



**HAL**  
open science

## Développement d'outils moléculaires pour l'identification et l'étude de la distribution des 3 espèces de lamproies à l'échelle nationale

Ahmed Souissi, Anne-Laure Besnard, Guillaume Evanno

### ► To cite this version:

Ahmed Souissi, Anne-Laure Besnard, Guillaume Evanno. Développement d'outils moléculaires pour l'identification et l'étude de la distribution des 3 espèces de lamproies à l'échelle nationale. OFB; Inrae; Institut Agro; UPPA. 2022, 17 p. hal-03933969

**HAL Id: hal-03933969**

**<https://hal.science/hal-03933969v1>**

Submitted on 11 Jan 2023

**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 4.0 International License

# Développement d'outils moléculaires pour l'identification et l'étude de la distribution des 3 espèces de lamproies à l'échelle nationale

Rapport Final

Ahmed Souissi<sup>1,2</sup>  
Anne-Laure Besnard<sup>1,2</sup>  
Guillaume Evanno<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UMR DECOD (Dynamique et Durabilité des Ecosystèmes),  
INRAE, L'Institut Agro, IFREMER, Rennes

<sup>2</sup>Pôle Gestion des Migrateurs Amphihalins dans leur  
Environnement, OFB, INRAE, Institut Agro, UNIV PAU &  
PAYS ADOUR/E2S UPPA

Décembre 2022

## • AUTEURS

**Ahmed SOUISSI**, Post-doctorant INRAE, UMR DECOD, pôle OFB-INRAE-Institut Agro-UPPA Gestion des migrateurs amphihalins dans leur environnement, [ahmed.souissi@inrae.fr](mailto:ahmed.souissi@inrae.fr)

**Anne-Laure BESNARD**, Technicienne de recherche INRAE, UMR DECOD, pôle OFB-INRAE- Institut Agro -UPPA Gestion des migrateurs amphihalins dans leur environnement, [anne-laure.besnard@inrae.fr](mailto:anne-laure.besnard@inrae.fr)

**Guillaume EVANNO**, Directeur de recherche INRAE, UMR DECOD, pôle OFB-INRAE- Institut Agro -UPPA Gestion des migrateurs amphihalins dans leur environnement, [guillaume.evanno@inrae.fr](mailto:guillaume.evanno@inrae.fr)

## • CONTRIBUTEURS

**Laurent BEAULATON**, Chef du pôle OFB-INRAE- Institut Agro -UPPA Gestion des migrateurs amphihalins dans leur environnement, [laurent.beaulaton@ofb.gouv.fr](mailto:laurent.beaulaton@ofb.gouv.fr)

**Droits d'usage** : accès libre

**Niveau géographique** : national

**Couverture géographique** : France

**Niveau de lecture** : citoyens, professionnels, experts

Pôle Gestion des Migrateurs Amphihalins dans leur Environnement

Développement d'outils moléculaires pour l'identification et l'étude de la distribution des 3 espèces de lamproies à l'échelle nationale



- **DEVELOPPEMENT D'OUTILS MOLECULAIRES POUR L'IDENTIFICATION ET L'ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES 3 ESPECES DE LAMPROIES A L'ECHELLE NATIONALE, AHMED SOUISSI, ANNE-LAURE BESNARD ET GUILLAUME EVANNO**

- **RESUME**

Ce projet avait pour objectif de développer des marqueurs moléculaires permettant d'identifier les 3 espèces de lamproies présentes en France (*Petromyzon marinus*, *Lampetra fluviatilis* et *L. planeri*) et de détecter leur présence à partir d'ADN environnemental (ADNe). Nous avons testé l'utilisation d'un marqueur mitochondrial qui permet de distinguer *P. marinus* du genre *Lampetra*. Nous avons également développé un marqueur de l'ADN nucléaire dénommé diagLpf qui permet de distinguer *L. fluviatilis* et *L. planeri* par PCR quantitative. Ce marqueur est particulièrement utile pour identifier les ammocètes aux plus jeunes stades, qu'il est impossible d'identifier par des critères morphologiques. Enfin, avec le marqueur diagLpf, nous ne sommes pas parvenus à détecter la présence de lamproies à partir d'ADNe extrait avec des échantillons d'eau. De futures investigations dans ce domaine seront donc à développer avec les nouvelles techniques disponibles telles que la PCR digitale.

- **MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)**

ADN environnemental, *Lampetra fluviatilis*, *Lampetra planeri*, *Petromyzon marinus*, PCR quantitative.

## • SOMMAIRE

### Table des matières

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
I.1.	ESPECES ETUDIEES .....	6
I.2.	STATUTS A L'ECHELLE EUROPEENNE ET FRANÇAISE .....	6
I.3.	OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	6
<b>II.</b>	<b>METHODES .....</b>	<b>7</b>
II.1.	DISTRIBUTION DES ESPECES ETUDIEES .....	7
II.2.	SITES D'ETUDE ET ECHANTILLONNAGE .....	7
II.3.	PROTOCOLE D'ECHANTILLONNAGE DE L'ADNE .....	9
II.4.	DEVELOPPEMENT DES MARQUEURS DIAGNOSTIQUES .....	11
II.5.	ANALYSES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE .....	11
<b>III.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>12</b>
III.1.	VALIDATION DES MARQUEURS DIAGNOSTIQUES .....	12
III.2.	TEST DES MARQUEURS DIAGNOSTIQUES SUR L'ADN ENVIRONNEMENTAL.....	13
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>14</b>
<b>V.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>15</b>
<b>VI.</b>	<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>16</b>
<b>VII.</b>	<b>SIGLES &amp; ABREVIATIONS .....</b>	<b>16</b>

