



HAL
open science

Projet Inva-Biomonitoring Développement de méthodes de biomonitoring pour le suivi des espèces invasives en lacs

Marine Vautier, Julien Dublon, Isabelle Domaizon

► **To cite this version:**

Marine Vautier, Julien Dublon, Isabelle Domaizon. Projet Inva-Biomonitoring Développement de méthodes de biomonitoring pour le suivi des espèces invasives en lacs. INRAE - CARRETEL; ECLA. 2024. hal-04888364

HAL Id: hal-04888364

<https://hal.science/hal-04888364v1>

Submitted on 15 Jan 2025

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.



Projet Inva-Biomonitoring

Développement de méthodes de biomonitoring pour le suivi des espèces invasives en lacs

LIVRABLE 4 - RAPPORT TECHNIQUE POUR LA DETECTION
ET LE SUIVI DU GOBIE A TACHE NOIRE

Coordination : Marine Vautier^{*1,3}, Julien Dublon^{*2,3}, Isabelle Domaizon^{*1,3}

*1 INRAE - UMR CARTELE, Thonon-les-Bains, France

*2 INRAE – UMR RECOVER, Aix en Provence, France

*3 Pôle R&D ECLA

SOMMAIRE

I. Propos introductif	4
II. Contexte et objectifs	4
II.1 Le gobie à tache noire : un front de colonisation à surveiller.....	4
II.2 L'ADN environnemental : méthode sensible et non invasive à déployer pour la surveillance des espèces invasives	5
II.2 Objectifs	9
III. Développement d'une méthode ADNe pour la détection du gobie à tache noire en ddPCR ..	10
III.1 Méthode de prélèvement et filtration.....	10
III.2 Extraction d'ADN à partir d'eau et de tissus	10
III.3 Design et test des amorces pour la détection du gobie à tache noire	11
III.4 Protocoles des analyses ddPCR.....	12
III.5 Validations des essais ddPCR	13
IV. Sites d'études.....	15
V. Protocoles d'échantillonnage & données environnementales	17
V.1 Protocoles d'échantillonnage par pêche électrique	17
V.2 Protocoles d'échantillonnage par suivi visuels	17
V.3 Protocoles d'échantillonnage ADNe	18
V.4 Echantillonnages réalisés et données collectées	18
VI. Comparaison des résultats obtenus par les différentes méthodes	21
VI.1 Validation des mesures ADNe	21
VI.2 Comparaison des méthodes pour chacun des plans d'eau	22
VI.3 Comparaison des méthodes pour l'ensemble des plans d'eau	27
VII. Conclusion & perspectives.....	32
VIII. Références bibliographiques.....	35
IX. Annexes	40

I. Propos introductif

Ce rapport technique s'accompagne d'une synthèse bibliographique (livrable 3 du projet Inva-Biomonitoring). Après un bref rappel du contexte et des objectifs de ce travail, ce rapport relate d'une part le développement d'outils ADNe réalisé afin de fournir une méthode non invasive, sensible et quantitative pour la détection du gobie à tache noire dans les milieux lacustres, et, d'autre part, une mise en application de l'outil ADNe développé permettant un test en grandeur réelle sur 4 sites (plan d'eau de Brunet, retenue de St Croix, d'Esparron et Serre-Ponçon) pour lesquels l'outil ADNe est comparé à des méthodes traditionnelles.

II. Contexte et objectifs

II.1 Le gobie à tache noire : un front de colonisation à surveiller

Les espèces invasives constituent l'une des principales menaces qui pèsent sur la biodiversité mondiale (UICN, 2014). Le gobie à tache noire (*Neogobius melanostomus*) est une espèce invasive de poisson classée dans les « Espèces Exotiques Envahissantes » (EEE). Il est originaire des zones littorales de la mer Caspienne, de la mer Noire et de la mer d'Azov, des estuaires et des parties aval de cours d'eau comme le Danube, le Dniestr, le Dniepr, le Don et l'Ura.

En France, il apparaît pour la première fois dans le Rhin à Gamsheim et à Rhinau, ainsi que dans la partie aval de la Moselle en 2011 (Manné et al., 2013). Il a été signalé en 2017 sur le plan d'eau de Brunet par la fédération de pêche des Alpes de Haute-Provence, puis sur le lac de Sainte Croix par la fédération de pêche de pêche du Var (83) en région Provence Alpes Côte d'Azur. Il est susceptible de coloniser l'ensemble de la chaîne des lacs du Verdon (Quinson, Esparron).

Encart 1 - Quelques informations concernant le gobie à tache noire

Le gobie à tache noire est un poisson benthique de petite taille, entre 7 et 12 cm de longueur, bien que certains individus puissent atteindre jusqu'à 20 cm. Il possède deux nageoires dorsales, dont la première est souvent dotée de rayons épineux. La première plus petite arbore une tache noire caractéristique de l'espèce, et la deuxième est plus longue.

Il a une large tolérance des facteurs environnementaux, il vit dans une température d'eau qui va quasiment de 0 à plus de 30 degrés, il tolère la salinité des eaux saumâtres, de faible taux d'oxygène (1,3 mg/L) et de nombreux type de substrats.

Son régime alimentaire varié comprend du zooplancton au stade juvénile puis des invertébrés aquatiques, des mollusques et de petits poissons.

La saison de reproduction est très étendue, et se situe principalement pendant les mois d'été d'avril à septembre lorsque la température de l'eau est la plus élevée (entre 9°C et 26°C) (Charlebois, 1997 ; MacInnis et Corkum, 2000). La reproduction se déroule généralement dans des eaux peu profondes. Il a une capacité de prolifération rapide, avec un temps de génération très court, en lien avec une fécondité et un taux de croissance élevés. Il se multiplie très rapidement, en effectuant un nouveau cycle de

reproduction toute les 3-4 semaines ([Houston, 2014](#)).

Le gobie à tache noire peut entrer en compétition avec des espèces indigènes, et sa prédation sur les œufs, alevins et parfois juvéniles de poissons a été rapportée, avec dans certains cas des effets marqués induisant des modifications des réseaux trophiques dans les écosystèmes concernés ([Kornis et al., 2012](#)). Ces modifications représentent un risque pour la biodiversité aquatique locale, l'équilibre des réseaux trophiques et peuvent donc potentiellement jouer en défaveur de l'atteinte du bon potentiel écologique dans le plans d'eau (DCE, 2000/60/CE).

A ce jour, l'écologie du gobie à tache noire en milieu lacustre français n'est pas connue alors qu'il s'agit d'une espèce invasive qui a déjà engendré de fortes perturbations dans les lacs nord-américains. Aucun suivi n'est mis en œuvre à l'heure actuelle pour surveiller le front de colonisation et l'impact de cette espèce en plan d'eau.

II.2 L'ADN environnemental : méthode sensible et non invasive à déployer pour la surveillance des espèces invasives

L'ADNe pour l'étude de la biodiversité en eau douce

Dans la crise mondiale actuelle de la biodiversité, les habitats d'eau douce ont été classés parmi les écosystèmes les plus vulnérables ([Dudgeon et al., 2006](#) ; WWF, 2020). Il a notamment été démontré que l'augmentation de la température de l'eau et le raccourcissement des hivers peuvent avoir un impact sur la reproduction des poissons, en entraînant par exemple la modification du moment du frai et de la durée d'incubation des œufs (par exemple, [Stewart et al., 2021](#) ; [Lyons et al., 2015](#) ; [Starzynski et Lauer, 2015](#)). Afin d'enrayer le déclin de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes des habitats d'eau douce, divers cadres législatifs, tels que la directive-cadre sur l'eau de l'UE (DCE), ont été mis en place, et exigent de solides méthodes d'évaluation de la biodiversité afin d'assurer l'intégrité biologique des systèmes protégés ([Birk et al., 2012](#) ; [Bohan et al., 2017](#) ; [Leese et al., 2018](#)).

L'utilisation de l'ADN environnemental (ou ADNe) a révolutionné la façon dont nous assurons le suivi de la biodiversité, et en particulier dans les systèmes aquatiques ([Deiner et al., 2017](#) ; [Cristescu & Hebert, 2018](#) ; [Pawlowski et al., 2018](#) ; [Ruppert et al., 2019](#) ; [Beng & Corlett, 2020](#)). L'ADNe est défini comme l'ADN extrait à partir d'un échantillon environnemental sans isoler au préalable aucun organisme cible ([Taberlet et al., 2012](#)). L'échantillon peut être de l'eau, du biofilm, du sol, des sédiments, de l'air, des fèces ou des contenus intestinaux ou même des sources anciennes comme des carottes de glace, de sédiments ou de pergélisol ([Taberlet et al., 2012](#) ; [Thomsen & Willerslev, 2015](#)). En ce qui concerne les macroorganismes, cet ADN provient de la libération de matériel génétique dans l'environnement, par exemple par la desquamation des cellules de la peau, de poils ou d'écaillés, l'excrétion de fluides corporels, la défécation ou encore la libération de gamètes ([Pawlowski et al., 2020](#)) (Figure 1).

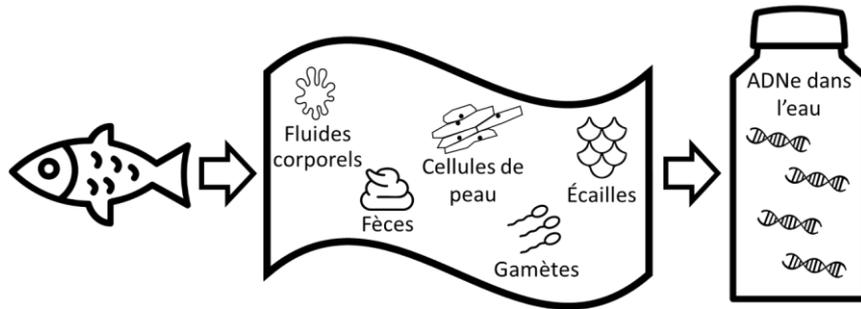


Figure 1 : Schéma représentant les sources d'ADNe libéré par les poissons dans l'environnement (eau).

En eau douce, les avantages majeurs des méthodes basées sur l'ADNe pour le biomonitoring sont, (1) leur caractère non invasif, qui n'entraîne que peu ou pas de perturbations pour les espèces et les systèmes et notamment lorsqu'elles ciblent les macroorganismes, (2) l'efficacité en termes de temps et de coûts, qui permet de surveiller la biodiversité sur de grandes échelles spatiales et temporelles, (3) la grande sensibilité de détection, qui permet de détecter de manière fiable les espèces rares ou furtives ou les premiers stades des invasions biologiques et (4) l'universalité de l'échantillonnage, qui permet d'évaluer la biodiversité sur une large gamme taxonomique à l'aide du même échantillon d'ADNe (Goldberg et al., 2016 ; Deiner et al., 2017 ; Shaw et al., 2017 ; Pawlowski et al., 2018 ; Beng & Corlett, 2020).

La dynamique de la production, de la distribution spatio-temporelle, de la persistance et de la dégradation de l'ADNe dans le milieu est un sujet sur lequel les recherches se sont concentrées ces dernières années (Turner et al., 2015 ; Eichmiller et al., 2016 ; Tsuji et al., 2017 ; Allan et al., 2020 ; Wood et al., 2020). Cette dynamique est d'une importance décisive pour estimer la robustesse, la sensibilité ainsi que la pertinence des conclusions tirées de toute étude d'ADNe. Par exemple, en fonction de divers facteurs environnementaux, tels que la température, le pH, le rayonnement UV ou la disponibilité de l'oxygène, l'ADNe dans les systèmes aquatiques peut se dégrader en quelques jours jusqu'à devenir indétectable (Barnes et al., 2014 ; Barnes & Turner, 2016 ; Seymour et al., 2018) ou persister jusqu'à des centaines voire des milliers d'années dans un état analysable dans les sédiments des systèmes d'eau douce (par exemple, Giguet-Covex et al., 2019). De même, l'ADNe dans les systèmes lotiques peut être transporté en aval sur quelques centaines de mètres seulement (Jane et al., 2015 ; Wilcox et al., 2016) ou jusqu'à des dizaines de kilomètres (Deiner & Altermatt, 2014 ; Pont et al., 2018). Les facteurs environnementaux à l'origine de cette dynamique sont très variables d'un système à l'autre et nécessitent des évaluations spécifiques de l'habitat (Harper et al., 2019 ; Sales et al., 2021).

Des facteurs biotiques sont également en jeu pour expliquer notamment le taux d'émission de l'ADNe dans l'environnement ; l'émission peut en effet être influencée par l'âge des organismes chez les poissons (Maruyama et al., 2014), leur activité et métabolisme (de Souza et al., 2016 ; Stewart 2019). Ces niveaux d'activité ainsi que l'utilisation de l'espace par les espèces ne sont pas indépendants des facteurs abiotiques (ex. température). La phénologie, les déplacements pour l'utilisation des habitats peuvent varier au cours de l'année (zone refuge pour les juvéniles, lieux de nutrition...) et ainsi induire

une répartition variable de l'ADNe dans le milieu d'étude (Ghosal et al., 2018). Les périodes de reproduction en particulier sont a priori des périodes de fort relargage d'ADNe (Di Muri et al. 2022; Tsuji et Shibata 2020).

Les étapes de l'analyse ADNe à partir d'échantillons d'eau

Dans le cas d'échantillons d'eau, l'ADNe qui est disséminé dans l'eau est concentré par filtration, centrifugation ou précipitation, puis cet ADN est purifié par une étape d'extraction de l'ADN (Shaw et al., 2017 ; Ruppert et al., 2019). L'étape suivante cible spécifiquement l'ADN du taxon, du groupe ou de l'espèce d'intérêt. Le niveau taxonomique peut aller de l'espèce individuelle à des domaines entiers, voire à la "biodiversité totale" (Compson et al., 2020) et dicte également la méthode utilisée pour la détection de l'ADN ciblé dans un échantillon d'ADNe, le « barcoding » ou le « metabarcoding ».

Approche « metabarcoding »

Le metabarcoding est la méthode la plus couramment appliquée pour caractériser la composition en espèces de communautés biologiques diversifiées (espèces multiples, groupes d'espèces). Dans ce cas, des amorces dites généralistes ou universelles sont utilisées pour amplifier un marqueur cible du groupe à partir de l'extrait d'ADNe. Le marqueur génétique ainsi amplifié est ensuite soumis à une étape de séquençage à haut débit (HTS) qui permet de séquencer en parallèle un grand nombre d'échantillons. Les séquences obtenues sont ensuite comparées à des séquences disponibles dans les bases de référence afin d'identifier la composition en espèces de chaque échantillon séquencé (Taberlet et al., 2012 ; Shaw et al., 2017 ; Ruppert et al., 2019).

