de 450 m d'altitude et présente de fortes pentes (supérieures à 10%), est souvent dépeuplé de poissons car un obstacle naturel important tel que des cascades, marque le passage vers celui-ci.

Ainsi, dans le contexte calédonien, il sera nécessaire d'effectuer des prélèvements ADNe sur deux stations positionnées à l'amont et à l'aval du cours d'eau, pour réaliser un inventaire piscicole représentatif de l'ensemble de la masse d'eau.

D'autre part, l'étude de la variabilité saisonnière effectuée dans le cadre de ce projet montre que deux campagnes d'échantillonnage, réparties en saison de basses eaux et de hautes eaux, permettent d'atteindre une richesse spécifique plus importante et plus représentative des cours d'eau étudiés qu'une seule campagne.

3.2.5 SYNTHÈSE DU PROTOCOLE ET DE LA STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE

Les recommandations concernant le protocole et la stratégie d'échantillonnage ADNe à mettre en œuvre pour l'inventaire des peuplements piscicoles sur les cours d'eau de Nouvelle-Calédonie sont synthétisées dans le tableau suivant.

Tableau 1 : Protocole et stratégie d'échantillonnage pour l'inventaire de faune piscicole des cours d'eau de Nouvelle-Calédonie par l'ADNe.

Protocole et stratégie d'échantillonnage recommandés	
Filtre : type	Membrane encapsulée avec large surface de filtration (ex. Capsule VigiDNA®) - Stérile
Filtre : porosité de la membrane	0,45 µm
Outils de filtration : Pompe et tuyau	Pompe péristaltique. Tuyau conditionné en salle blanche, à usage unique et équipé d'une crépine à son extrémité
Volume / Débit de filtration	30 Litres / 1 Litre par minute
Nombre de réplicat terrain par station	2 réplicats
Options pour un inventaire le plus exhaustif possible sur l'ensemble d'un cours d'eau	
Nombre de station par cours d'eau	2 stations (amont et aval)
Fréquence des échantillonnages	1 en période de basses eaux et 1 en période de hautes eaux

4 ANALYSES EN LABORATOIRE

4.1 LABORATOIRES ADNE ET EXIGENCES QUALITÉ

Il est indispensable que les laboratoires utilisés pour réaliser les analyses ADNe soient adaptés pour traiter des échantillons environnementaux contenant de l'ADN rare ou dégradé. Les laboratoires doivent offrir un environnement de type « salle blanche » permettant d'éviter les contaminations extérieures et entre échantillons. Il est recommandé de disposer de plusieurs salles d'analyses correspondant chacune à un niveau de rareté d'ADN différent (Figure 3), de pressions différentielles, d'un renouvellement d'air fréquent et d'un traitement UV.

Le personnel doit aussi disposer d'un équipement adapté (combinaison, gants, masque, charlotte et surchaussures à usage unique).



Figure 3 : Présentation des laboratoires SPYGEN.

4.2 LES ÉTAPES D'ANALYSES

L'ADN est extrait à partir de la capsule de filtration utilisée sur le terrain puis amplifié par PCR à l'aide d'un couple d'amorces universel pour le groupe taxonomique recherché. Pour chaque échantillon 12 réplicats PCR sont réalisés (Figure 4).

Les ADN amplifiés sont ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération, puis les séquences obtenues sont analysées grâce à des outils bio-informatiques et comparées à la base de références locale et à la base de références publique GenBank®.

Des contrôles négatifs sont effectués simultanément, à chaque étape du protocole d'analyse, afin de contrôler la pureté des consommables utilisés et de mettre en évidence une possible contamination croisée au cours de la manipulation. Le protocole détaillé est présenté dans la publication de Pont *et al.* 2018.