## I. Introduction

### I.1. Espèces étudiées

A l'échelle mondiale, 42 espèces de lamproies ont été décrites (Docker, 2015) dont trois sont présentes en France. La lamproie marine (*Petromyzon marinus* Linné, 1758), la lamproie fluviatile (*Lampetra fluviatilis* Linné, 1758) et la lamproie de Planer (*L. planeri* Bloch 1784) se caractérisent par des cycles de vie différents. La lamproie marine et la lamproie fluviatile sont migratrices (anadromes) et parasites lors de leur phase marine alors que la lamproie de Planer n'est pas parasite, et résidente en eau douce. Les trois espèces ont la particularité d'avoir un stade larvaire très long, de 5 à 7 ans, durant lequel les larves (ou ammocètes) restent enfouies dans le substrat meuble des cours d'eau.

Par ailleurs, chez les lamproies le statut taxonomique et la notion d'espèce sont souvent sujet à controverse du fait l'existence de 'paires' d'espèces très proches, l'une étant parasite et l'autre non (Zanandrea 1959; Vladykov & Kott 1979; Docker 2009). Il est largement admis que les espèces non parasites ont divergé à partir des formes parasites (Docker, 2009; Vladykov and Kott, 1979; Zanandrea, 1959). Ainsi, *L. fluviatilis* et *L. planeri* possèdent des caractéristiques morphologiques très proches, partagent la même aire géographique et ne sont distinguables morphologiquement qu'après la métamorphose des ammocètes. Ces deux espèces peuvent s'hybrider et sont considérées comme des écotypes dans plusieurs études récentes (Rougemont et al. 2015, 2017, 2021).

### I.2. Statuts à l'échelle européenne et française

La directive Habitat-Faune-Flore 92/43/CEE (21-05-1992) stipule que les lamproies *P. marinus*, *L. fluviatilis* et *L. planeri* sont des espèces prioritaires d'intérêt communautaire dont la conservation nécessite la désignation de Zones Spéciales de Conservation ou ZSC (Annexe II). *P. marinus* et *L. fluviatilis* sont classées comme espèces vulnérables selon cette directive. La convention de Bern (19-09-1979) classe ces 3 espèces comme espèces protégées (Annexe III) et la convention OSPAR (25-03-1998) considère *P. marinus* comme une des espèces marines menacées et/ou en déclin.

A l'échelle nationale, l'arrêté ministériel du 8 décembre 1988 considère les lamproies *P. marinus*, *L. fluviatilis* et *L. planeri* comme des espèces de poisson protégées sur l'ensemble du territoire national qui peuvent faire l'objet de mesures de protection de biotope. Les frayères des trois espèces sont également protégées par la Circulaire du 27.07.1990. L'utilisation des lamproies pour la pêche à la ligne et aux engins a été interdite par l'article R.236-49 du Code rural et la taille minimum de capture est fixée à 40 cm pour *P. marinus* et à 20 cm pour *L. fluviatilis*. De plus, *P. marinus* est classée 'En danger' sur la liste rouge UICN des espèces menacées en France, et *L. fluviatilis* y est classée 'Vulnérable'.

### I.3. Objectifs de l'étude

La distribution des trois espèces de lamproies est actuellement mal connue en France (André et al., 2018). De plus, l'identification des lamproies est basée sur des critères morphologiques qui sont parfois peu fiables surtout pour différencier *L. planeri* et *L.*

*fluviatilis* au stade larvaire (ammocète). Une solution pour identifier les 3 espèces à tous les stades de vie serait l'utilisation de marqueurs moléculaires diagnostiques. En outre, cette approche pourrait être étendue à l'étude de l'ADN environnemental (ADNe) afin de détecter les 3 espèces *via* les traces d'ADN qu'elles laissent dans l'eau. En effet, il existe des marqueurs moléculaires basés sur l'ADN mitochondrial qui permettent de détecter la lamproie marine (*P. marinus*) par ADNe, ainsi que le genre *Lampetra*, sans distinction de la lamproie de Planer et de la lamproie fluviatile (Docker *et al.*, 1999 ; Gustavson *et al.*, 2015 ; Hume, 2013). Néanmoins, il n'existe actuellement aucun marqueur moléculaire permettant de distinguer les 2 espèces du genre *Lampetra* qui partagent un ADN mitochondrial similaire.

Ce projet vise donc 1) à développer une nouvelle approche basée sur des marqueurs moléculaires afin de pouvoir distinguer les trois espèces de lamproies et 2) à tester la faisabilité de la détection par ADNe de ces trois espèces en utilisant les marqueurs nouvellement développés.

## II. Méthodes

### II.1. Distribution des espèces étudiées

La lamproie marine est présente largement dans tout l'Atlantique Nord. Sur les côtes européennes, elle se rencontre depuis la péninsule ibérique au Sud jusqu'à l'Islande et la péninsule scandinave au Nord. En France, la lamproie marine est présente dans les petits fleuves picards, normands et bretons, ainsi que dans les grands fleuves en Loire, Charente, Gironde, dans l'Adour et un certain nombre de cours d'eau côtiers aquitains (Nive et Nivelle) (André *et al.*, 2018 ; Taverny and Elie, 2008).