Approche « barcoding » & quantification d'espèces ciblées

Cette approche vise à détecter l'ADN d'espèces spécifiques/ciblées. Si la méthode de barcoding peut elle aussi être associée au séquençage pour caractériser l'identité génétique d'une espèce. Cette approche est également largement appliquée pour quantifier la cible d'intérêt. Il peut s'agir dans ce cas d'utiliser l'amplification en chaîne par polymérase en temps réel ou quantitative (qPCR). Pour cela, des amorces spécifiques à l'espèce, qui peuvent être marquées par fluorescence ou associées à des sondes d'hydrolyse, sont utilisées pendant l'amplification par PCR. La présence de l'ADN cible dans l'extrait d'ADNe est déduite par une augmentation du signal de fluorescence pendant la PCR (Logan et al., 2009 ; Doi, Takahara et al., 2015). Au cours des dernières années, la PCR digitale (dPCR), et plus particulièrement la PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) sont apparues comme des méthodes alternatives à la qPCR pour la détection de signaux ADN rares. La ddPCR génère des milliers de gouttelettes de l'ordre du nanolitre pendant la PCR, chacune d'entre elles contenant idéalement une ou aucune copie de l'ADN cible. La PCR est effectuée dans chaque gouttelette en parallèle à l'aide de sondes marquées par fluorescence et la présence de la cible est déduite par une mesure finale du signal de fluorescence dans toutes les gouttelettes en parallèle (Hindson et al., 2011 ; Doi et al., 2015) (Figure 2). La ddPCR a l'avantage d'être quantitative (Nathan et al., 2014) et plus efficace que la qPCR pour détecter les organismes aquatiques rares, y compris les poissons (Wood et al., 2019 ; Brys et al., 2020 ; Doi, Uchii, et al., 2015). En outre, par rapport à la qPCR, la dPCR est plus répétable et reproductible (Pinheiro et al, 2012), plus précise (Sanders et al., 2011), plus rapide, moins coûteuse

(Nathan et al., 2014), et plus tolérante à la présence d'inhibiteurs (Doi, Takahara, et al., 2015 ; Hoshino et Inagaki, 2012).

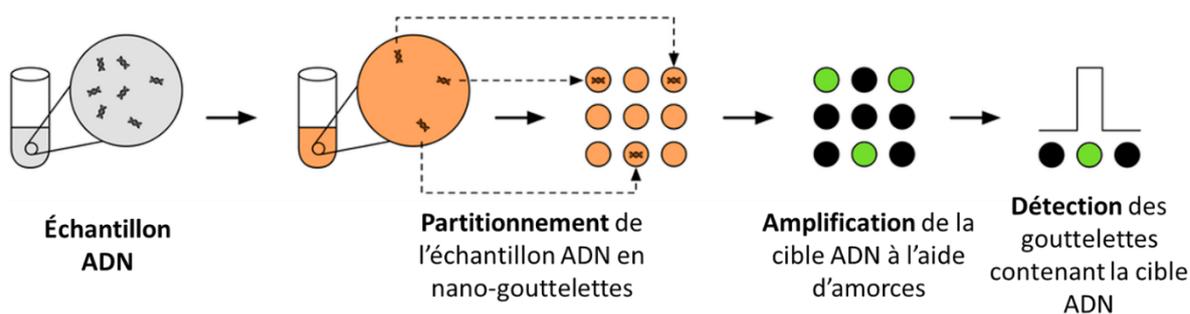


Figure 2 : Schéma représentant les principales étapes d'analyses ADN à l'aide de la technologie de PCR digitale en gouttelettes (ddPCR).

Les génomes et gènes ciblés pour l'étude des populations de poissons

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est généralement ciblé lors des analyses ADN car les cellules somatiques possèdent de nombreuses mitochondries, et donc de nombreuses copies du génome mitochondrial par cellule. Le génome nucléaire quant à lui, n'est présent qu'en une seule copie par cellule (Figure 3). En ciblant l'ADNmt on a donc un signal qui sera a priori plus fort que celui provenant de l'ADN nucléaire (ADNnu).

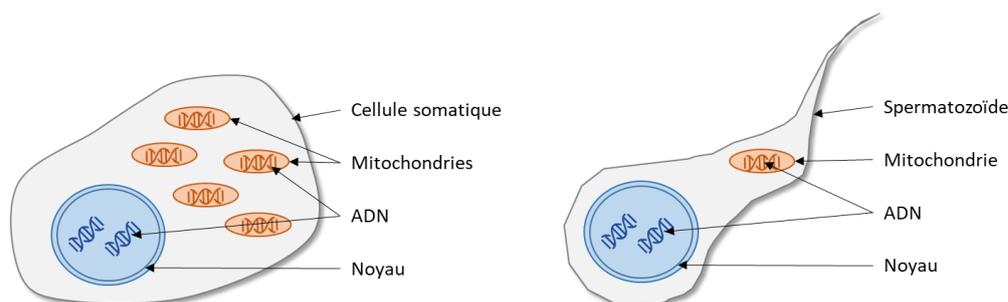


Figure 3 : Schéma représentant les différences de composition en ADN nucléaire et mitochondrial entre les cellules somatiques et les spermatozoïdes.

Les gènes marqueurs couramment utilisés pour les études ADN ciblant les poissons sont donc des gènes mitochondriaux, comme la sous-unité I de la cytochrome c-oxydase (COI) (Bakker et al., 2017, Leray et al., 2013 ; Simpfendorfer et al., 2016 ; Stoeckle et al., 2017), le cytochrome b (Hanfling et al., 2016 ; Jo et al., 2019 ; Lacoursière-Roussel et al., 2016 ; Murakami et al., 2019). Les ARN ribosomiques (ARNr), l'ARNr 16S et l'ARNr 18S, ont été utilisés dans quelques études (Bessey, Jarman et al., 2020 ; Stat et al., 2019), mais ces dernières années l'ARNr 12S est de plus en plus utilisé dans les études ADN ciblant les poissons (Andruszkiewicz et al., 2017 ; Kelly et al., 2014 ; Lafferty et al., 2020 ; Miya et al., 2015 ; Stoeckle et al., 2017, 2020 ; Thomsen et al., 2016 ; Yamamoto et al., 2017). Les amorces basées sur l'ARNr 12S offrent cependant une résolution taxonomique similaire à celle des amorces basées sur le gène COI (Bylemans et al., 2018).

Que ce soit pour le « metabarcoding » ou le « barcoding », l'existence de bases de données riches en séquences d'intérêt est indispensable pour l'assignation taxonomique des séquences identifiées par séquençage ou pour la création d'amorces spécifiques. Malgré la richesse des données de séquences

disponibles, les bases de données axées sur les organismes aquatiques sont moins complètes que pour les organismes terrestres, les organismes aquatiques sont souvent sous-représentés ou absents des bases de données de référence (Iwasaki et al., 2013 ; Wangensteen & Turon, 2017). Parmi les bases de données intégrant des séquences ciblant les poissons, on peut mentionner le Barcode of Life Data System (BOLD), qui contient principalement des séquences COI provenant des règnes animal, végétal, fongique et protiste (Ratnasingham & Hebert, 2007). Le « National Center for Biotechnology Information » (NCBI) maintient des bases de données de séquences nucléotidiques générales comme GenBank et la base de données RefSeq, ainsi que des bases spécialisées comme les ressources génomiques des organelles et les bases de données BLAST de l'ARN ribosomal (Sayers et al., 2019). Actuellement il existe une seule ressource publique spécifique aux poissons : la base de données MitoFish qui regroupe les génomes mitochondriaux complets de plus de 3000 espèces et partiels de plus de 40 000 espèces (Iwasaki et al., 2013 ; Sato et al., 2018, www.mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp, 2023). Les gènes mitochondriaux étant majoritairement ciblés dans les études ADNe, les bases de données disponibles contiennent principalement des séquences mitochondriales, et il est difficile de trouver des séquences nucléaires pour les poissons. Les quelques études qui se sont intéressées à l'ADNe nucléaire chez les poissons ont ciblées le gène « Internal Transcribed Spacer 1 » (ITS1), gène ribosomique nucléaire possédant un taux de mutation élevé et permettant donc une bonne différenciation entre les espèces (Bylemans et al., 2017 ; Wu et al., 2023)

Les applications des outils ADNe pour la détection des espèces invasives

Comme mentionné précédemment l'utilisation de l'échantillonnage d'ADNe permet de révéler la présence d'espèces non indigènes potentiellement envahissantes, et ceci même lorsque seulement un ou quelques individus sont présents dans le milieu environnant. L'application d'approches ADNe peut être particulièrement utile pour la détection initiale de l'invasion, l'identification et la délimitation des voies de circulation des espèces non indigènes, le suivi de leur propagation à large échelle ou bien sur la surveillance de leurs effets sur les espèces autochtones.

II.2 Objectifs

L'objectif de cette étude est de tester différentes méthodes d'échantillonnage et de détection du gobie à tache noire, avec en particulier le développement d'une méthode ADNe non-invasive qui a été comparée à des méthodes plus traditionnelles comme les comptages visuels (également non invasifs) et la pêche électrique. Il s'agit pour le volet ADNe à la fois de valider des méthodes d'échantillonnage déjà existantes, de développer de nouvelles amorces permettant de cibler de manière très spécifique l'espèce d'intérêt (ici le gobie à tache noire), de tester en situation réelle cette méthode et de la comparer aux informations acquises par les 2 autres approches mentionnées ci avant.

Ces différentes méthodes permettent d'une part de réaliser un premier état des lieux de la répartition spatiale de cette espèce dans le complexe des lacs du Verdon en 2023, et par ailleurs posent les bases pour définir une stratégie de surveillance qui serait déployable plus largement dans les lacs.

III. Développement d'une méthode ADNe pour la détection du gobie à tache noire en ddPCR

Les choix ou développements effectués pour chacune des principales étapes de l'analyse ADNe sont présentés ici.

III.1 Méthode de prélèvement et filtration

Le problème de la contamination par de l'ADNe exogène est un point sensible des approches ADNe. Tous les échantillons d'eau ont été stockés dans des bouteilles décontaminées (lavées avec du H₂O₂ 10% et rincées 3 fois avec de l'eau ultrapure) immédiatement placées dans des glacières et filtrées sur le terrain à l'aide d'unités de filtration Sterivex TM MILLIPORE (porosité de 0,45 µm). Pour chaque filtre, entre 1,1 L et 2 L d'eau ont été filtrés. Après filtration, les Sterivex ont été remplis de tampon de conservation (EDTA 40 mM, Tris-HCl (pH 8) 50 mM et saccharose 0,75 M) et stockés à 4°C, puis -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Pour tous les échantillons, l'échantillonnage et la filtration ont été effectués selon le protocole détaillé de [Vautier et al. \(2021\)](https://www.protocols.io/view/fish-edna-water-sampling-and-filtration-through-st-br5rm856), accessible sur <https://www.protocols.io/view/fish-edna-water-sampling-and-filtration-through-st-br5rm856>.

Pour les échantillons témoins, des bouteilles décontaminées et remplies d'eau sans ADN ont été ouvertes sur le terrain pendant l'échantillonnage, puis fermées et placées dans une glacière avec les autres échantillons. Les échantillons témoins ont ensuite été traités de la même manière que les autres échantillons d'eau (c'est-à-dire filtration et extraction de l'ADN). Des échantillons témoins ont été réalisés à intervalles réguliers au cours des différentes campagnes d'échantillonnage, avec un total de 5 échantillons témoins.

III.2 Extraction d'ADN à partir d'eau et de tissus

Pour tous les échantillons, l'extraction d'ADN a été réalisée dans un laboratoire dédié aux analyses d'ADNe rare (UMR Carrtel Thonon). Les extractions ont été réalisées selon le protocole de [Vautier et al. \(2020\)](https://www.protocols.io/view/fish-edna-dna-extraction-from-water-samples-filter-bfk8jkzw), accessible sur <https://www.protocols.io/view/fish-edna-dna-extraction-from-water-samples-filter-bfk8jkzw>. Ce protocole utilise le kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL) avec des modifications spécifiques adaptées aux cartouches Sterivex et à la préservation avec du tampon. L'ADN a été élué dans 30 µL de tampon SE préchauffé à 55°C, quantifié au Nanodrop (Thermo Scientific) et conservé à -20°C.

Pour tester la spécificité des amorces, l'ADN de 23 espèces de poissons capturées dans le Lac de sainte Croix, la retenue de Serre-Ponçon, dans la Durance et le canal de Fumemorte (Blageon, Blennie fluviatile, Brème bordelière, brochet, Carpe commune, Chabot commun, Chevesne, Gambusie, Goujon, Hotu, Loche Franche, Perche commune, Perche-soleil, Poisson-chat, Sandre, Silure glane, Spirilin, Toxostome, Truite fario, Apron du Rhone, brème commune, Gobie à tache noire et Vairon) a été extrait des tissus avec NucleoSpin® DNA RapidLyse (MACHEREY-NAGEL). L'ADN a été quantifié par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop™, et stocké à -20°C ; ces extraits d'ADN ont été utilisés

comme témoins pour tester la spécificité des jeux d'amorces développés dans cette étude.

III.3 Design et test des amorces pour la détection du gobie à tache noire

La spécificité des amorces et sondes ciblant le gène mitochondrial COI a été testée *in silico* en déterminant le nombre de nucléotides différents entre les séquences des amorces et sonde ciblant l'espèce d'intérêt et les séquences de 28 autres espèces de poissons vivant dans les lacs étudiés. Leur spécificité a ensuite été testée *in vitro* à l'aide d'analyses qPCR, sur de l'ADN extrait de différents tissus de poissons (23 espèces sur les 28).

Il n'existait pas d'amorces ciblant le Gobie à tache noire compatibles avec la ddPCR dans la littérature et de nouvelles amorces ont donc été créées en ciblant le gène mitochondrial COI.