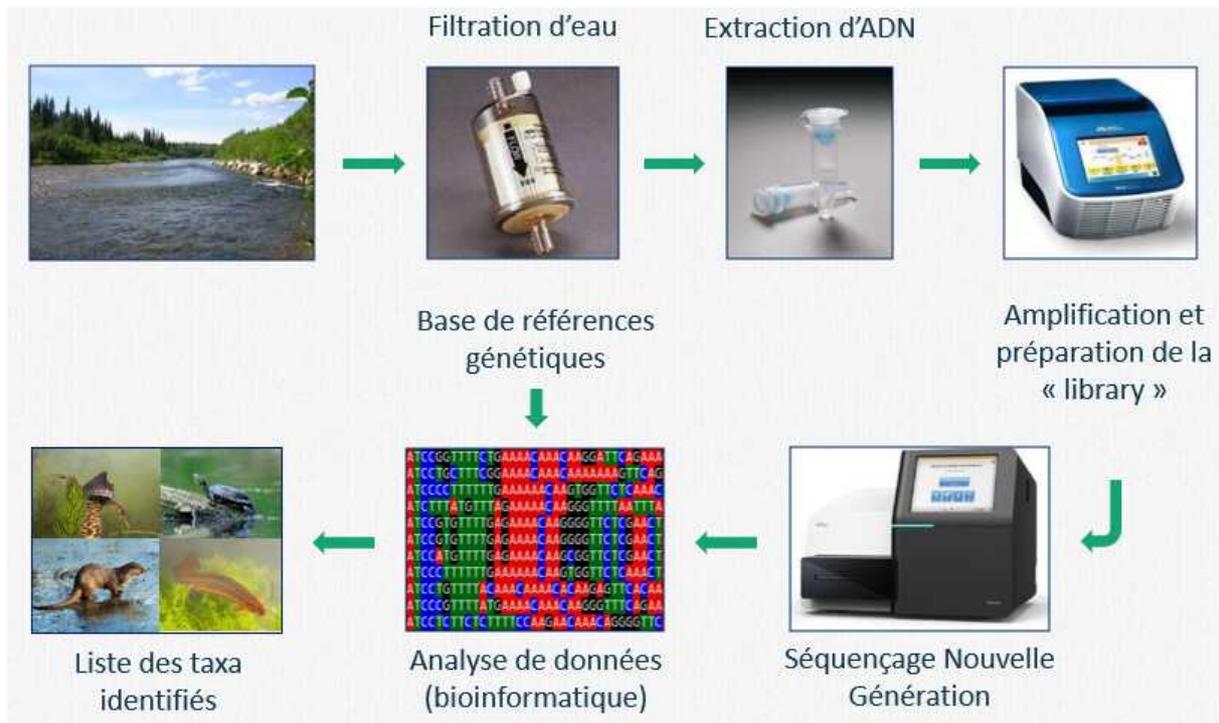


Figure 4 : Schéma explicatif de l'expertise ADNe metabarcoding en milieu aquatique (©SPYGEN)

4.3 LA BASE DE RÉFÉRENCES GÉNÉTIQUES

La mise en place de bases de références génétiques pour le groupe taxonomique ciblé est une étape essentielle dans le développement de l'approche ADNe metabarcoding. L'utilisation d'une base de données de références locale et la plus exhaustive possible permet de pallier aux problèmes liés aux bases de données publiques (GenBank®), à savoir le manque de séquences pour la région génétique ciblée, la diminution de la résolution taxonomique due à des séquences d'espèces non présentes sur le territoire étudié, ainsi que des possibles erreurs de séquençage et d'identification des espèces (Valentini *et al.* 2016).

Pour construire la base de références, l'ADN de chaque poisson est extrait à partir d'un petit fragment de nageoire. Il est ensuite amplifié, purifié puis séquencé à l'aide de la technologie NGS.

Les séquences sont ensuite analysées puis implémentées dans les bases de références créées pour ce groupe taxonomique. Le protocole détaillé est présenté dans la publication de Valentini *et al.* 2016.

La base de références génétiques, développée par SPYGEN et Bio eko dans le cadre de ce projet, comprend aujourd'hui 45 espèces de poissons.

Cette base de références génétiques est disponible sous la forme d'une liste d'espèces et des séquences ADN (12S) associées, auprès du CNRT (contact : cnrt@cnrt.nc).

Tableau 2 : Liste des espèces de poissons présentes dans la base de références ADNe de Nouvelle-Calédonie.