La lamproie fluviatile est présente dans toute l'Europe du Nord et de l'Ouest depuis la Péninsule Ibérique à partir du fleuve Tage au sud jusqu'à la Scandinavie et la Baltique au nord. En France, l'espèce est présente le long de la côte atlantique (Loire, Gironde, mais quasi-absente de Bretagne) et de la Manche jusqu'au Rhin (Taverny and Elie, 2008).

La lamproie de Planer est largement distribuée en Europe et se répartit comme *L. fluviatilis* tout en étant présente plus en amont dans les bassins versants. En France, elle est largement répandue (y compris en Bretagne) y compris dans les bassins versants des grands fleuves (Taverny and Elie, 2008).

### II.2. Sites d'étude et échantillonnage

Pour le développement des marqueurs diagnostiques, des échantillons de référence des trois espèces ont été utilisés à partir de la collection COLISA ([www.colisa.fr](http://www.colisa.fr)) et aussi de la collection issue de la thèse de Quentin Rougemont (Figure 3 & tableau 1). Pour tester l'approche ADNe, douze stations au total ont été échantillonnées, au sein desquelles la présence d'au moins une des 3 espèces de lamproies était connue : sur la Sélune (7 stations) et le Scorff (5 stations) (Figures 1 et 2). Les prélèvements d'eau ont été effectués d'aval en amont (afin d'éviter toute contamination) en Juillet 2019. Nous avons aussi analysé des échantillons d'ADNe provenant d'échantillons d'eau prélevés lors d'une campagne pour l'étude des écrevisses en avril 2015 et mai 2016 (Figure 1).



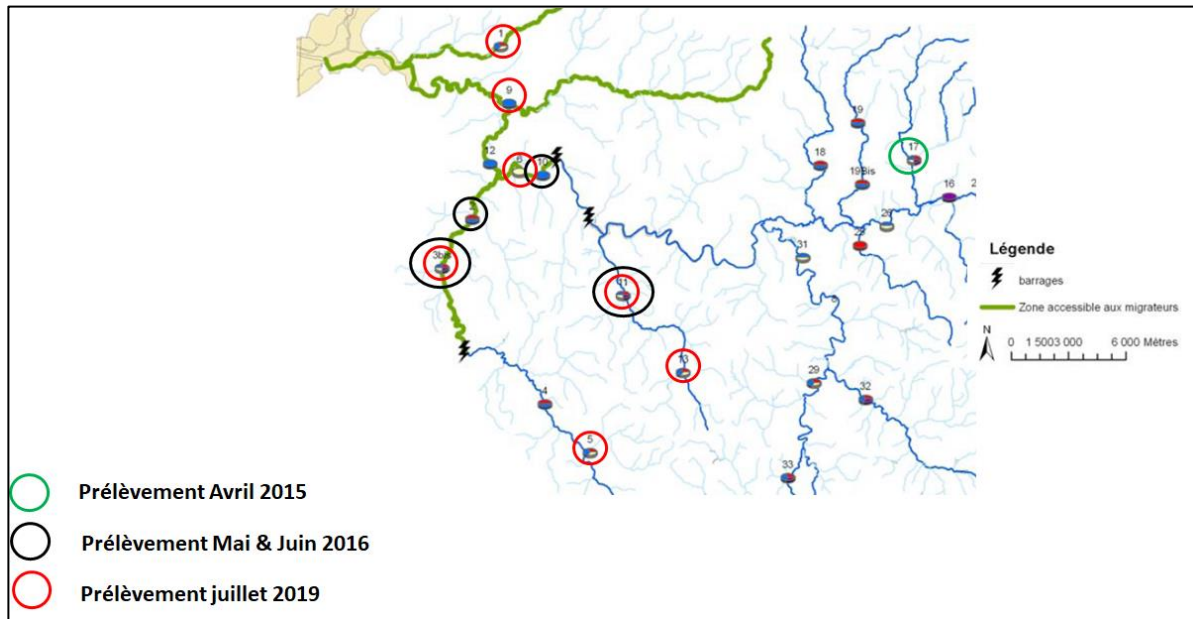


Figure 1: Sites échantillonnés (eau) sur le bassin versant de la Sélune.