Pour concevoir les nouvelles amorces ciblant le génome mitochondrial, les séquences du gène COI ont été collectées à partir de Barcode of Life Database (BOLD) (<http://www.boldsystems.org/>) pour les 28 espèces de poissons identifiées dans les lacs étudiés. Toutes les séquences disponibles ont été conservées, quelle que soit leur origine géographique, afin de tenir compte des variations génétiques intraspécifiques potentielles. Les séquences d'amorces-sondes PCR ont été conçues à l'aide du logiciel Primers3 (Untergasser et al., 2012). Les paramètres suivants ont été appliqués pour concevoir les paires d'amorces : taille minimale et maximale du produit PCR de 60 à 160 respectivement, température de fusion minimale et maximale des amorces de 50 à 65°C avec une différence de température maximale de 3°C entre les amorces "Forward" et "Reverse". De même, les paramètres de sonde correspondants comprenaient une taille minimale et maximale de 18 et 27 nucléotides respectivement, une température de fusion d'amorce minimale et maximale de 60 et 67°C et un contenu GC entre 30 % et 80 %.

Pour l'ensemble des amorces et sondes générées, la spécificité a été déterminée en utilisant les séquences du gène COI de l'ensemble des 23 autres espèces de poissons sélectionnées précédemment. Toutes les séquences ont été alignées à l'aide d'un logiciel d'alignement de séquences multiples, MEGA7 (Kumar, Stecher et Tamura, 2016). Pour chacun des ensembles d'amorces et sonde, seuls ceux ne présentant pas de correspondance parfaite avec l'une des séquences des 23 autres espèces de poissons ont été sélectionnés. En raison du degré élevé d'homologie entre certaines espèces de poissons, les séquences COI de l'ensemble des 23 espèces de poissons ont été alignées sur les séquences d'amorces et de sondes sélectionnées pour l'espèce d'intérêt, et le nombre de paires de bases non concordantes a été additionné pour sélectionner uniquement les ensembles d'amorces présentant le plus grand nombre de non concordances. La structure secondaire de l'amplicon sélectionné a ensuite été vérifiée à l'aide du programme Mfold (Zuker, 2003), et enfin, des PCR *in silico* ont été réalisées à l'aide de l'outil Primer-BLAST de NCBI (O'Leary et al., 2015) pour vérifier que les jeux d'amorces et sonde ne ciblent que le génome de l'espèce d'intérêt.

Pour déterminer la sensibilité relative des tests ddPCR, nous avons réalisé une expérience de dilution en série avec des témoins positifs (ADN extrait de tissus) afin de déterminer la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ). La dilution en série a été réalisée avec un échantillon d'ADN

cellulaire total concentré à $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, qui a d'abord été dilué au 1:100 pour obtenir un point de départ pour une série de cinq étapes de dilutions par cinq (1/100, 1/500, 1/2500, 1/12 500, 1/62 500 et 1/312 500), et donc six quantités d'ADN différentes (10, 2, 0,4, 0,08, 0,016 et 0,0032 pg) selon les recommandations de [Brys et al. \(2020\)](#). Les séries comprenaient 5 réplicats de chaque dilution et 5 contrôles négatifs (eau sans ADN au lieu d'ADN de poisson). La dilution de départ de ces séries (1/100 ou 50 pg), mesurée par ddPCR, était de $89,1 \text{ copies.}\mu\text{L}^{-1}$ (S.D. = 4,2) pour *C. lavaretus* et de $74,5 \text{ copies.}\mu\text{L}^{-1}$ (S.D. = 2,0) pour *P. fluviatilis*. Le LOD est défini comme la concentration la plus faible du nombre de copies PCR qui peut être distinguée de manière fiable des contrôles négatifs ([Kiselinova et al., 2014](#) ; recommandation du fournisseur Biorad), et comme aucune amplification n'a été obtenue à partir d'aucun contrôle négatif, le LOD a été déterminé comme la concentration la plus faible à laquelle au moins une détection positive a été mesurée parmi les 5 réplicats. La LOQ est définie comme la concentration la plus faible en nombre de copies PCR pour laquelle la méthode fournit des résultats avec une incertitude acceptable. Nous avons choisi une incertitude de 30 % pour un résultat de mesure obtenu comme une moyenne des cinq mesures répétées, en suivant les recommandations de [Deprez et al, 2016](#).

III.4 Protocoles des analyses ddPCR

Pour cibler le génome mitochondrial du gobie à tache noire les amorces développées dans cette étude ont été utilisées. La perche commune a été choisie comme espèce témoin, car elle est présente abondamment dans les plans d'eau étudiés. Pour cibler cette espèce témoin, les amorces développées par [Vautier et al. \(2023\)](#) ont été utilisées. Les marqueurs fluorescents choisis pour les sondes d'hydrolyse sont soit le FAM (~517nm) pour le Gobie à tache noire et le HEX pour la perche commune (~556nm).

La ddPCR a été exécutée dans des réactions multiplex avec deux jeux amorce-sonde multiplexés ensemble (génome mitochondrial de l'espèce ciblée et génome mitochondrial de l'espèce 'contrôle').

Les contrôles négatifs étaient constitués d'eau exempte d'ADN, tandis que de contrôles positifs constitués d'ADN extrait de matériel tissulaire de chacune des espèces cibles.

Les ddPCR ont été réalisées à l'aide du système ddPCR Bio-Rad QX600 (Bio-Rad, Temse, Belgique) dans un volume total de $20 \mu\text{L}$. Chaque réaction contenait 1x Bio-Rad ddPCR supermix pour sondes (sans dUTP), 900 nM de chaque amorce, 250 nM de sonde, entre 2 et $4 \mu\text{L}$ d'ADN matrice selon la concentration en ADN des échantillons, de 5 U à 10 U d'enzyme de restriction AfIII selon la concentration d'ADN, complétée par de l'eau de diéthylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich, Overijse, Belgique). Vingt microlitres du mélange PCR ont été pipetés dans les compartiments dédiés aux échantillons des cartouches Droplet Generator DG8 (Bio-Rad, n° de cat. 1864008), et $70 \mu\text{L}$ d'huile de génération de gouttelettes pour sondes (Droplet Generation Oil for Probes) (Bio-Rad, n° de cat. 186-4005) ont été ajoutés dans les puits appropriés. Les cartouches ont été recouvertes de joints DG8 (Bio-Rad, n° de cat. 1863009) et placées dans un générateur de gouttelettes QX600 (Bio-Rad). Les gouttelettes ainsi générées ($40\mu\text{L}$) ont ensuite été soigneusement transférées dans une plaque à 96 puits ddPCR (Bio-

Rad, n° de cat. 12001925) scellée avec une feuille d'aluminium perçable (Bio-Rad, n° de cat. 181-4040). Les plaques ddPCR 96 puits ont été introduites dans un thermocycleur TProfessional Basic de Biometra Ltd. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 10 minutes à 95 °C, suivies de 40 cycles de dénaturation pendant 30 s à 94 °C et d'extension à 60 °C pendant 1 min, avec une vitesse de rampe de 2 °C s⁻¹, suivis de 10 min à 98 °C et d'un maintien à 4 °C.

Les gouttelettes ont ensuite été lues sur un lecteur de gouttelettes QX600 (Bio-Rad). La fluorescence de toutes les gouttelettes a été vérifiée à l'aide du logiciel QuantaSoft de Bio-Rad, version 1.7.4.0917. Le seuil d'amplitude de fluorescence, qui permet de distinguer les gouttelettes positives des négatives, a été fixé manuellement par l'analyste comme étant le point médian entre l'amplitude de fluorescence moyenne du groupe de gouttelettes positives et négatives. Le même seuil a été appliqué à tous les puits d'une plaque PCR donnée. Le nombre moyen de gouttelettes acceptées était d'environ 17 000.

Pour estimer les concentrations d'ADNe, exprimées en nombre de copies par litre d'eau filtrée, le calcul a été effectué selon la formule suivante, avec un volume de gouttelettes (Vd) fixé à 0,834 nL ([Corbisier et al., 2015](#)).

$$C_x = \left(\frac{V_e}{V_w \times V_s} \right) \times V_{dd} \times \left(\frac{1}{A \times V_d} \right) \times \frac{\left[\log \left(1 - \frac{P}{A} \right) \right]}{\left[\log \left(1 - \frac{1}{A} \right) \right]}$$

Où CX est le nombre de copies d'ADNe cible par litre d'eau, Ve est le volume d'éluion de l'extraction, Vs est le volume d'extrait d'ADN utilisé dans la réaction ddPCR, Vw est le volume d'eau filtrée, Vdd est le volume de réaction ddPCR (20 µL), A est le nombre de gouttelettes acceptées, Vd est le volume des gouttelettes et P est le nombre de gouttelettes positives ([Vautier et al., 2023](#)).

III.5 Validations des essais ddPCR

Des tests de spécificité et de sensibilité ont été réalisés sur les amorces développées dans cette étude pour cibler le gène COI du gobie à tache noire, selon les recommandations de [Vautier et al. \(2023\)](#).

- Résultats des tests de spécificité

Pour les tests in silico, le jeu d'amorces et de sonde développés pour cibler le gobe à tache noire a montré des différences avec toutes les séquences des autres espèces de poissons avec lesquelles il a été comparé. Pour les amorces testées, un minimum de 8 nucléotides et un maximum de 26 nucléotides de différence a été constaté entre les amorces développées dans cette étude et les séquences COI des 33 autres espèces trouvées dans les bases de données.

Concernant les tests in vitro, ils ont montré une spécificité pour l'espèce ciblée, le gobe à tache noire, et donc une amplification uniquement de l'ADN de l'espèce ciblée et pas des 28 autres testées (Tableau 1).

Ces différents tests permettent de s'assurer que les amorces développées dans cette étude n'amplifient que le gène COI de l'espèce ciblée, et donc uniquement le gobe à tache noire et aucune autre espèce présente dans les milieux étudiés.

Provenance des ADN	Amorces	Résultat ddPCR
Gobie à Taches Noires	GTN	+
Apron du Rhône, Ablette, Anguille européenne, Barbeau fluviatile	GTN	-
Blageon, Blennie fluviatile, Brème bordelière, Brochet	GTN	-
Carpe commune, Chabot, Chevesne, Gambusie	GTN	-
Gardon, Goujon, Hotu, Loche franche	GTN	-
Perche, Perche-soleil, Poisson-chat, Rotengle	GTN	-
Sandre, Silure, Spirilin, Tanche	GTN	-
Toxostome, Truite Fario, Vairon	GTN	-

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des tests de spécificité réalisés sur les amorces ciblant le génome mitochondrial du gobie à tache noire (GOBIE À TACHE NOIRE). L'ADN extrait à partir de tissus de poisson a été utilisé pour tester la spécificité des amorces développées en ddPCR. L'ADN d'une ou plusieurs espèces a été utilisé pour tester la spécificité des amorces. + indique une amplification en ddPCR et – une absence d'amplification.

- Résultats des tests de sensibilité

Des tests de sensibilité ont été réalisés selon les recommandations du MIQE (« Minimum Information for Publication of Digital PCR Experiments ») (Huggett et al., 2013), afin de permettre une comparaison robuste des mesures obtenues en dPCR.

Ces tests sont basés sur des séries de dilutions et montrent que la diminution des concentrations mesurées suit une relation linéaire presque parfaite, avec un coefficient de corrélation $r = 0,999$ (valeur $p < 0,001$). Le niveau de dilution le plus élevé (1/312 500), avec une quantité d'ADN de poisson de 0,0032 pg, n'a donné lieu à aucune amplification pour aucun des cinq réplicats. La LOD (c'est-à-dire la plus faible concentration en nombre de copies PCR à laquelle au moins une détection positive est mesurée parmi les 5 réplicats) est de 0,09 copies μl^{-1} (1,80 copies par réaction ddPCR). La LOQ (c'est-à-dire la plus faible concentration en nombre de copies PCR pour laquelle la méthode fournit des résultats avec 30 % d'incertitude) était de 0,45 copies μl^{-1} (9,00 copies par réaction ddPCR) et a été obtenue pour une dilution au 1/12 500, soit une d'ADN de gobie à tâche noire de 0,08 pg (Figure 4).

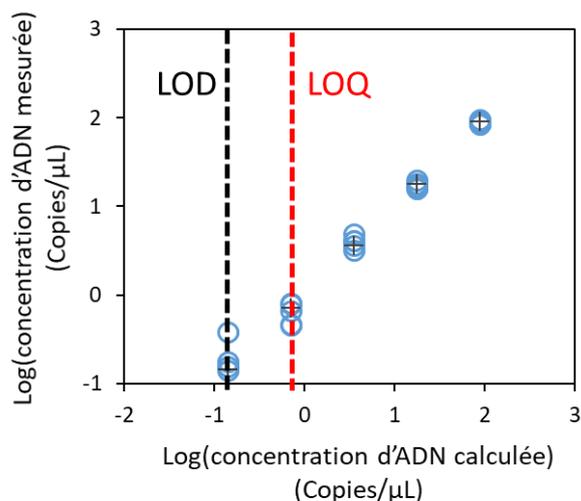


Figure 4 : Sensibilité, limite de détection (LOD), quantification (LOQ) et du jeux d'amorces développé pour cibler le gène COI du gobie à tache noire. La sensibilité et les limites de détection et de quantification des jeux d'amorces ont été évaluées en utilisant six quantités d'ADN (10, 0,4, 0,08, 0,016 et 0,0032 pg) obtenues à partir de cinq dilutions successives de la quantité d'ADN la plus élevée (10 pg) avec 5 réplicats chacun. Croix grise = estimation théorique du nombre de copies du gène cible par puits de ddPCR, basée sur le nombre de copies du gène obtenu à partir de la plus grande quantité d'ADN.

IV. Sites d'études

- Retenue de St Croix, de Quinson et d'Esparron

Les retenues de Sainte Croix, de Quinson et d'Esparron se trouvent en enfilade sur le cours de la rivière Verdon dans le sud-est de la France à cheval sur deux départements le Var et les Alpes de Hautes Provence. Ces plans d'eau ont comme usages la production d'électricité, des activités récréatives (navigation, baignade, pêche etc), l'utilisation comme réservoirs d'eau potable et d'irrigation. La gestion hydrologique est dirigée par la société Electricité de France (EDF).

La présence du gobie à tache noire est avérée dans le plan d'eau de Sainte croix depuis 2017 mais pas dans les retenues de Quinson et d'Esparron.

Quinson a été entièrement vidangée en 2018 et le gobie à tache noire n'a pas été observé à cette occasion.