Nom scientifique	
<i>Ambassis miops</i> (ambache)	<i>Microphis cruentus</i> (syngnathe)
<i>Anguilla marmorata</i> (anguille marbrée)	<i>Ophieleotris</i> sp.
<i>Anguilla megastoma</i> (anguille de montagne)	<i>Parioglossus neocaledonicus</i>
<i>Anguilla reinhardtii</i> (anguille tachetée)	<i>Poecilia reticulata</i> (Million)
<i>Awaous guamensis</i> (lochon blanc)	<i>Protogobius attiti</i>
<i>Awaous ocellaris</i> (lochon blanc)	<i>Psammogobius biocellatus</i>
<i>Bleheratherina pierucciae</i>	<i>Redigobius balteatus</i>
<i>Butis amboinensis</i> (lochon)	<i>Redigobius bikolanus</i>
<i>Cestraeus oxyrhincus</i> (mulet noir)	<i>Sarotherodon occidentalis</i> (Tilapia)
<i>Crenimugil crenilabis</i> (mulet noir)	<i>Scatophagus argus</i>
<i>Eleotris acanthopoma</i> (lochon noir)	<i>Schismatogobius fuligimentus</i>
<i>Eleotris fusca haplotype 1</i> (lochon noir)	<i>Sicyopterus lagocephalus</i> (lochon noir)
<i>Eleotris fusca haplotype 2</i> (lochon noir)	<i>Sicyopterus sarasini</i> (lochon noir)
<i>Eleotris melanosoma</i> (lochon noir)	<i>Sicyopus zosterophorus</i>
<i>Galaxias neocaledonicus</i>	<i>Smilosicyopus chloe</i>
<i>Giuris margaritacea</i>	<i>Stenogobius yateiensis</i>
<i>Glossogobius illimis</i>	<i>Stiphodon atratus</i>
<i>Hypseleotris cyprinoides</i>	<i>Stiphodon mele</i>
<i>Kuhlia marginata</i> (carpe rouge)	<i>Stiphodon sapphirinus</i>
<i>Kuhlia munda</i> (queue jaune)	<i>Trichopodus trichopterus</i>
<i>Kuhlia rupestris</i> (carpe)	<i>Xiphophorus hellerii</i> (porte épée)
<i>Lamnostoma kampeni</i> (anguille serpent)	<i>Xiphophorus maculatus</i> (porte épée)
<i>Microphis brachyurus</i> (syngnathe)	



(a)



(b)



(c)

Figure 5 : Photographie de *Kulia rupestris* (a), *Glossogobius illimis* (b) et de *Protogobius attiti* (c) (© BioEko).

5 AUTORISATION ET PROCÉDURE DE TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

5.1 TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

Les filtres VigiDNA® et la solution tampon VigiDNA® CL1 Buffer ne contiennent aucun composant dangereux. Aucune restriction n'est applicable à son transport. Après échantillonnage, les capsules contenant la solution tampon peuvent donc être envoyées directement au laboratoire d'analyse par un transporteur sous un délai de 1 mois.

Dans le cas d'une utilisation de filtres et de solutions tampon différents, il est recommandé de vérifier la dangerosité des composants et les éventuelles restrictions associées à leur transport.

5.2 PROCÉDURE ASSOCIÉE AU PROTOCOLE DE NAGOYA

La France, dont la Nouvelle-Calédonie, a ratifié le 31 août 2016 le protocole de Nagoya. Ce protocole, associé à la Convention sur la diversité biologique, est un accord international visant à partager les avantages découlant de l'utilisation des ressources génétiques d'une manière juste et équitable.

Pour tout inventaire de la biodiversité réalisé par l'ADNe et le transfert des échantillons vers un laboratoire extérieur ou non à la Nouvelle-Calédonie, une autorisation de la part des autorités environnementales, Province Nord et Sud, est nécessaire.

6 L'ADN ENVIRONNEMENTAL : AVANTAGES ET LIMITES DE L'APPROCHE MÉTABARCODING

Les avantages de cette nouvelle approche d'inventaire par l'ADNe sont nombreux. Tout d'abord, l'ADNe metabarcoding permet une meilleure détectabilité des espèces que les inventaires traditionnels.

Les comparaisons méthodologiques réalisées dans le cadre de cette étude montrent que le nombre d'espèces détectées par l'ADNe (21) est supérieur à celui obtenu par les pêches électriques (9) (Grondin *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'effort d'échantillonnage nécessaire pour déterminer les communautés d'espèces présentes sur le site étudié est plus faible, puisqu'une campagne d'inventaire par ADNe permet d'obtenir une richesse spécifique équivalente à 6 campagnes par pêche électrique. Ce protocole donne ainsi l'opportunité de réaliser des suivis de la biodiversité plus efficaces, de réduire les moyens humains (1 personne peut réaliser les prélèvements par l'ADNe), matériels et les coûts associés.