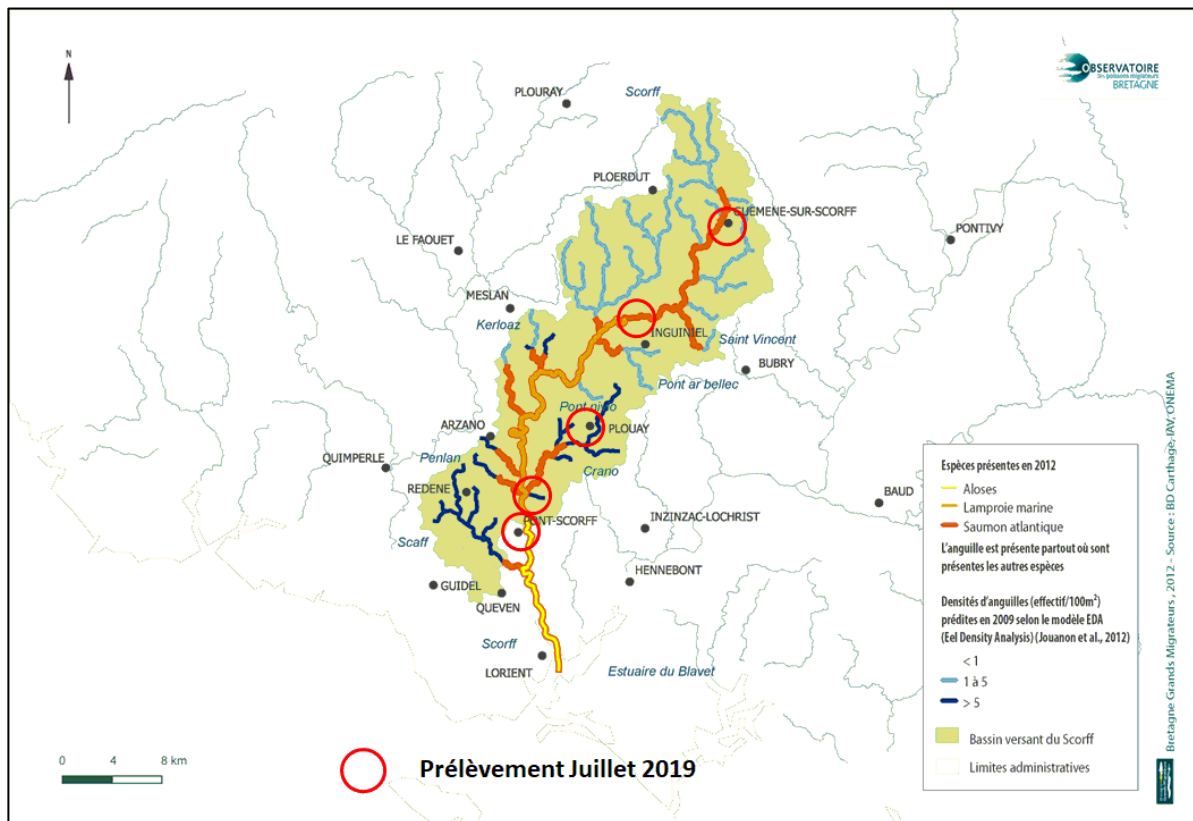


Figure 2 : Sites échantillonnés (eau) sur le bassin versant du Scorff.

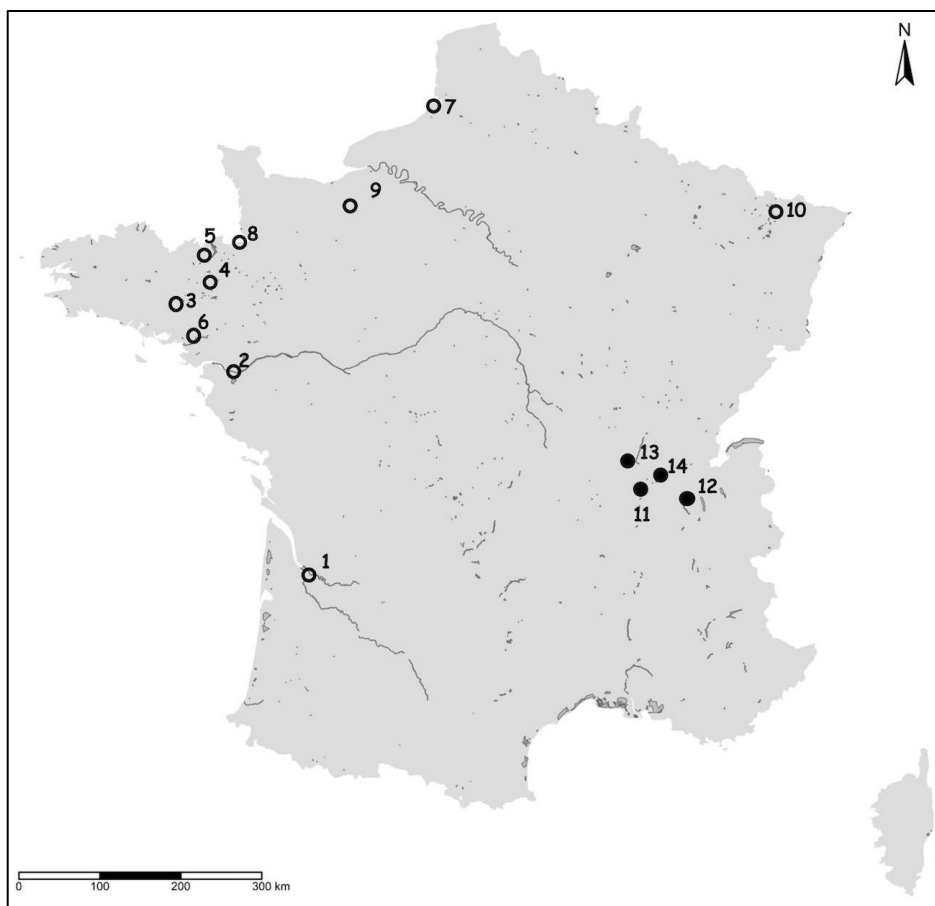


Figure 3 : Sites échantillonnés pour *L. planeri* et *L. fluviatilis* pour la validation du marqueur diagnostique *diagLpf* (=LPLF17) (les ronds noirs indiquent les sites où le marqueur n'est pas diagnostique).

### II.3. Protocole d'échantillonnage de l'ADNe

Pour l'analyse de l'ADN environnemental deux protocoles de filtration d'eau ont été testés.

Le premier protocole est la filtration *in situ*. Pour cette approche nous avons utilisé les capsules de filtration ADNe de la société canadienne Waterra ainsi que les recommandations préconisées par la startup Argaly.

Cette technique consiste à associer une capsule de filtration (Figure 4) avec un système de pompage en amont de la capsule pour limiter les risques de contamination. Ainsi, une extrémité du tuyau est placée en sortie de capsule et l'autre extrémité est reliée à une pompe à membrane. Un deuxième tuyau en sortie de pompe permet d'évacuer l'eau filtrée.