Nom	Code lac	Superficie (ha)	Profondeur max (m)	Marnage moyen (m)	Altitude (m)	Temps de séjour (jours)
LAC D'ESPARRON	ESP04	316	54	1.5	359	35
RETENUE DE QUINSON	QUI04	156	50	5	404	9
LAC DE SAINTE-CROIX	SCR04	2124	83	16	477	365

Le Lac d'Esparron et de St Croix sont suivis thermiquement par le pôle de recherche Ecosystème Lacustre (ECLA) avec une chaîne de thermistor qui enregistre la température en continue (toutes les heures) sur toute la colonne d'eau en un point situé dans la zone de plus grande profondeur à proximité

des barrages. Des enregistreurs de pressions complètent le dispositif afin d'enregistrer les variations de niveau d'eau de ces deux plans d'eau (<https://professionnels.ofb.fr/fr/node/453>).

Le lac d'Esparron est suivi par le pole ECLA pour un projet de restauration de roselière en 2023. Plusieurs protocoles ont été réalisés dont des inventaires piscicoles par pêches électriques et captures à l'aide de nasses à alevins (<https://professionnels.ofb.fr/fr/node/468>).

Concernant le plan d'eau de St Croix, depuis 2016 des pêches scientifiques y sont effectuées par le pole ECLA dans un projet de suivi de l'Ombre chevalier. Ces pêches ont lieu l'hiver par 50 mètres de fond avec des filets maillants sur les zones de reproduction des ombles chevaliers (omblières). Depuis 2022, des gobies à tache noire sont capturés lors de ces pêches.

- Plan d'eau de Brunet

Le lac de Brunet est situé sur la commune du même nom dans les Alpes de Haute Provence. Il s'agit d'une retenue collinaire d'environ 2 hectares située sur le bassin versant de la Durance en bordure de la rivière Asse avec laquelle il est connecté par la nappe souterraine. Il a été créé dans les années 60 et il constitue une réserve d'eau pour l'irrigation. Un système de pompage alimente un autre plan d'eau sur le plateau de Valensole pour irriguer des cultures notamment d'amandiers. Il y a une variation de niveau d'eau très faible de quelques dizaines de centimètres. La baignade y est interdite mais il y a une activité halieutique qui est gérée par L'AAPPMA le Gaule Oraisonnaise.

La présence du gobie à tache noire est avérée dans ce plan d'eau depuis 2016.

- Retenue de Serre Ponçon

La retenue de Serre-Ponçon se situe sur le bassin versant de la Durance à la frontière des départements des Hautes-Alpes (05) et des Alpes-de-Haute-Provence (04). Elle est l'une des plus grandes retenues artificielles de France et d'Europe. La retenue a été construite en 1959 et mise en eau en 1961. La Durance et l'Ubaye sont les deux principaux affluents qui alimentent la retenue. Son exploitation est gérée par EDF. La retenue a comme usages la production d'électricité, un stockage pour l'eau potable et l'irrigation, de nombreuses activités récréatives (sport nautique, navigation, pêche etc.) et elle joue un rôle pour limiter les crues de la Durance.

Le fonctionnement du barrage étant lié à la demande énergétique, le marnage inter annuel est très irrégulier. Le record du niveau le plus bas a été observé en avril 2018 avec une cote à 731m NGF soit 49m de marnage.

Nom	Code lac	Superficie (ha)	Profondeur max (m)	Marnage moyen (m)	Altitude (m)	Temps de séjour (jours)
LAC DE SERRE-PONCON	SPO04	2794	129	23	779	196

De nombreux suivis piscicoles ont été réalisés dans ce lac, par pêche électrique, nasse, ADNe (metabarcoding), filets maillants, suivis visuels depuis 2017 pour le projet Uros ; ces données confirment l'absence du Gobie à tache noire dans ce plan d'eau. On le prendra ici comme plan d'eau témoin (négatif) pour le test de détection de gobie par l'ADNe.

V. Protocoles d'échantillonnage & données environnementales

V.1 Protocoles d'échantillonnage par pêche électrique



La pêche électrique est utilisée pour évaluer les communautés de poissons dans les grands cours d'eau ([Lapointe et al., 2006](#); [Tomanova et al., 2013](#)) ou les lacs ([Brosse et al., 2007](#); [Galafassi et al., 2019](#)). Il s'agit d'une méthode de capture qui utilise des impulsions électriques douces pour étourdir temporairement les poissons. Cette méthode est considérée comme peu invasive, mais elle doit être utilisée avec précaution pour minimiser les impacts sur les poissons. Les personnes qui réalisent ces échantillonnages sont formés, elles possèdent des habilitations électriques valides et le matériel est soumis à une vérification annuelle de maintien en état de conformité.

Dans notre étude, les pêches électriques ont été réalisées par point de 20 secondes sur un certain linéaire en zone littorale dans 1.5 mètre d'eau maximum. Elles ont été réalisées depuis un bateau avec un groupe électrogène EFKO FEG 8000 embarqué ou à pied avec une groupe électrogène portatif thermique EFKO type FG 1500 ou IMEO Volta.

Les poissons sont maintenus en captivité temporairement dans une bassine avec bulleur puis les espèces capturées sont identifiées, mesurées et remises à l'eau.

V.2 Protocoles d'échantillonnage par suivi visuels

Deux méthodes de suivi visuel ont été mises en place un suivi sub-aquatique et un suivi terrestre.

Des suivies visuels en Palme Masque Tuba (PMT) équipé d'une bouée de signalisation, une lampe torche de 1500 lumens et une plaquette de note ont été réalisés sur les plans d'eau en zone littorale par des personnes expérimentées en reconnaissance des poissons d'eau douce et habilitées par un certificat hyperbar. Cette technique est utilisée depuis les années 50 ([Halford and Thompson, 1994](#)), en particulier en milieu marin pour estimer les effectifs des populations de poissons de récifs ([Halford and Thompson, 1994](#); [Nagelkerken et al., 2000](#); [Azzurro et al., 2007](#)). En eau douce, cette technique a été considérée comme précise et informative pour caractériser les assemblages de poissons ([Plichard et al., 2017](#)) mais aussi les (micro)habitats utilisés par les communautés de poissons ([Brosse et al., 2001](#)).

Un transect est réalisé par un plongeur sous surveillance, les poissons sont identifiés à l'espèce, comptés et leur taille est estimée.

Le suivi terrestre se compose d'un transect nocturne en marchant au bord de l'eau tout en éclairant les bordures du plan d'eau avec une lampe puissante dans des endroits facilement accessibles. Ce suivi a été réalisé sur Quinson et St Croix. De nombreuses espèces de poissons dont le gobie à tache noire se retrouvent la nuit en zone littoral peu profonde. Il a été noté la présence des gobies à tache noire et d'autres espèces.

Ces deux techniques d'échantillonnage sont rapides à mettre en place, ne demandent pas d'autorisation de capture, peu coûteuses et surtout très peu invasives pour le milieu et les poissons., Elles sont par contre sensibles au biais opérateur et demandent la mise en place de protocoles strictes pour être quantitatives (durées, longueurs de transects) .

V.3 Protocoles d'échantillonnage ADNe

Les protocoles d'échantillonnage pour l'ADNe sont ceux décrits au paragraphe III.1 et III.2.

V.4 Echantillonnages réalisés et données collectées

- Gravière de Brunet

Sur la gravière de Brunet, il a été réalisé des filtrations d'eau pour l'ADNe et une pêche électrique au ÉFKO 1500 de 10 min sur trois stations le 25 juillet 2023 (Cf carte Figure 5).



Figure 5 : Stations suivies sur le Plan d'eau de Brunet (04)

Les mesures physico-chimiques collectées pour ce site sont les suivantes :

Heure	Station	Température (°C)	Conductivité (uS/cm)	Oxygène dissous (mg/l)	Saturation O2 (%)
11 :00	Brunet	26.4°C	719	9,8	128

- Retenue de Sainte Croix

Sur la retenue de Sainte croix, il a été réalisé deux campagnes d'échantillonnages en juin et juillet 2023 sur 5 stations représentatives ci-dessous (Figure 6).



Figure 6: Stations suivies sur le Plan d'eau de Sainte Croix (04/83)

En juin, il y a eu sur deux stations de pêche électrique à pied EFKO 1500 de 10 minutes, un suivi visuel sub-aquatique de jour et un de nuit.

Les mesures physico-chimiques collectées pour ce site sont les suivantes :

Heure	Localisation	Température	Conductivité (uS/cm)	Oxygène dissous (mg/l)	Saturation O2
11h	Salles sur Verdon	23°C	377	9	100%

En juillet, il a été réalisé de la pêche électrique, des filtrations ADNe, des suivis visuels de jour et de nuit.

Pour l'ADNe, une filtration a été réalisée sur 4 stations. Il n'y a pas eu de filtration au niveau des salles sur Verdon à cause de la turbidité induit par le vent et la remise en suspension du sédiment.

Il n'y a pas eu de pêche électrique réalisées à cause de l'accessibilité au niveau du barrage, d'une forte fréquentation touristique à St croix du Verdon et de la turbidité de l'eau due au brassage des sédiments par le vent sur Galeta. Il y a seulement eu une pêche de 10 minutes sur la baie de Bauduen.

Un suivi visuel de 15 minutes de jour a été réalisé sur 4 stations, seule la station au niveau des salles sur Verdon n'a pas été suivie à cause de la turbidité induite par le vent.

Les mesures physico-chimiques collectées pour ces sites sont les suivantes :

Heure	Station	Température (°C)	Conductivité (uS/cm)	Oxygène dissous (mg/l)	Saturation O2 (%)
8 :00	Bauduen	23.9	373	8	100

10 :30	Barrage	23.5	376	9	112
11 :30	St Croix du Verdon	24.6	376	9.01	114

- Retenue de Quinson

La retenue de Quinson a été échantillonnée le 21-22 juin 2023 en 4 points par de la pêche électrique à pied, des suivis visuels sub-aquatiques de jour et terrestre de nuit. Il n'y a pas eu d'ADNe sur ce plan d'eau. Il y a eu une vidange totale du barrage en 2018 et aucun gobie à tache noire n'a été capturé.

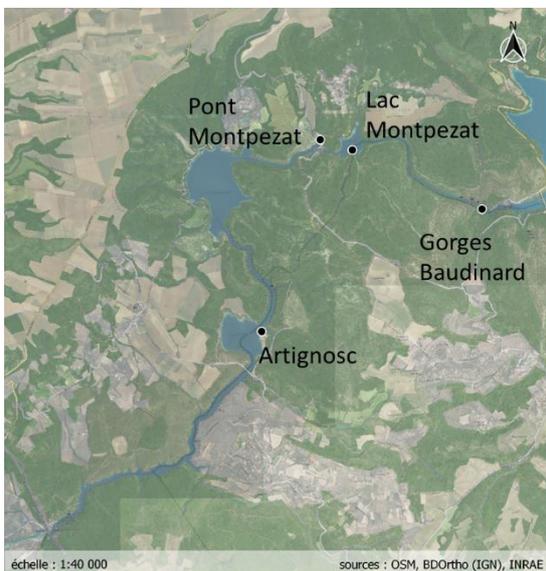


Figure 7 : Stations suivies sur le Plan d'eau de Quinson (04/83)

- Retenue d'Esparron

La retenue d'Esparron a été échantillonnée en juin et septembre 2023.

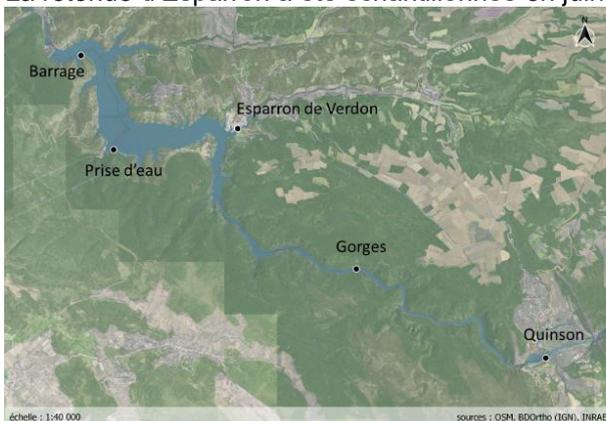


Figure 8 : Stations suivies sur le Plan d'eau d'Esparron (04/83)

L'amont de la retenue de Esparron a été échantillonnée en pêche électrique en juin ; les données environnementales alors collectées sont les suivantes :

Heure	Localisation	Température	Conductivité (uS/cm)	Oxygène dissous (mg/l)	Saturation O2
10:20	Lac d'Esparron	15°C	427	9,53	86%

En septembre 2023, il a été réalisé des filtrations d'eau pour de l'ADNe et de la pêche électrique depuis une embarcation sur 5 stations ; les données environnementales alors collectées sont les suivantes :

Heure	Localisation	Température	Conductivité (uS/cm)	Oxygène dissous (mg/l)	Saturation O2
10 :00	Barrage	21.8	363.5	9.93	113.3
10 :30	Prise d'eau	22.2	366	9.86	113.5
13 :15	Gorges	21.6	363.4	10.1	114.8
15 :30	Quinson	12.8	309.7	11.9	113.5

- Retenue de Serre-Ponçon

La retenue de Serre-Ponçon est notre lac référence avec une absence du gobie à tache noire. Il a été choisi car il est étudié de façon approfondie au niveau piscicole depuis sa création dans les années 60. Depuis 2017, le volet piscicole est étudié plus finement par le pole ECLA, INRAE et OFB au travers de plusieurs projets de recherche dont le suivi des radeaux végétalisés UROS et le suivi décennal hydro biologique de la retenue commanditée par le Syndicat Mixte Aménagement et de Développement de Serre-Ponçon (SMADESEP). Aucun gobie à tache noire n'a jamais été capturé ni observé sur Serre-Ponçon à l'heure actuelle. En septembre, il a été réalisé 5 prélèvements ADNe, 8 pêches électriques, 6 suivis visuels sub-aquatiques de jour et une pêche aux filets maillants protocole CEN.



Figure 9: Stations suivies sur la retenue de Serre-Ponçon (04/05)

VI. Comparaison des résultats obtenus par les différentes méthodes

VI.1 Validation des mesures ADNe

Concernant les échantillons ADNe prélevés sur les 4 plans d'eau, mis à part le lac de Serre-Ponçon où aucune trace ADN du gobie à tache noire n'a été détectée, les valeurs positives mesurées sont toutes supérieures à la LOD et on peut donc affirmer que le gobie à tache noire y est bien détecté. Concernant

la LOQ, les valeurs sont inférieures pour un seul échantillon (ESPO4-Quinson 4), et pour ce dernier, l'information n'est donc pas quantitative (détection faible mais non quantifiable). Pour tous les autres échantillons positifs pour le gobie à tache noire les valeurs sont supérieures à la LOQ et on peut donc comparer les valeurs des échantillons entre eux. Les témoins négatifs de terrain, d'extraction et de ddPCR sont par ailleurs tous ressortis négatifs pour le gobie à tache noire.