Cette efficacité avait été démontrée sur le territoire métropolitain dès 2016 par l'équipe de SPYGEN (Valentini *et al.* 2016), en mettant en évidence une détection par l'ADNe des espèces de poissons d'eau douce identique ou plus élevée que par les inventaires classiques dans 89% des cas. Dans cette même étude, la détectabilité d'espèces de poissons marins est également plus importante par la méthode ADNe metabarcoding que par les différentes méthodes d'inventaire classiques testées (plongées nocturnes, mise en place de verveux...). Plus récemment, avec une méthodologie optimisée, SPYGEN a mis en évidence dans le cadre d'une étude réalisée sur le Rhône (Pont *et al.* 2018) que le nombre d'espèces détectées par ADNe est toujours supérieur aux résultats obtenus par pêche électrique sur une année et est similaire au nombre total d'espèces identifiées sur un cumul de 10 années de pêche électrique. Enfin, l'efficacité de la méthode ADNe metabarcoding a également été démontrée en Guyane sur des cours d'eau de taille et de typologie très variés (Cantera *et al.*, 2019).

L'ADNe metabarcoding peut se révéler très avantageux dans les habitats où les méthodes traditionnelles ne peuvent pas être mises en œuvre en raison de contraintes logistiques (faible accessibilité à un site aquatique) ou lorsque leur efficacité est limitée (par exemple la pêche électrique ne peut être effectuée dans les eaux à faible conductivité, Allard *et al.*, 2014). Sur les cours d'eau de Nouvelle-Calédonie, il ressort que la méthode d'inventaire par ADNe permet d'avoir une image plus complète de la communauté piscicole, en assurant la détection des espèces les moins abondantes (ex : *Glossogobius ilimis*), des espèces réagissant mal au champ électrique (ex. *Crenimugil crenilabis*), et parmi lesquelles figurent de nombreuses espèces protégées (Grondin *et al.*, 2019).

Comme toute technique d'inventaire de la biodiversité, l'approche ADNe metabarcoding présente certaines limites. Cette approche ne donne pas d'informations sur la taille, les stades de développement, le sexe des organismes ciblés et elle ne permet actuellement pas de distinguer les espèces hybrides puisque les analyses se font à partir d'ADN mitochondrial, hérité uniquement de la mère. De plus, l'approche ADNe metabarcoding ne permet pas à ce jour d'effectuer des estimations quantitatives fiables. Certaines études ont démontré une relation entre la quantité d'ADNe observée et la biomasse des organismes présents sur les sites échantillonnés (Takahara *et al.*, 2012 ; Thomsen *et al.*, 2012a ; Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016), mais d'autres études sont nécessaires pour valider ces résultats. Par conséquent, le nombre de séquences ADN obtenues par taxon à la fin de l'analyse ne doit pas être interprété de façon quantitative, mais plutôt de façon semi-quantitative en différenciant les espèces abondantes et rares au sein d'un échantillon (Pompanon *et al.*, 2012 ; Pont *et al.*, 2018). Il convient de noter toutefois qu'une quantification fiable est également difficile à obtenir en utilisant les méthodes traditionnelles, en fonction des caractéristiques des écosystèmes étudiés, de l'échantillonnage et des biais d'identification pour certaines espèces (Miranda & Schramm, 2000).

L'ADNe metabarcoding et les méthodes d'inventaire classiques peuvent donc être considérées comme des approches complémentaires. Si l'objectif est d'obtenir une liste des espèces présentes dans un écosystème aquatique, y compris les espèces rares ou discrètes, l'ADNe metabarcoding pourrait être privilégié. Si des données supplémentaires sont nécessaires (stade de développement, sexe, etc.), les méthodes d'inventaire traditionnelles doivent être utilisées en parallèle ou *a posteriori* de l'approche ADNe.