Une fois la filtration terminée, la capsule est vidée puis remplie d'un tampon de préservation de l'ADN. Des bouchons étanches permettent de sceller la capsule. Après agitation, le tampon de conservation sera soit récupéré dans un tube Falcon, soit préservé dans la capsule à température ambiante jusqu'à son envoi au laboratoire.

Pour chaque point d'échantillonnage nous avons utilisé 3 capsules pour atteindre un volume total de 25-30 litres d'eau filtrée.

La filtration *in situ* a été réalisé uniquement sur le bassin versant de la Sélune et 3 points référence en aval de l'Oir.



Figure 4 : Filtration in-situ avec capsule Waterra comme préconisé par ARGALY

Le second protocole testé est la filtration *ex situ*, au laboratoire. Afin d'éviter toute contamination, l'ensemble du matériel utilisé pour les prélèvements et pour leur filtration est passé aux UV pendant 15 minutes avant toute utilisation. Les prélèvements dans le cours d'eau se font dans la colonne d'eau, à faible profondeur et à proximité de la berge. Le volume minimal à prélever est de 3 L (3 flacons de 1 L). Les prélèvements sont ensuite stockés dans une glacière jusqu'au retour au laboratoire, où ils sont placés à 6°C dans une chambre froide.

Les échantillons d'eau ont été filtrés le lendemain de leur prélèvement, en laboratoire, à l'aide d'une pompe à vide et de supports de filtration NALGENE (Figure 5), sur des membranes de cellulose de 47 mm de diamètre et de 0,45 µm de maille (Figure 6) (STRATORIUS : 13006-47-N). Chaque membrane est ensuite placée dans un tube Eppendorf de 2 mL contenant 1,5 mL de CTAB 2% puis stockée à 4°C. Un même support de filtration est utilisé pour les 3 prélèvements d'une même station. Entre chaque filtration, le support de filtre NALGENE et la carafe sont nettoyés à l'eau pour éliminer les particules grossières, puis successivement plongés dans un bac d'eau de Javel et deux bacs d'eau.



Figure 5 : Support de filtration NALGENE



Figure 6 : Membrane filtrante en nitrate cellulose, maille 0,45 µm port de filtration NALGENE.

#### II.4. Développement des marqueurs diagnostiques

Pour distinguer les genres *Lampetra* et *Petromyzon*, nous avons tout d'abord validé l'utilisation du marqueur d'ADN mitochondrial développé par Gustafson et al. (2015). L'amplification de ce marqueur par PCR quantitative (qPCR) fonctionne uniquement chez *P. marinus* mais ne produit aucun signal chez *L. planeri* et *L. fluviatilis* (Figure 9). Ainsi, en présence d'ADN d'une larve ou ammocète indéterminée, on peut savoir s'il s'agit de *P. marinus* ou bien du genre *Lampetra*. Dans le cas d'une non-amplification de ce marqueur, les analyses sont poursuivies avec d'autres marqueurs pour déterminer s'il s'agit de *L. planeri* ou *L. fluviatilis*.

Le développement d'un marqueur diagnostique entre *L. planeri* ou *L. fluviatilis* a fait l'objet d'une publication dédiée (Souissi et al. 2022) et donc ici nous ne décrivons que brièvement les méthodes utilisées. En utilisant les données de RAD-sequencing de Rougemont et al. (2017) et de séquençage du génome de *L. planeri* issu de Morimoto et al. (2020), nous avons identifié 2 marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) dans l'ADN nucléaire, potentiellement diagnostique de *L. planeri* et *L. fluviatilis*. Ces marqueurs ont été nommés LPLF17 et LPLF83.

#### II.5. Analyses de biologie moléculaire

Pour valider l'utilisation des marqueurs diagnostiques, les ADN d'échantillons de tissus des trois espèces ont été utilisés. L'extraction d'ADN a été réalisée avec le kit Macherey-Nagel « NucleoSpin Tissue » puis l'ADN a été amplifié par qPCR selon le protocole décrit dans Souissi et al. (2022).

L'extraction d'ADN à partir des membranes conservées dans le CTAB a été réalisée avec un protocole dérivé de celui de Vallet et al. (2008). Ensuite, l'amplification des marqueurs diagnostiques a été réalisée comme avec les échantillons d'ADN classiques, selon le protocole décrit dans Souissi et al. (2022).

De plus, afin de respecter les principes de la « marche en avant » des échantillons, les étapes de filtration, d'extraction d'ADN et de qPCR ont été réalisées dans des laboratoires séparés.

### III. Résultats et Discussion

#### III.1. Validation des marqueurs diagnostiques

L'analyse des courbes d'amplification d'ADN par PCR quantitative nous a permis de valider le marqueur mitochondrial spécifique à la lamproie marine ainsi qu'un seul des deux marqueurs nucléaires testés. En effet, pour le marqueur mitochondrial nous observons un pic d'amplification qui ne correspond uniquement qu'aux ADNs de lamproie marine. En revanche, pour les 2 marqueurs nucléaires utilisés et bien qu'on arrive à différencier entre le genre *Petromyzon* et le genre *Lampetra*, seul le marqueur LPLF17 nous permet de discriminer *L. fluviatilis* de *L. planeri*. En effet sur le profil d'amplification de ce dernier nous détectons 3 signaux différents : le premier de couleur violette correspond aux individus *L. fluviatilis*, le second de couleur verte est spécifique de l'espèce *L. planeri* et enfin le dernier signal qui est composé de deux pics d'amplifications (violet et vert) permet de distinguer les individus hybrides (Figure 7). Par contre, le marqueur LPLF83 ne permet pas de différencier parfaitement *L. fluviatilis* et *L. planeri* car nous observons toujours une amplification des deux sondes (rouge et bleu) relative aux deux espèces (Figure 7).