En parallèle du gobie à tache noire, le génome de la perche commune a été ciblé comme contrôle positif ADNe avec des amorces qui lui sont spécifiques (Vautier et al., 2023). Tous les échantillons, sauf un (station « Gorge » sur le lac d'Esparron »), sont ressortis positifs pour la perche commune, comme attendu puisqu'il s'agit d'une espèce présente dans tous les milieux étudiés. Ces résultats nous indiquent que la préservation des échantillons a été faite correctement et que l'absence de signal gobie à tache noire n'est pas imputable à une absence de signal ADNe poisson, mais plus vraisemblablement à une absence d'individus ou à une présence extrêmement faible. Il y a par contre un témoin de terrain positif pour la perche commune pour l'étang de Brunet, ce qui signifie qu'il existe des contaminations avec de l'ADN de perche commune au cours des prélèvements réalisés dans ce plan d'eau, et que donc les informations obtenues pour cette espèce sont à interpréter avec précaution. Les valeurs obtenues pour le témoin de terrain sont cependant bien plus faibles que dans les échantillons (entre 88 et 579 copies par litre d'eau filtré pour les échantillons, et seulement 17 pour le témoin (Tableau S1).

VI.1 Comparaison des méthodes pour chacun des plans d'eau

Gravière de Brunet

Sur la gravière de Brunet, seuls la pêche électrique et les suivis ADNe ont été réalisés, en septembre 2023. Pour chaque station échantillonnée, les analyses ADNe en ddPCR ont détecté le signal ADN du gobie à tache noire et la pêche électrique a permis des captures de gobie à tache noire (Figure 10, tableau S2). Ces résultats étaient attendus puisque la présence du gobie à tache noire est déjà connue sur ce plan d'eau depuis 2016, mais cela nous a tout de même permis de valider les deux approches, et notamment l'ADNe, dans un petit plan d'eau avec de fortes densités en gobies à tache noire. Concernant les informations sur l'abondance en gobies à tache noire, les deux méthodes ont montré une présence plus faible du gobie à tache noire au Nord du lac au niveau de la station « prise d'eau ». Par contre l'ADNe a montré un signal plus important à l'Ouest (station « rive Ouest »), qu'au sud (Station « rive Sud »), alors que pour les pêches électriques c'est l'inverse (Figure 10). Cependant, les quantités de gobie à tache noire capturées sont très faibles (entre 1 et 5), et les différences observées ne sont donc probablement pas significatives. **Les deux méthodes comparées ici, l'ADNe et la pêche électrique, semblent donc d'une efficacité similaire pour étudier la présence et l'abondance du gobie à tache noire dans de petits plans d'eau où l'abondance en gobie à tache noire est importante, comme dans la gravière de Brunet.**

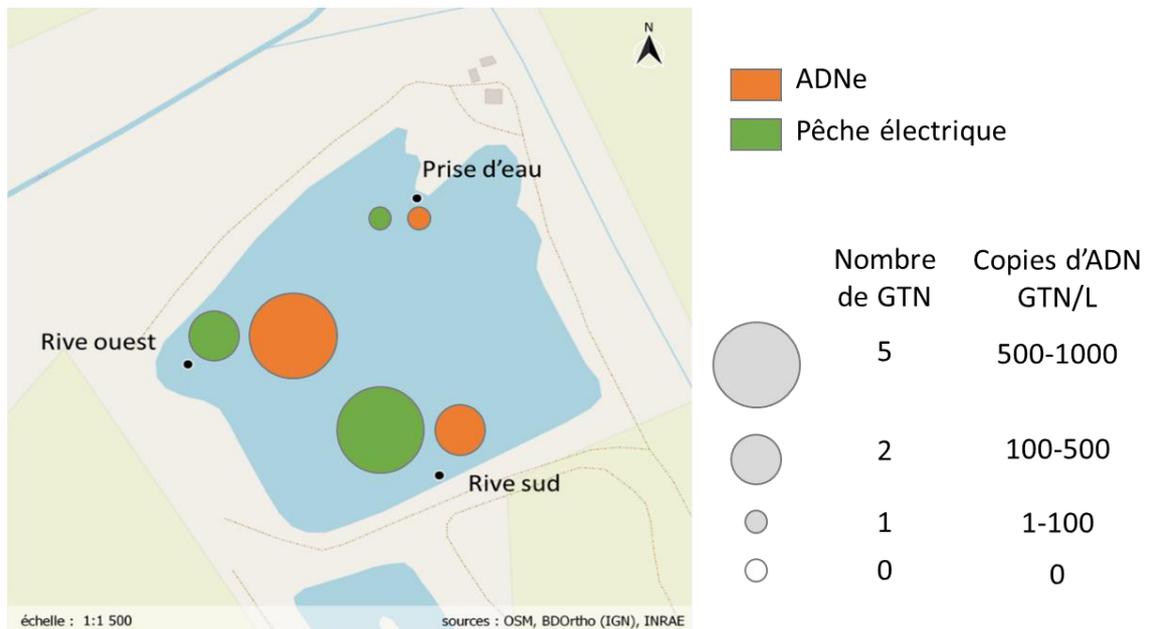


Figure 10 : Résultats en pêche électrique et ADNe pour la gravière de Brunet. Aucune observation visuelle n'a été réalisée sur ce plan d'eau. Les suivis ont été réalisés en une seule campagne en juillet 2023.

Lac de Sainte Croix

Quatre méthodes de suivis ont été mises en place sur le lac de Sainte Croix, l'ADNe, la pêche électrique, les observations sub-aquatiques et nocturnes. L'ADNe a permis de détecter le signal ADN du gobie à tache noire pour les quatre stations échantillonnées, tandis que pour ces mêmes stations, les observations subaquatiques n'ont permis l'observation du gobie à tache noire que dans trois des quatre stations échantillonnées, avec une absence d'observation dans le Nord du lac au niveau de la station « Galetas ». Cette absence d'observation est certainement due à la faible visibilité causée par la mise en suspension de particule en zone littoral par le vent. Pour la pêche électrique et les observations nocturnes, celles-ci n'ont été réalisées que dans deux stations, dont une différente des deux autres méthodes. La pêche électrique n'a pas permis de détecter la présence du gobie à tache noire, et les observations nocturnes ont permis l'observation du gobie à tache noire dans une seule des deux stations, « Les Salles sur Verdon » (Figure 11). L'ADNe a permis de détecter la présence du gobie à tache noire là où les autres méthodes montrent leurs limites notamment ici dans une eau turbide à cause de la météo à la date de l'échantillonnage. Il a été mis en évidence par ces résultats que **l'ADNe semble donc plus sensible que les observations sub-aquatiques et nocturne, et que la pêche électrique pour détecter la présence du gobie à tache noire dans de grands plans d'eau colonisés depuis déjà quelques années comme le lac de Ste Croix (première observation en 2017)**. Concernant les informations sur l'abondance de l'espèce, le signal ADNe ou les observations sub-aquatiques sont plus importants dans le sud du lac, mais le maximum d'observation a été fait dans la station de « Bauduen » pour les observations sub-aquatiques, et le maximum de signal dans celle de « Ste Croix du Verdon » pour l'ADNe. Cependant, une fois encore le nombre d'observations et de sites est faible, et ces différences ne sont peut-être pas significatives, de même que pour l'ADNe les

différences d'intensité de signal ADN sont limitées avec un facteur 2 au maximum.

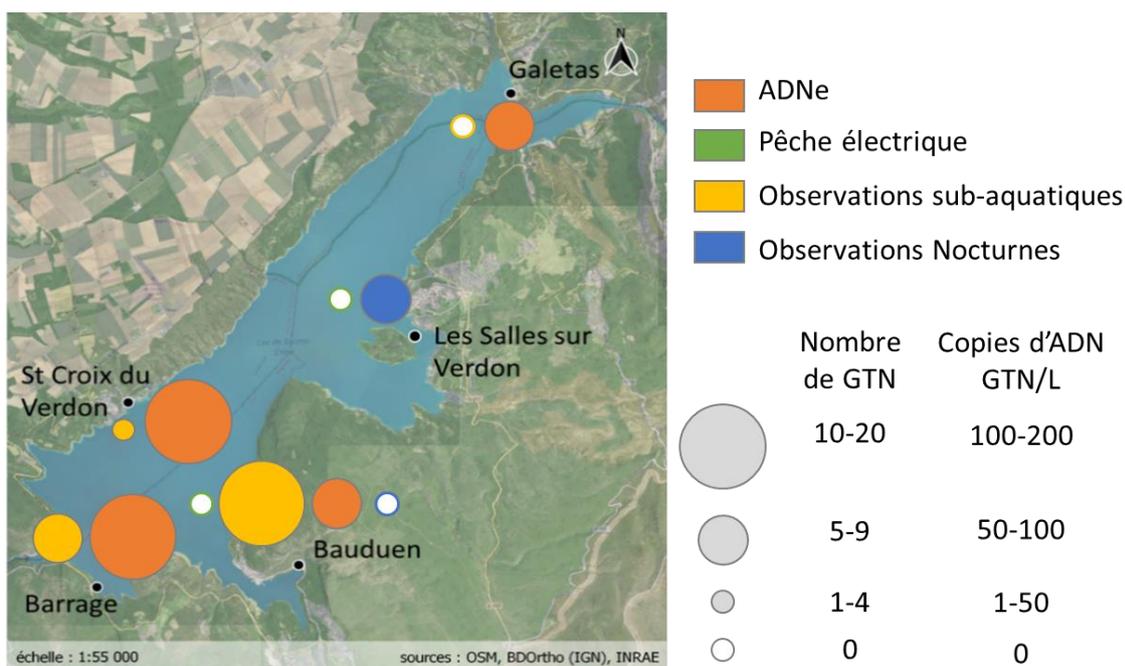


Figure 11 : Résultats en pêche électrique, observations visuelles et ADNe pour le lac de Sainte Croix. Seule la station de Bauduen et salles sur Verdon a fait l'objet de pêches électriques et d'observations nocturnes. L'ADNe a été effectuée en une seule campagne (juillet 2023), tandis que pour les autres méthodes elles se sont faites en deux fois (juin et juillet 2023 selon les méthodes).

Barrage de Quinson

Pour le Barrage de Quinson, de la pêche électrique et des observations sub-aquatiques et nocturnes ont été réalisées en juin 2023. Tous les points échantillonnés ont révélé la présence de gobie à tache noire en forte densité avec des individus matures en reproduction (suivis réalisés au mois de juin 2023) (Figure 12). **La présence du gobie à tache noire n'avait encore jamais été détectée sur le barrage de Quinson, et les suivis réalisés ici ont mis en évidence sa présence à l'aide de trois méthodes, les observations sub-aquatiques et nocturne et de la pêche électrique.** A noter qu'une vidange totale du barrage a eu lieu en 2018 avec aucun individu capturé. La colonisation du gobie sur ce plan d'eau est arrivée après 2018 donc récemment et il est présent en grande quantité dans tout le plan d'eau. La méthode ADNe n'ayant pas été mise en place sur ce plan d'eau, il n'est pas possible de comparer les différentes méthodes sur ce dernier.

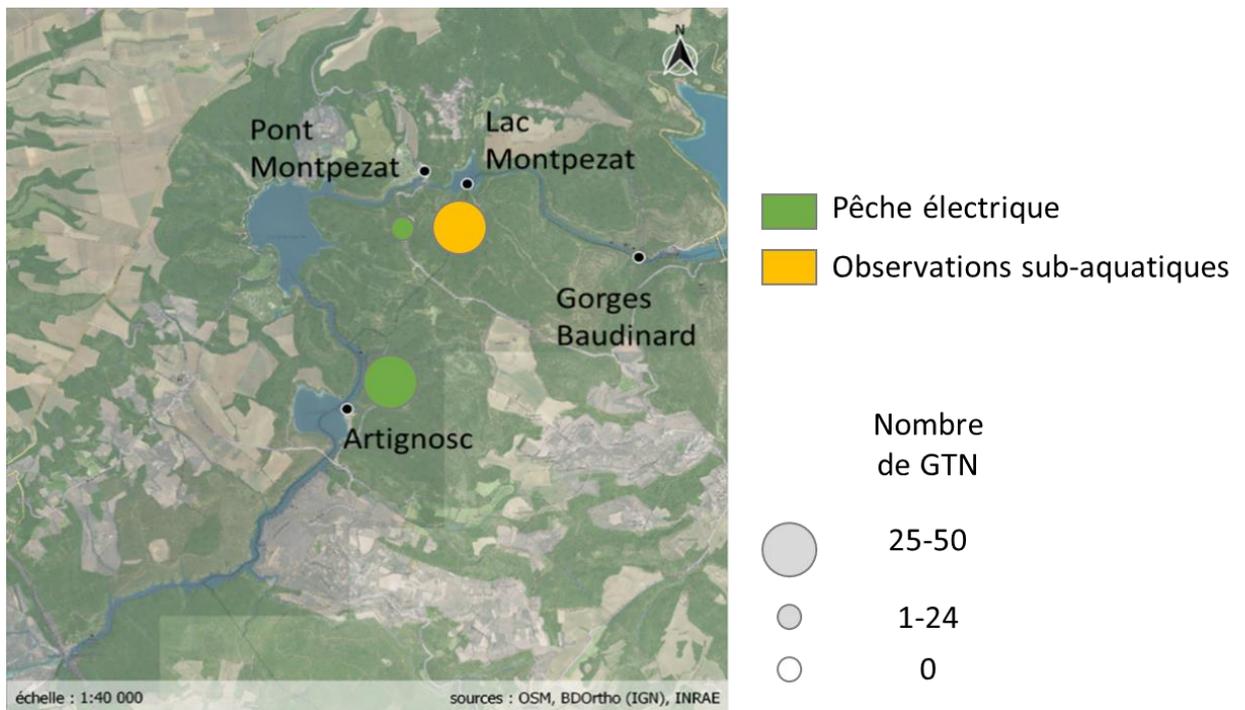


Figure 12 : Résultats en pêche électrique et observations visuelles sub-aquatiques à Montpezat et pêche électrique et observation nocturne à Artignosc. Aucun suivi ADNe et observation nocturne n'ont été réalisés sur ce lac. Les suivis ont été réalisés en juin 2023.