L'ADNe metabarcoding représente un outil de nouvelle génération pour une surveillance efficace, précise, standardisée et reproductible de la biodiversité aquatique de différents écosystèmes et permet de fournir des données clés pour aborder de nombreuses questions fondamentales en écologie. Une normalisation de ces méthodes d'inventaire par l'ADN environnemental est actuellement en cours de réalisation avec l'AFNOR. Les tests réalisés en Nouvelle-Calédonie dans le cadre de ce projet seront pris en compte pour le développement de cette standardisation.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Allard, L., Grenouillet, G., Khazraie, K., Tudesque, L., Vigouroux, R. & Brosse, S. (2014) Electrofishing efficiency in low conductivity neotropical streams: towards a non-destructive fish sampling method. *Fisheries Management and Ecology*, 21, 234–243.
- 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. (2015) Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183, 19–28.
- Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J.-C., Bonin, A., Taberlet, P. & Pont, D. (in press) Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PLoS One*.
- Darling, J.A. & Mahon, A.R. (2011) From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111, 978–988.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. (2012) Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49, 953–959.
- Footo, A.D., Thomsen, P.F., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., Kyhn, L.A., Salling, A.B., Galatius, A., Orlando, L. & Gilbert, M.T.P. (2012) Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PloS One*, 7, e41781.
- Goldberg, C.S., Pilliod, D.S., Arkle, R.S. & Waits, L.P. (2011) Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PloS One*, 6, e22746.
- Goldberg, C.S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J. & Waits, L.P. (2013) Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32, 792–800.
- Grondin, J., Dominique, Y., Valentini, A., Touron-Poncet, H., Dejean, T. (2019) Faisabilité de l'application de la méthode ADN environnemental en Nouvelle-Calédonie. Rapport final. CNRT Nickel et son Environnement. 49p.
- Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L. & Lodge, D.M. (2011) 'Sight-unseen' detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4, 150–157.
- Lacoursière-Roussel, A., Côté, G., Leclerc, V. & Bernatchez, L. (2016) Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*. DOI: 10.1111/1365-2664.12598
- Lance, R.F. & Carr, M.R. (2012) Detecting eDNA of invasive dreissenid mussels: report on capital investment project. ANSRP Technical Notes Collection. ERDC/TN ANSRP-12-2. Vicksburg, MS: US Army Engineer Research and Development Center. Available at: <http://el. erdc. usace. army. mil/publications. cfm>.
- Mahon, A.R., Jerde, C.L., Galaska, M., Bergner, J.L., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., Hunter, M.E. & Nico, L.G. (2013) Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments. *PLoS One*, 8, e58316.
- Marquet, G., Keith, P., Vigneux, E. (2003). Atlas des poissons et des crustacés d'eau douce de Nouvelle-Calédonie. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. Patrimoines Naturels, 58:282p.
- Miranda, L.E. & Schramm, H.L. (2000) Selecting gear for monitoring fish assemblages. *Management and ecology of river fisheries*, 3–13.
- Murphy, B.R., Willis, D.W. (1996). *Fisheries techniques*, 2nd edition. Am Fish Soc, Bethesda, MD

- Olson, Z.H., Briggler, J.T. & Williams, R.N. (2012) An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildlife Research* 39, 629–636.
- Piaggio, A.J., Engeman, R.M., Hopken, M.W., Humphrey, J.S., Keacher, K.L., Bruce, W.E. & Avery, M.L. (2014) Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 14, 374–380.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S. & Waits, L.P. (2014) Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14, 109–116.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P. & Richardson, J. (2013) Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70, 1123–1130.
- Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O.C., Brown, D.S., Jarman, S.N. & Taberlet, P. (2012) Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21, 1931–1950.
- Pont, D., M. Rocle, A. Valentini, R. Civade, P. Jean, A. Maire, N. Roset, M. Schabuss, H. Zornig & T. Dejean, 2018. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports* 8: 10361.
- Reyjol, Y., Loot, G., Lek, S. (2005). Estimating sampling bias when using electrofishing to catch stone loach. *Journal of Fish Biology* (2005) 66, 589–591. doi:10.1111/j.1095-8649.2005.00621
- Santas, A.J., Persaud, T., Wolfe, B.A. & Bauman, J.M. (2013) Noninvasive method for a statewide survey of eastern hellbenders *Cryptobranchus alleganiensis* using environmental DNA. *International Journal of Zoology*, 183, 38–45.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L.H. (2012) Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, 1789–1793.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. & Kawabata, Z. (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 7, e35868.
- Takahara, T., Minamoto, T. & Doi, H. (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One*, 8, e56584.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M. & Willerslev, E. (2012a) Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 7, e41732.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L. & Willerslev, E. (2012b) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, 2565–2573.
- Thomsen, P.F. & Willerslev, E. (2015) Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4–18.
- Tomanova, S., Tedesco, P. A., Roset, N., Berrebi dit Thomas, R. and Belliard, J. (2013), Systematic point sampling of fish communities in medium- and large-sized rivers: sampling procedure and effort. *Fish Manag Ecol*, 20: 533-543. doi:10.1111/fme.12045.
- Tréguier, A., Paillisson, J.-M., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M.A. & Roussel, J.-M. (2014) Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology*, 51, 871–879.
- 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, J.-M., 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*, DOI: 10.1111/mec.13428.