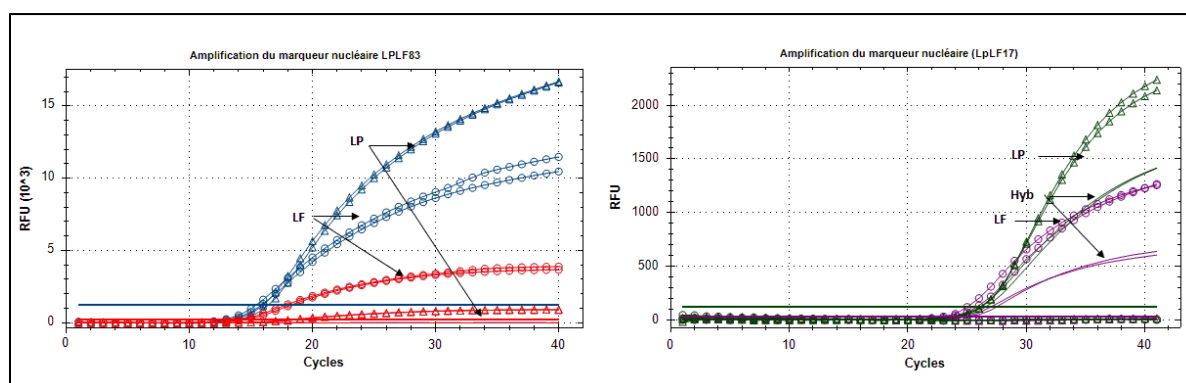


Figure 7 : Courbes d'amplification des ADN pour les marqueur nucléaires LPLF83 (gauche) et LPLF17 (droite).

Les résultats de l'amplification du marqueur LPLF17 sur de l'ADN dilué (extrait à partir de tissu) montre que la limite de détection des différentes espèces par PCR quantitative est de l'ordre de 3 ng/ $\mu$ L, en dessous de cette concentration l'amplification d'ADN est impossible (Figure 8).

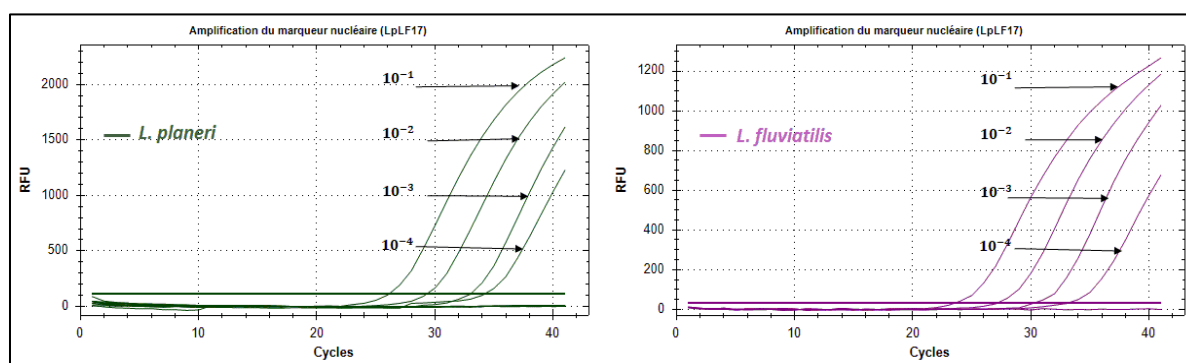


Figure 8 : Courbes d'amplification des dilutions d'ADN pour le marqueur nucléaire LPLF17.

Le génotypage de LPLF17 sur les échantillons de *L. fluviatilis* et *L. planeri* collectés à une large échelle spatiale montre que les résultats sont cohérents avec l'identification morphologique dans la plupart des cas (Tableau 1). Le marqueur LPLF17 permet aussi de détecter des génotypes hybrides dans les zones de contact entre les deux écotypes, notamment en Normandie. Néanmoins, pour les échantillons issus d'ammocètes collectés dans le Rhône, seuls des génotypes (ff) donc normalement diagnostiques de *L. fluviatilis* ont été notés, alors qu'actuellement seul *L. planeri* est présente dans ce secteur. Le marqueur LPLF17 n'est donc pas diagnostique de *L. fluviatilis* et *L. planeri* sur le bassin-versant du Rhône.

**Tableau 1: Région, population, stade (adulte ou ammocète), phénotype (*L. fluviatilis* ou *L. planeri*), nombre d'échantillons (n) et génotype des différents échantillons (p= allèle *L. planeri* et f= allèle *L. fluviatilis*) au marqueur diagLpf (=LPLF17). Le nombre de génotypes et leurs fréquences sont donnés pour chaque population. Chaque population est identifiée par un numéro figurant sur la carte (Figure3).**