Lac d'Esparron

Pour le lac d'Esparron, trois méthodes ont été comparées en septembre 2023, l'ADNe, la pêche électrique et les observations sub-aquatiques. En amont d'Esparron, au niveau de Quinson, la présence du gobie à tache noire a été confirmée par l'ADNe et la pêche électrique. En juin, des pêches électriques avaient aussi été réalisées sur cette station, et elles avaient également permis la capture d'individus de petites tailles. Seule la méthode ADNe a permis de détecter la présence du gobie à tache noire, au niveau de la station « Esparron de Verdon » dans la partie aval des gorges (Figure 13). Aucune méthode n'a détecté de gobie à tache noire dans le partie aval du plan d'eau. **Il s'agit de la première preuve attestant de la présence du gobie à tache noire dans le lac d'Esparron. Quinson ayant été colonisé après 2018, le plan d'eau d'Esparron est au tout début de sa colonisation, mais des individus matures et en reproduction ont déjà été capturés en pêche électrique. L'ADNe semble être la méthode la plus sensible pour détecter la présence du gobie à tache noire en faible quantité dans un lac dans lequel il vient probablement tout juste de s'installer, puisque c'est la seule méthode à l'avoir détecté lors du suivi comparatif des trois méthodes sur la station d'« Esparron de Verdon »**

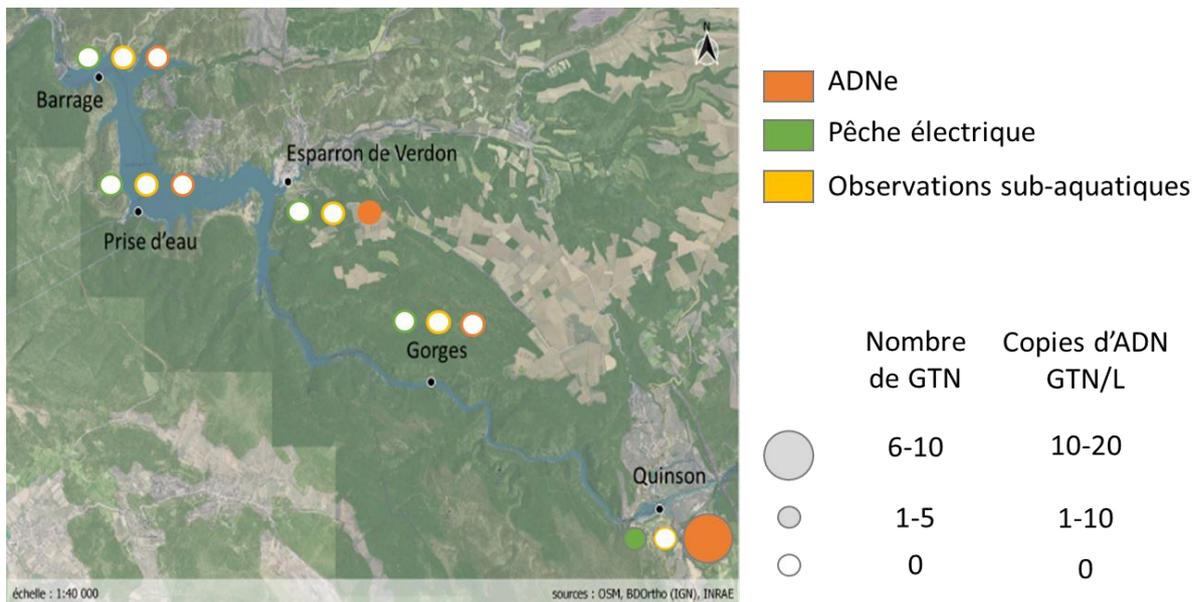


Figure 13 : Résultats en pêche électrique, observations sub-aquatiques et ADNe pour le lac d'Esparron. Les suivis ont été réalisés en septembre 2023 pour la pêche électrique, l'ADNe et les observations subaquatiques. Aucune observation nocturne n'a été réalisée sur ce lac.

Lac de Serre-Ponçon

Pour le lac de Serre-Ponçon, plusieurs suivis ont été réalisés avec chacune des méthodes, deux pour l'ADNe, quatre pour la pêche électrique et deux pour les observations sub-aquatiques. Sur l'ensemble de ces suivis, aucune capture, observation ou trace ADN du gobie à tache noire n'a été détectée, laissant penser que ce lac n'est toujours pas colonisé par le gobie à tache noire, ou présent dans des quantités infimes et non détectables à l'aide des méthodes employées (Figure 14). **Toutes les méthodes testées semblent donc confirmer l'absence du gobie à tache noire dans le lac de Serre-Ponçon qui été notre lac témoin.**

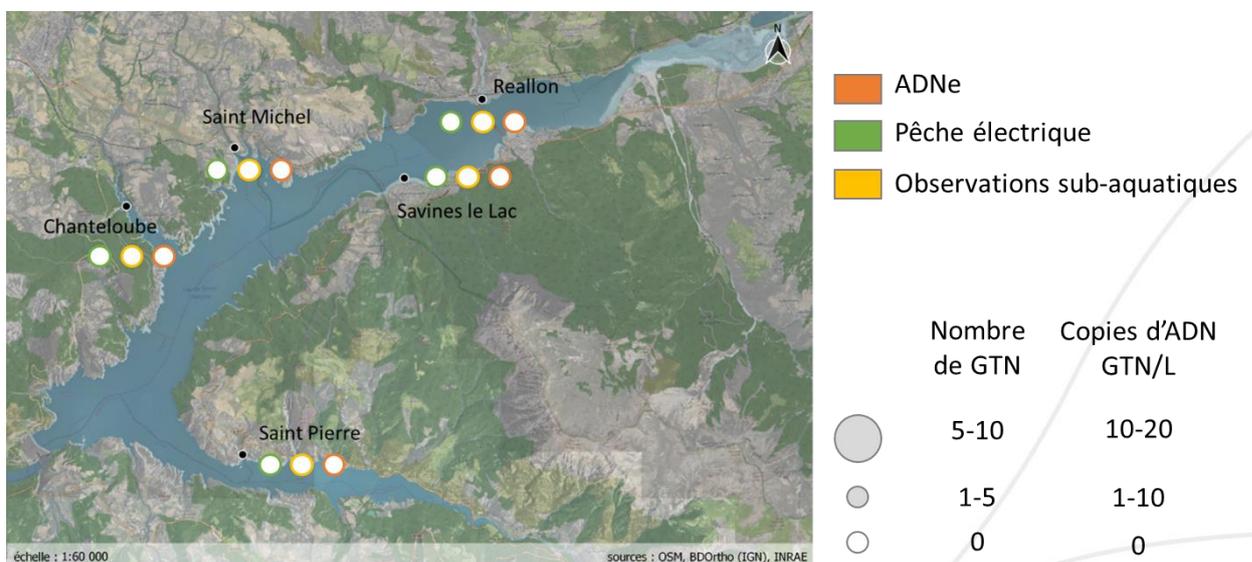


Figure 14 : Résultats en pêche électrique, observations sub-aquatiques et ADNe pour le lac de Serre-Ponçon. Les suivis ont été réalisés en mars, mai, juillet et septembre 2023 pour la pêche électrique, en juillet et septembre 2023 pour l'ADNe et en mai et septembre 2023 pour les observations subaquatiques. Aucune observation nocturne n'a été réalisée sur ce lac. Des pêches scientifiques au filets CEN ont également été réalisées en septembre 2023, et aucun gobie à tache noire n'a été observé.

VI.3 Comparaison des méthodes pour l'ensemble des plans d'eau

Le gobie à tache noire a été observé pour la première fois en 2016 dans la gravière de Brunet, et en 2017 dans le lac de Sainte Croix. Leur apparition dans les lacs de Quinson et d'Esparron a été constatée au cours de ce projet, et donc en 2023. Pour le lac de Serre-Ponçon, pour l'instant aucune preuve ne peut attester de sa présence, et il est supposé encore absent de ce lac.

Cette chronologie d'apparition se retrouve dans les concentrations en ADNe mesurées dans ces plans d'eau au cours des suivis réalisés en 2023. On observe en effet des concentrations de plus en plus élevées avec l'ancienneté de l'année d'apparition de l'espèce dans le lac. L'ADNe semble donc bien refléter les abondances théoriques en gobie à tache noire. On observe en effet les concentrations les plus importantes dans la gravière de Brunet, avec l'ensemble des échantillons positifs pour le gobie à tache noire et des valeurs allant jusqu'à 868 copies d'ADN par litre d'eau filtrée (Figure 15, Tableau S2). Pour Ste Croix, tous les échantillons sont également positifs, mais les valeurs maximales et moyennes sont plus faibles, avec un maximum de 160 copies d'ADN par litre d'eau filtrée (Figure 15, Tableau S3). Pour le lac d'Esparron dans lequel l'arrivée du gobie à tache noire est plus récente, seul un échantillon est positif, et les concentrations en ADNe sont beaucoup plus faibles, avec un maximum de 16 copies d'ADN par litre d'eau filtrée pour Esparron du verdon, et 10 copies d'ADN par litre d'eau filtrée pour Quinson (Figure 15, Tableau S4 et S5). Au niveau de Serre-Ponçon dans lequel le gobie à tache noire n'a encore jamais été observé, les données sont bien évidemment nulles (Figure 15, Tableau S6). On observe donc que pour les deux plans d'eau colonisés depuis le plus longtemps, Brunet et Ste Croix, les concentrations en ADNe sont plus importantes et reflètent donc l'abondance plus importante en gobie à tache noire par rapport au lac d'Esparron où les concentrations sont encore très faibles, et donc les abondances encore très faibles. L'ADNe a donc bien la capacité d'estimer l'abondance en gobies à taches noires, et donc dans une certaine mesure d'estimer la durée depuis laquelle elle est arrivée sur le plan d'eau (signal faible = arrivée récente, signal fort = arrivée plus ancienne). Pour Brunet et Sainte Croix, les concentrations en ADNe présentent également des différences importantes, avec un signal plus fort sur Brunet. Deux hypothèses pourraient expliquer ces différences, la petite taille de Brunet concentrerait le signal du gobie à tache noir par rapport à celui présent dans Ste croix qui est beaucoup plus grand, ou bien ces différences reflètent des abondances différentes, avec une abondance plus importante dans Brunet, plan d'eau dans lequel le gobie a tache noir est apparu plus tôt.

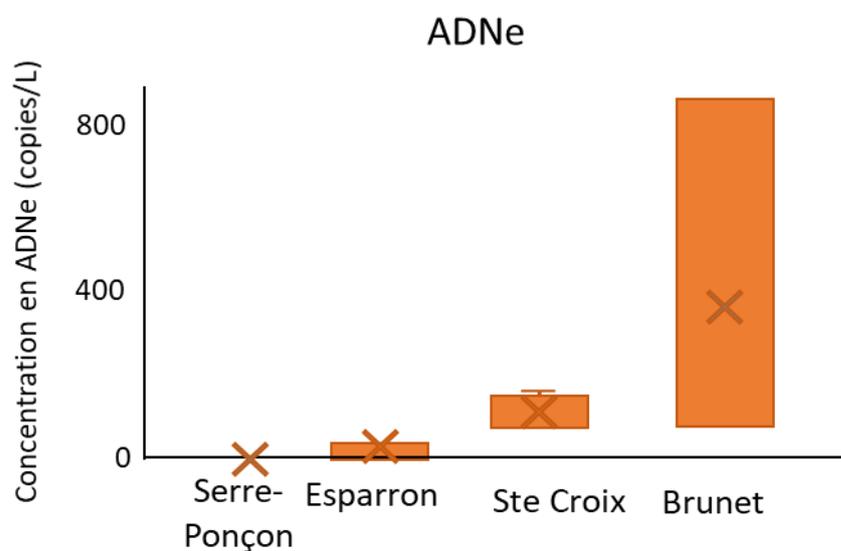


Figure 15 : Concentration en ADNe pour chacun des lacs suivis, Serre-Ponçon, Esparron, Ste Croix et Brunet. Les concentrations en ADNe sont exprimées en nombre de copies par litre d'eau filtré.

Pour les données d'observations sub-aquatiques, malheureusement aucun suivi n'a été réalisé dans la gravière de Brunet en 2023 à cause de la turbidité de l'eau. Sur les autres plans d'eau suivis, **le nombre de poissons observés par site en suivi sub-aquatique ne semble pas très bien refléter l'abondance théorique en gobies à tache noire (nombre important observé dans des lacs nouvellement colonisés, faible dans certains colonisés depuis longtemps)** (Figure 16). **Les observations sub-aquatiques reflètent la présence du gobie à tache noire dans une zone littorale précise et à un instant T et sont donc des approches plus locales que globales.** On retrouve des observations pour trois des quatre sites suivis sur Ste Croix, avec un maximum de 20 individus observés par site, et aucune observation dans les lacs d'Esparron. Il n'y a malheureusement pas eu d'observation visuelle au niveau de Quinson, où le gobie à tache noire a été détecté en pêche électrique et en ADNe à cause du courant et d'une température de l'eau trop froide en raison d'un lâché du barrage amont lors des échantillonnages. Sur notre lac témoin, Serre-Ponçon, aucune observation non plus comme attendu.

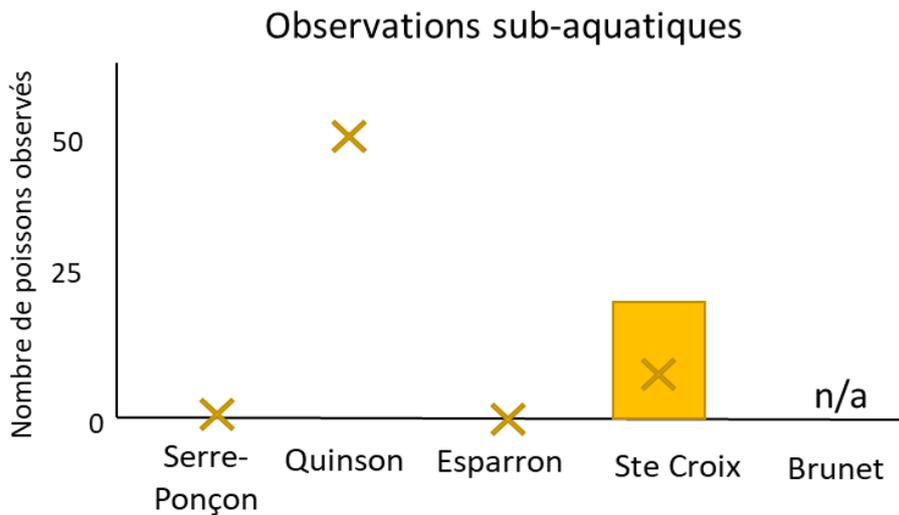


Figure 16 : Nombre de poissons observés en suivi sub-aquatiques pour chacun des lacs suivis, Serre-Ponçon, Quinson, Esparron, Ste Croix et Brunet. Les suivis ont pu être réalisés de jour ou de nuit. Pour la gravière de Brunet, aucun suivi sub-aquatique n'a été réalisé.

Pour la pêche électrique, on retrouve un peu la même tendance que pour les observations subaquatiques, avec un maximum de gobie à tache noire capturés dans le lac de Quinson où son arrivée est supposée récente (retenue vidée en 2018 et aucun gobie à tache noire n'y avait été observé) (Figure 17). Pour la gravière de Brunet les pêches ont permis de capturer des gobies à tache noire pour chaque site, avec un maximum de 5 gobies à tache noire par site. Sur Ste Croix aucun gobie à tache noire n'a été capturé malgré une arrivée dans le lac remontant à 2017, mais on notera qu'un seul site a été prospecté en pêche électrique sur du fait de problèmes d'embarcations nautiques en état de marche à la période d'échantillonnage. **La pêche électrique reflète l'abondance en gobie à tache noire en zone littoral à un instant T, et donc une information plus locale que globale. De nombreux transects doivent donc être prospectés pour retranscrire l'abondance de l'espèce à l'échelle d'un plan d'eau.**

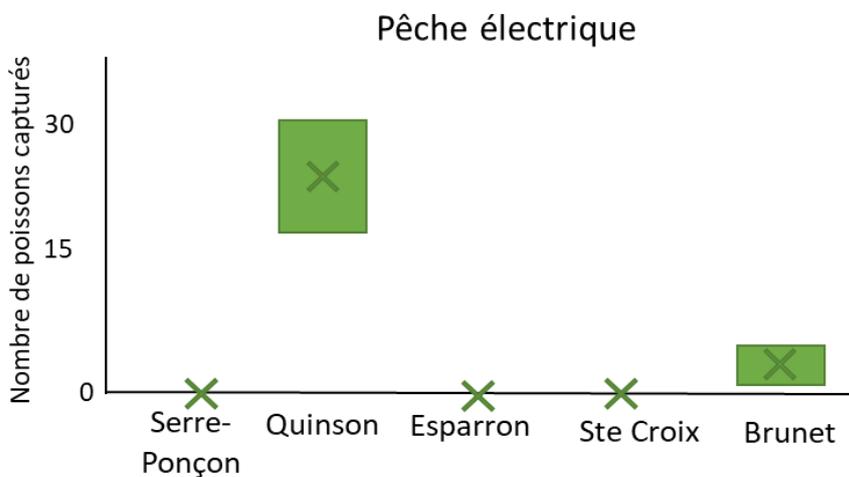


Figure 17 : Nombre de poissons observés en pêches électriques pour chacun des lacs suivis, Serre-

L'ADNe semble être la méthode qui reflète le mieux l'abondance théorique en gobie à tache noire en lien avec la durée d'apparition de l'espèce dans le lac (plus le gobie à tache noire est introduit depuis longtemps plus son abondance est importante) par rapport à la pêche électriques et aux observations subaquatiques. Cette différence est probablement due au potentiel intégrateur de l'ADNe qui donne une information globale tandis que les observations sub-aquatiques et la pêche électrique donnent davantage des informations locales. L'ADNe reflète une biomasse globale car plus un individu a une biomasse importante plus il va libérer de l'ADNe dans l'environnement, tandis que les autres méthodes se basent sur le nombre d'individus. Il pourrait donc être intéressant de comparer la biomasse capturée à la concentration en ADNe pour voir si la corrélation serait meilleure.

Taux de détection

Toutes les méthodes n'ont pas été comparées systématiquement dans les mêmes sites, mais nous avons tout de même tenté de calculer un taux de détection associé à chacune des méthodes en se basant que sur les sites comparables. On constate alors des différences importantes entre ces méthodes, l'ADNe possédant le meilleur taux de détection, avec 42% des échantillons dans lesquels le gobie à tache noire a été détecté, suivi de la pêche électrique avec 22%, et enfin les observations sub-aquatiques avec 17% (Figure 18). **Ces résultats tendent à montrer une sensibilité accrue de l'ADNe pour détecter la présence du gobie à tache noire à comparer à la pêche électrique et aux observations sub-aquatiques.** Ces résultats ne sont pas surprenants l'ADNe ayant déjà été largement montré comme étant plus sensible que les méthodes traditionnelles pour détecter les espèces rares, comme les espèces invasives en début de colonisation. Cette sensibilité de l'ADNe est notamment dû à sa capacité d'intégrer le signal ADNe provenant d'une large aire spatiale pouvant aller jusqu'à plusieurs kilomètres, tandis que les observations visuelles ou les pêches électriques sont limitées aux transects prospectés, et donc à une plus faible aire spatiale.

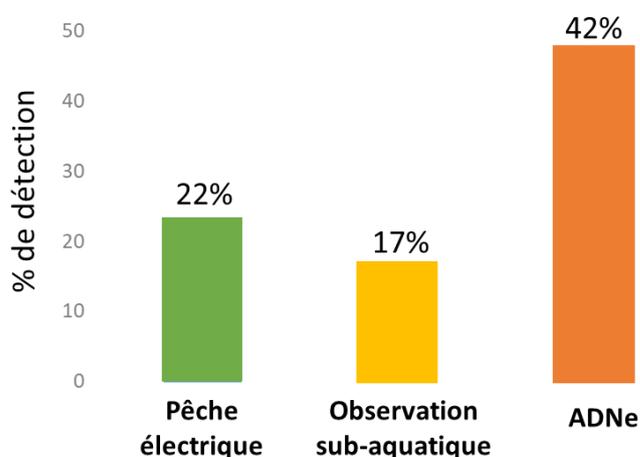


Figure 18 : Pourcentages de détection pour les données de pêche électriques, observations

subaquatiques et ADNe pour les quatre plans d'eau sur lesquels ces trois suivis ont été réalisés, Les lacs de Serre-Ponçon, Sainte Croix et d'Esparron, ainsi que la Gravière de brunet.

Corrélations entre les méthodes

Malgré ces différences au niveau des taux de détection entre les trois méthodes, le calcul du taux de corrélation de Spearman nous montre qu'il **existe une corrélation positive et significative entre les suivis ADNe et les pêches électriques d'une part, et les suivis ADNe et les observation sub-aquatiques de l'autre. Il n'existe par contre pas de corrélation significative entre les pêches électriques et les observations sub-aquatiques (Figure 19)**. Ces différences pourraient s'expliquer par les zones différentes explorées par ces deux méthodes, en zone très littorale pour les pêches électriques, et en zone plus profonde pour les observations sub-aquatiques. L'ADNe intégrant un signal provenant d'une aire spatiale plus large que chacune des deux méthodes, il leur est corrélé à toutes les deux.

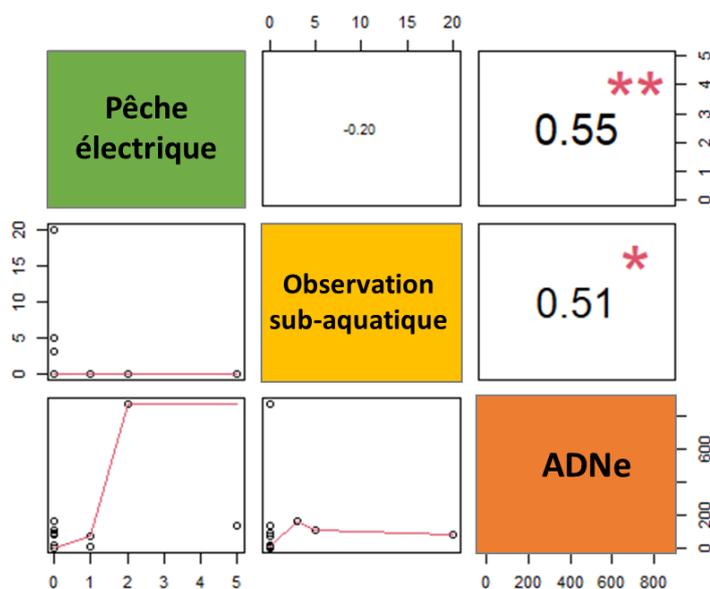


Figure 19 : Corrélations de Spearman entre les données de pêche électriques, observations subaquatiques et ADNe pour les trois plans d'eau sur lesquels ces trois suivis ont été réalisés, Les lacs de Serre-Ponçon, Sainte Croix et d'Esparron. ** : p-value<0.01 et * : p-value<0.05.

VII. Conclusion & perspectives

L'objectif de cette étude était de tester différentes méthodes d'échantillonnage et de détection du gobie à tache noire, avec en particulier le développement d'une méthode ADNe non-invasive. **Cette méthode ADNe a tout d'abord été développée, avec le design et la validation d'amorces spécifiques au**

gobie à tache noire et compatibles avec une utilisation en ddPCR, une méthode qui permet une quantification absolue et sensible des signaux ADNe. Elle a ensuite été validée sur le terrain, en la comparant à des méthodes plus traditionnelles, comme les comptages visuels (également non invasifs) et la pêche électrique. Cette comparaison nous a permis de constater que le suivi ADNe était efficace, et il s'est par ailleurs révélé être plus sensible que ces deux autres méthodes (meilleur taux de détection et détection de faibles signaux). L'ADNe semble également être mieux corrélé à l'abondance théorique en gobies à tache noire, dans le sens où plus l'arrivée de l'espèce est récente et plus on s'attend à avoir une abondance faible. **Il existe cependant une corrélation positive et significative en les suivis ADNe et les deux autres méthodes traditionnelles testées, et elles montrent donc toutes une même tendance vis-à-vis de la présence du Gobie à taches noire sur les plans d'eau étudiés. Les trois méthodes se sont révélées efficaces sur les lacs dans lesquels le gobie à tache noire est installé depuis plusieurs années, comme la gravière de Brunet (2016) et le lac de Sainte Croix (2017), mais dans le lac d'Esparron dans lesquels le gobie à tache noire n'avait encore jamais été observé, l'ADNe s'est révélée être plus sensible que les deux autres méthodes, puisque la seule à avoir pu identifier le gobie à tache noire dans la partie aval des gorges.**

Les trois méthodes testées ont toutes leurs avantages et leurs inconvénients. L'ADNe qui est une approche non-invasive, très sensible, facile et rapide à mettre en place sur le terrain (simple prélèvement d'eau), par peu de personnel (2 personnes suffisent) et par du personnel peu spécialisé (protocoles simples), répétable et facilement standardisable. De plus, elle est représentative de l'abondance de l'espèce étudiée lorsqu'elle est couplée à des méthodes quantitatives comme la ddPCR, et dans le cas des espèces invasives elle semblerait même pouvoir permettre d'avoir une idée de la durée depuis le début de l'invasion (signal très faible dans les plans d'eau nouvellement colonisés, et plus important dans les plans d'eau colonisés depuis plus longtemps). De plus, l'approche ADNe permet d'étudier aussi bien les zones littorales, que pélagiques et benthiques, la seule limite étant la capacité de prélever de l'eau à une profondeur donnée. Elle ne permet cependant pas d'avoir d'information immédiate sur la présence d'espèces mais après un délai de traitement des échantillons en laboratoire, délai toutefois court, puisqu'il s'est écoulé deux jours entre la réception des échantillons et l'obtention de l'ensemble des résultats ADNe au cours de ce projet (26 échantillons au total). L'ADNe ne donne pas non plus d'information sur la taille, le sexe, la maturité ou encore l'habitat des espèces étudiées. La pêche électrique quant à elle permet de capturer les individus, et donc d'obtenir une information immédiate et des informations, comme la taille, le sexe ou encore la maturité, mais c'est malheureusement une méthode invasive, sensible aux conditions météorologiques et qui nécessite du personnel habilité, et du matériel et des compétences spécifiques sur le terrain. La pêche électrique est également limitée à la zone littorale, puisqu'elle se révèle inefficace lorsque la profondeur de l'eau excède 1.5m. Ces suivis nécessitent également des effectifs importants sur le terrain, avec une équipe de 3 ou 4 personnes sur le terrain pour un engin portatif, et 5 avec un engin non portatif. Concernant les observations sub-aquatiques de surface et nocturne, elles ont l'avantage d'être non-invasives et facile à mettre en œuvre. Elles permettent d'obtenir des informations de présence immédiates sur l'habitat de l'espèce étudiée, mais ces sont des approches qui sont très sensibles au biais observateur,

sensibles aux conditions météorologiques (clarté de l'eau, courant, température) et peu quantitatives. Elles nécessitent également une bonne expérience dans la détermination des poissons, et donc du personnel spécialisé. Elles peuvent par ailleurs être contraignantes quand elles doivent être réalisées de nuit pour être efficaces, comme cela a été le cas sur le lac de Saint Croix. De plus, ces observations subaquatiques sont limitées à des zones peu profondes, de l'ordre de quelques mètres. **Ces trois approches possédant toutes leurs avantages et leurs limites, elles doivent donc être utilisées de façon complémentaire, avec notamment l'ADNe pour la détection précoce et l'estimation de l'abondance, les pêches électriques pour obtenir des informations sur le sexe, la taille et la maturité des individus, et les observations sub-aquatiques pour étudier l'espèce dans son habitat.**

Trois systèmes de pêches électriques ont été testés sur le terrain, deux appareils portatifs, un à batterie l'IMEO Volta et avec un groupe thermique le EFKO 1500, et un appareil non portatif avec un groupe thermique le EFKO 8000. Il ressort de ces tests que le gobie à tache noire n'est pas une espèce facilement capturable en pêche électrique. Le gobie à tache noire réagit difficilement à l'électricité, il est en effet attiré sur une très courte distance, puis tombe rapidement sur le fond. Il a parfois été observé que le gobie à tache noire ne pouvait pas sortir de son obstacle lors de la tétanie électrique et qu'il fuyait une fois l'électricité coupée.

Le groupe IMEO Volta s'est montré trop juste dans les conditions utilisées pour la capture du gobie à tache noire avec beaucoup d'échappement, mais par contre les deux groupes thermiques se sont révélés efficaces pour sa capture.