Région	Population	Stade	Phénotype	n	pp	pf	ff
<b>Côte Atlantique</b>	Dordogne (1)	Adulte	<i>L. fluviatilis</i>	6	0(0)	0(0)	6(1)
<b>Côte Atlantique</b>	Loire (2)	Adulte	<i>L. fluviatilis</i>	6	0(0)	0(0)	6(1)
<b>Bretagne</b>	Blavet (3)	Ammocète	-	6	6(1)	0(0)	0(0)
<b>Bretagne</b>	Moulin du rocher (4)	Ammocète	-	6	6(1)	0(0)	0(0)
<b>Bretagne</b>	Rance (5)	Ammocète	-	6	6(1)	0(0)	0(0)
<b>Bretagne</b>	Scorff (6)	Ammocète	-	6	6(1)	0(0)	0(0)
<b>Normandie</b>	Bresle (7)	Adulte	<i>L. fluviatilis</i>	6	0(0)	0(0)	6(1)
<b>Normandie</b>	Oir (8)	Ammocète	-	40	7(0.17)	10(0.25)	23(0.58)
		Adulte	<i>L. fluviatilis</i>	54	0(0)	17(0.31)	37(0.69)
			<i>L. planeri</i>	79	55(0.7)	24(0.30)	0(0)
<b>Normandie</b>	Risle (9)	Adulte	<i>L. fluviatilis</i>	6	0(0)	0(0)	6(1)
<b>Rhin</b>	Fischbaechel (10)	Adulte	<i>L. planeri</i>	6	6(1)	0(0)	0(0)
<b>Rhône</b>	Callonne (11)	Ammocète	-	5	0(0)	0(0)	5(1)
<b>Rhône</b>	Furans (12)	Ammocète	-	8	0(0)	0(0)	8(1)
<b>Rhône</b>	Veyle (13)	Ammocète	-	8	0(0)	0(0)	8(1)
<b>Rhône</b>	Devorah (14)	Ammocète	-	6	0(0)	0(0)	6(1)

### III.2. Test des marqueurs diagnostiques sur l'ADN environnemental

Après la validation des marqueurs nucléaire (LPLF17) et mitochondrial (PM) sur des échantillons de tissus des 3 espèces, nous avons testé leur efficacité sur de l'ADNe extrait à partir d'échantillons d'eau. Malheureusement, l'analyse des courbes d'amplification par PCR quantitative nous a permis de détecter la présence de lamproie de Planer uniquement sur un échantillon d'Avril 2015 provenant du site de la Gueuche (Figure 9, panel de gauche). Aucune détection de lamproies n'a pas pu être faite sur les autres sites, bien qu'au moins une espèce de lamproie était présente sur chaque site échantillonné (Figure 9).

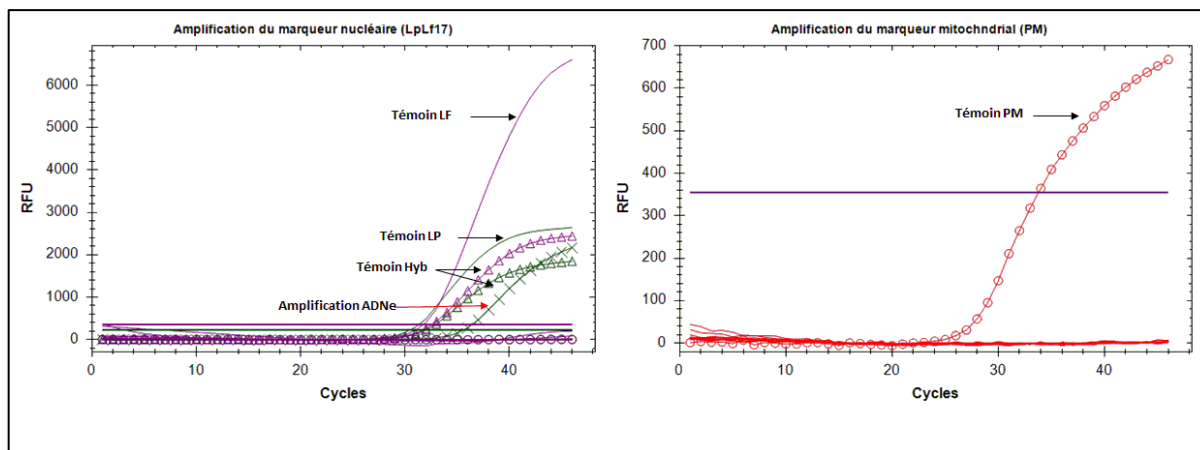


Figure 9 : Courbes d'amplification par PCR quantitative des échantillons d'ADN environnemental.

## IV. Conclusion

Les tests effectués avec le marqueur LPLF17 sur les échantillons de tissus issus de différentes populations en France ont montré une excellente efficacité pour discriminer *L. fluviatilis* et *L. planeri*, y compris les individus hybrides. Néanmoins, pour déterminer le type d'hybride (F1, F2 ou rétrocroisement), des marqueurs supplémentaires seraient nécessaires. De plus, le marqueur LPLF17 n'est pas diagnostique de *L. fluviatilis* et *L. planeri* dans le bassin-versant du Rhône. Nous pensons que la présence d'une lignée très divergente de Lamproie de Planer (voire d'une espèce cryptique) soit la cause de ce polymorphisme particulier. L'évolution de lignées divergentes entre des bassins versants atlantiques et méditerranéens a déjà été documentée (cas de la truite commune) en lien avec l'histoire glaciaire de ces bassins (Bernatchez et al. 1992). La validation de LPLF17 a également été faite dans des populations de *Lampetra* du Royaume-Uni, et le nom générique de **diagLpf** a été donnée à ce marqueur (Souissi et al. 2022). En présence d'un échantillon dont l'espèce est indéterminée, nous préconisons d'abord un génotypage avec le marqueur mitochondrial de Gustafson et al. (2015). En cas d'absence d'amplification à ce marqueur, *P. marinus* est écartée, et le génotypage avec diagLpf permet d'identifier *L. planeri* ou *L. fluviatilis*.

Enfin, nous ne sommes pas parvenus à amplifier diagLpf à partir d'ADN environnemental (sauf dans un échantillon). Ce résultat obtenu malgré l'utilisation de deux méthodes différentes de filtration ainsi que deux méthodes d'extraction d'ADN, peut-être potentiellement expliqué par la faible quantité d'ADN de lamproie présent dans l'eau lors des échantillonnages. De plus, l'utilisation de marqueurs de l'ADN nucléaire est connue pour être beaucoup plus compliquée à développer sur de l'ADNe que celle de marqueurs situés dans l'ADN mitochondrial, ce dernier étant beaucoup plus abondant dans l'environnement. Le développement constant des techniques de détection d'ADNe, telle que la PCR digitale (ddPCR) laisser néanmoins espérer qu'à l'avenir l'utilisation de diagLpf deviendra possible avec de l'ADNe.

## V. Bibliographie

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. *4th ed.*, Garland Science.
- André, G., Guillerme, N., Sauvadet, C., Diouach, O., Chapon, P.-M., and Beaulaton, L. (2018). Synthèse sur la répartition des lamproies et des aloses amphihalines en France (AFB, pôle AFB-Inra Gest'Aqua; Inra U3E, pôle AFB-Inra Gest'Aqua).
- Argaly : <https://www.argaly.com/>
- Bernatchez L, Guyomard R, Bonhomme F (1992) DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1, 161–173.
- Docker, M.F. (2009). A review of the evolution of nonparasitism in lampreys and an update of the paired species concept. In *American Fisheries Society Symposium*, pp. 71–114.
- Docker, M.F., Youson, J.H., Beamish, R.J., and Devlin, R.H. (1999). Phylogeny of the lamprey genus *Lampetra* inferred from mitochondrial cytochrome b and ND3 gene sequences. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 2340–2349.
- Docker, M.F. Ed. (2015). *Lampreys: Biology, Conservation and Control*. Fish & Fisheries Series 37, Volume 1. Springer.
- Gustafson, M.S., Collins, P.C., Finarelli, J.A., Egan, D., Conchúir, R.Ó., Wightman, G.D., King, J.J., Gauthier, D.T., Whelan, K., Carlsson, J.E.L., et al. (2015). An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *J. Fish Biol.* 87, 1254–1262.
- Hume, J.B. (2013). The evolutionary ecology of lampreys (Petromyzontiformes). PhD. University of Glasgow.
- Rougemont Q., Gaigher A., Lasne E., Côte J., Coke M., Besnard A.-L., Launey S., Evanno G. 2015. Low reproductive isolation and highly variable levels of gene flow reveal limited progress towards speciation between European river and brook lampreys. *Journal of Evolutionary Biology*, 28, 2248-2263.
- Rougemont Q., Gagnaire P.-A., Perrier C., Genthon C., Besnard A.-L., Launey S., Evanno G. (2017). Inferring the demographic history underlying parallel genomic divergence among pairs of parasitic and nonparasitic lamprey ecotypes. *Molecular Ecology*, 26 (1), 142-162.
- Morimoto R., O'meara C. P., Holland S. J., Trancoso I., Souissi A., Schorpp M., Vassaux D., Iwanami N., Giorgetti O. B., Evanno G., Boehm T. 2020. Cytidine deaminase 2 is required for VLRB antibody gene assembly in lampreys. *Science Immunology*, 5, eaba0925.
- Rougemont Q., Dolo V., Oger A., Besnard A.-L., Huteau D., Coutellec M.-A., Perrier C., Launey S., Evanno G. (2021). Riverscape genetics in brook lamprey: genetic diversity is less influenced by river fragmentation than by gene flow with the anadromous ecotype. *Heredity*, 126 (2), 235-250,
- Souissi A., Besnard A.L., Evanno G. (2022) A SNP marker to discriminate the European brook lamprey (*Lampetra planeri*), river lamprey (*L. fluviatilis*) and their hybrids. *Molecular Biology Reports*, 49, 10115-10119.
- Taverny, C., and Elie, P. (2008). Les lamproies en France - Guide pratique d'identification et de détermination des écophases, des espèces et des habitats.
- Vallet D., Petit E. J., Gatti S., Levréro F. & Ménard N. (2008). A new 2CTAB/PCI method improves DNA amplification success from faeces of Mediterranean (Barbary macaques) and tropical (lowland gorillas) primates but success rate depends on



species. *Conservation Genetics*, 9: 677-680.

## VI. Glossaire

**Amplicon** : Région d'ADN ciblé pour l'amplification.

**Fst** : Indice de fixation qui permet de mesurer la différenciation des populations à partir du polymorphisme génétique.

**Marqueur diagnostique** : Un marqueur diagnostique est un marqueur génétique qui permet de discriminer deux populations, espèces ou écotypes.

**RADseq** : Séquençage de fragments d'ADN associés à des sites de coupure d'enzyme de restriction.

**SNP**: (Single Nucleotide Polymorphism) polymorphisme relatif à la variation d'une seule base nucléotidique.

## VII. Sigles & Abréviations

**OSPAR** : Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est



**RÉPUBLIQUE  
FRANÇAISE**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*

Avec le soutien financier de



[www.afbiodiversite.fr](http://www.afbiodiversite.fr)



<http://www.inrae.fr/>



<https://www.institut-agro-rennes-angers.fr/>



[www.univ-pau.fr](http://www.univ-pau.fr)