Si la présence du gobie à tache noire était déjà avérée dans la gravière de Brunet et dans le lac de Sainte Croix, sa présence a été observée pour la première fois sur les lacs de Quinson et d'Esparron. Sur ces deux lacs la colonisation semble être très récente et il serait intéressant de réaliser un suivi plus poussé en 2024 pour essayer de caractériser la présence et l'évolution du gobie à tache noire sur Esparron. Il serait notamment intéressant de déployer un suivi ADNe dans les plans d'eau en amont de St Croix, et les gravières autour de Brunet afin d'établir une carte précise de sa répartition actuelle, et de compléter avec de la pêche électrique et des observations sub-aquatiques pour obtenir localement des informations complémentaires. Pour le lac de Serre-Ponçon, aucun signe de la présence du Gobie à tache noire n'a été détecté, et il serait donc pertinent de poursuivre la surveillance de ce lac, en mettant notamment en place un suivi ADNe, cette méthode étant la plus sensible pour détecter les signaux de présence d'une espèce. **La présence du gobie à tache noire a été mise en évidence pour la première fois dans deux plans d'eau en aval de St Croix, la retenue de Quinson et d'Esparron, puis dans le lac d'Esparron en partie amont des gorges et enfin en aval des gorges (seulement par l'ADNe.) Aucune des méthodes n'ayant détecté le gobie à tache noire dans les autres parties du plan d'eau d'Esparron, on peut supposer que sa colonisation est très récente et qu'il n'est pas ou très peu présent en aval d'Esparron.**

A partir des données de pêches électriques et de suivi visuel, le gobie a été observé en 2023 en nombre inférieur à 2022 sur le lac de St Croix et la gravière de Brunet. L'achigan à grande bouche a été introduit

dans ces deux plans d'eau afin de réguler naturellement le gobie à tache noire. Cette baisse des observations pourrait donc potentiellement être liée à l'introduction de ce prédateur, soit en changeant le comportement du gobie à tache noire qui est devenu plus farouche pour échapper aux prédateurs, soit par une diminution de l'abondance en raison d'une consommation importante par les prédateurs. Cependant, les résultats de cette étude ont montré que la pêche électrique ne semble pas forcément refléter l'abondance en gobie à tache noire d'un plan d'eau, et il serait donc intéressant de mesurer l'effet de l'introduction de ce prédateur sur l'abondance en gobie à tache noire à l'aide de suivi ADNe, méthode qui se démarque pour son potentiel quantitatif. On pourrait également suivre les deux espèces en parallèle, le gobie à tache noire et l'achigan à grande bouche, avec un suivi ADNe afin de suivre l'évolution du prédateur et de sa proie, et donc de tester l'efficacité de cette approche de régulation de l'espèce invasive.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'efficacité de l'ADNe couplé à la ddPCR pour détecter précocement et quantifier l'abondance en gobie à tache noire dans 3 plans d'eau et ces résultats ouvrent la porte au développement de ces approches novatrices pour d'autres espèces exotiques envahissantes présentes dans les lacs français, comme les écrevisses américaines ou de Californie, le pseudorasbora ou encore le silure glane. De plus, la technologie de la ddPCR permet de réaliser des analyses en multiplex avec jusqu'à 6 espèces ciblées en même temps, et on pourrait donc imaginer, avec un développement d'amorces performant, de suivre la présence et l'abondance de 6 espèces en même temps avec une seule analyse ADNe.

Remerciements à :

Julien Preynat et Eric Leterrier Fédération pour la pêche et la protection du milieu aquatique 83

Vincent Duru pour la pêche et la protection du milieu aquatique 04

Mickael Cagnant et Jean Michel Foissy Direction interrégionale PACA-Corse

Quentin Salmon, Althaea Pangaud, Virginie Diouloufet, Camille Leclerc, Simon Bazin de INRAE Aix en Provence

Marlène Meynard OFB pole R&D Ecosystème Lacustre

Jean Christian Michel président de l'AAPPMA Verdon Colostre

Victor Delay Stagiaire M1

Veronique Madies et Adrien Chanoski employé du club nautique d'Esparron de Verdon CNAV

VIII. Références bibliographiques

Références bibliographiques relatives aux approches ADNe

Allan, E. A., A. F. Govindarajan, W. G. Zhang & A. C. Lavery, 2020. Environmental DNA shedding and decay rates

- from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>.
- Andruszkiewicz, E. A., Sassoubre, L. M., & Boehm, A. B. (2017). Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLoS One*, 12(9), e0185043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185043>
- Bakker, J., Wangensteen, O. S., Chapman, D. D., Boussarie, G., Buddo, D., Guttridge, T. L., Hertler, H., Mouillot, D., Vigliola, L., & Mariani, S. (2017). Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact. *Scientific Reports*, 7(1), 16886. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17150-2>
- Barnes, M. A. & C. R. Turner, 2016. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics* 17: 1–17.
- Barnes, M. A., C. R. Turner, C. L. Jerde, M. A. Renshaw, W. L. Chadderton & D. M. Lodge, 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science and Technology* 48: 1819–1827.
- Beng, K. C. & R. T. Corlett, 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation* 29: 2089–2121.
- Bessey, C., Jarman, S. N., Berry, O., Olsen, Y. S., Bunce, M., Simpson, T., Power, M., McLaughlin, J., Edgar, G. J., & Keesing, J. (2020). Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 2(4), 493–504. <https://doi.org/10.1002/edn3.74>
- Birk, S., W. Bonne, A. Borja, S. Brucet, A. Courrat, S. Poikane, A. Solimini, W. Van De Bund, N. Zampoukas & D. Hering, 2012. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators* 18: 31–41.
- Bohan, D. A., C. Vacher, A. Tamaddoni-Nezhad, A. Raybould, A. J. Dumbrell, & G. Woodward, 2017. Next-generation global biomonitoring: large-scale, automated reconstruction of ecological networks. *Trends in Ecology & Evolution* 32: 477–487
- Brys, R., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Mauvisseau, Q., Auwerx, J., Sweet, M., & Mergeay, J. (2020). Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). In *Journal of Fish Biology* (Vol. 98, Issue 2, pp. 399–414). Wiley. <https://doi.org/10.1111/jfb.14315>
- Bylemans, J., Furlan, E. M., Hardy, C. M., McGuffie, P., Lintermans, M., & Gleeson, D. M. (2017). An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: A case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 646–655.
- Bylemans, J., Gleeson, D. M., Hardy, C. M., & Furlan, E. (2018). Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray-Darling Basin (Australia). *Ecology and Evolution*, 8(17), 8697–8712. <https://doi.org/10.1002/ece3.4387>
- Compson, Z. G., B. McClenaghan, G. A. C. Singer, N. A. Fahner & M. Hajibabaei, 2020. Metabarcoding from microbes to mammals: comprehensive bioassessment on a global scale. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8: 1–19.
- Deiner, K. & F. Altermatt, 2014. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>.
- Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender & L. Bernatchez, 2017. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26: 5872–5895.
- de Souza, L.S., Godwin, J.C., Renshaw, M.A., Larson, E., 2016. Environmental DNA (eDNA) detection probability is influenced by seasonal activity of organisms. *PLoS ONE* 11, e0165273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165273>
- Di Muri, C., Lawson Handley, L., Bean, C. W., Benucci, M., Harper, L. R., James, B., Li, J., Winfield, I. J., & Hänfling, B. (2022). Spatio-temporal monitoring of lake fish spawning activity using environmental DNA metabarcoding. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/2022.02.07.478003>
- Doi, H., T. Takahara, T. Minamoto, S. Matsushashi, K. Uchii & H. Yamanaka, 2015. Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species. *Environmental Science and Technology* 49: 5601–5608.
- Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. In A. R. Mahon (Ed.), *PLOS ONE* (Vol. 10, Issue 3, p. e0122763). Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122763>
- Dudgeon, D., A. H. Arthington, M. O. Gessner, Z. I. Kawabata, D. J. Knowler, C. Lévêque, R. J. Naiman, A. H. Prieur-Richard, D. Soto, M. L. J. Stiassny & C. A. Sullivan, 2006. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 81: 163–182.
- Eichmiller, J. J., S. E. Best & P. W. Sorensen, 2016. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental Science and Technology* 50: 1859–1867.
- Ghosal, Ratna, Jessica J. Eichmiller, Bruce A. Witthuhn, et Peter W. Sorensen. 2018. « Attracting Common Carp to a Bait Site with Food Reveals Strong Positive Relationships between Fish Density, Feeding Activity, Environmental DNA, and Sex Pheromone Release That Could Be Used in Invasive Fish Management ». *Ecology and Evolution* 8 (13): 6714-27. <https://doi.org/10.1002/ece3.4169>.

- Giguet-Covex, C., G. F. Ficetola, K. Walsh, J. Poulenard, M. Bajard, L. Fouinat, P. Sabatier, L. Gielly, E. Messenger, A. L. Develle, F. David, P. Taberlet, E. Brisset, F. Guiter, R. Sinet & F. Arnaud, 2019. New insights on lake sediment DNA from the catchment: importance of taphonomic and analytical issues on the record quality. *Scientific Reports* 9: 14676
- Gillet, C., & Dubois, J. P. (1995). A survey of the spawning of perch (*Perca fluviatilis*), pike (*Esox lucius*), and roach (*Rutilus rutilus*), using artificial spawning substrates in lakes. In *Hydrobiologia* (Vols. 300–301, Issue 1, pp. 409–415). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/bf00024482>
- Goldberg, C. S., C. R. Turner, K. Deiner, K. E. Klymus, P. F. Thomsen, M. A. Murphy, S. F. Spear, A. McKee, S. J. Oyler-McCance, R. S. Cornman, M. B. Laramie, A. R. Mahon, R. F. Lance, D. S. Pilliod, K. M. Strickler, L. P. Waits, A. K. Fremier, T. Takahara, J. E. Herder & P. Taberlet, 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* 7: 1299–1307.
- Hänfling, B., Lawson Handley, L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., Oliver, A., & Winfield, I. J. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 25(13), 3101–3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660>
- Harper, L. R., A. S. Buxton, H. C. Rees, K. Bruce, R. Brys, D. Halfmaerten, D. S. Read, H. V. Watson, C. D. Sayer, E. P. Jones, V. Priestley, E. Mächler, C. Múrria, S. Garcés-Pastor, C. Medupin, K. Burgess, G. Benson, N. Boonham, R. A. Griffiths, L. Lawson Handley & B. Hänfling, 2019. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia* 826: 25–41.
- Hindson, B. J., K. D. Ness, D. A. Masquelier, P. Belgrader, N. J. Heredia, A. J. Makarewicz, I. J. Bright, M. Y. Lucero, A. L. Hiddessen, T. C. Legler, T. K. Kitano, M. R. Hodel, J. F. Petersen, P. W. Wyatt, E. R. Steenblock, P. H. Shah, L. J. Bousse, C. B. Troup, J. C. Mellen, D. K. Wittmann, N. G. Erndt, T. H. Cauley, R. T. Koehler, A. P. So, S. Dube, K. A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D. P. Stumbo, S. P. Hodges, S. Romine, F. P. Milanovich, H. E. White, J. F. Regan, G. A. Karlin-Neumann, C. M. Hindson, S. Saxonov, & B. W. Colston, 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry American Chemical Society* 83: 8604–8610.
- Hoshino, T., & Inagaki, F. (2012). Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. In *Systematic and Applied Microbiology* (Vol. 35, Issue 6, pp. 390–395). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.06.006>
- Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., Hellemans, J., Kubista, M., Mueller, R. D., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T., & Bustin, S. A. (2013). The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. In *Clinical Chemistry* (Vol. 59, Issue 6, pp. 892–902). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375>
- Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, T. P., Sado, T., Mabuchi, K., Takeshima, H., Miya, M., & Nishida, M. (2013). MitoFish and MitoAnnotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2531–2540. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst141>
- Jane, S. F., T. M. Wilcox, K. S. Mckelvey, M. K. Young, M. K. Schwartz, W. H. Lowe, B. H. Letcher & A. R. Whiteley, 2015. Distance, flow and PCR inhibition: EDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources* 15: 216–227.
- Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019). Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution*, 9(3), 1135–1146. <https://doi.org/10.1002/ece3.4802>
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., & Crowder, L. B. (2014). Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS One*, 9(1), e86175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086175>
- Kiselinova, M., Pasternak, A. O., De Spiegelaere, W., Vogelaers, D., Berkhout, B., & Vandekerckhove, L. (2014). Comparison of Droplet Digital PCR and Seminested Real-Time PCR for Quantification of Cell-Associated HIV-1 RNA. In P. R. Harrigan (Ed.), *PLoS ONE* (Vol. 9, Issue 1, p. e85999). Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085999>
- Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. (2016). Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 16(6), 1401–1414. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12522>
- Lafferty, K. D., Garcia-Vedrenne, A. E., McLaughlin, J. P., Childress, J. N., Morse, M. F., & Jerde, C. L. (2020). At Palmyra Atoll, the fish-community environmental DNA signal changes across habitats but not with tides. *Journal of Fish Biology*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfb.14403>
- Leese, F., A. Bouchez, K. Abarenkov, F. Altermatt, Á. Borja, K. Bruce, T. Ekrem, F. Čiampor, Z. Čiamporová-Zaťovičová, F. O. Costa, S. Duarte, V. Elbrecht, D. Fontaneto, A. Franc, M. F. Geiger, D. Hering, M. Kahlert, B. Kalamujić Stroil, M. Kelly, E. Keskin, I. Liska, P. Mergen, K. Meissner, J. Pawlowski, L. Penev, Y. Reyjol, A. Rotter, D. Steinke, B. van der Wal, S. Vitecek, J. Zimmermann & A. M. Weigand, 2018. Why we need sustainable networks bridging countries, disciplines, cultures and generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: a perspective

- derived from the DNAqua-Net COST action. *Advances in Ecological Research* 58: 63–99.
- Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J. T., & Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: Application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10, 34. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34>
- Logan, J., J. M. J. Logan, K. J. Edwards, & N. A. Saunders, 2009. *Real-time PCR: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press, <https://books.google.at/books?id=YxGKpOg8TuQC>.
- Lyons, J., Rypel, A. L., Rasmussen, P. W., Burzynski, T. E., Eggold, B. T., Myers, J. T., Paoli, T. J., & McIntyre, P. B. (2015). Trends in the Reproductive Phenology of two Great Lakes Fishes. In *Transactions of the American Fisheries Society* (Vol. 144, Issue 6, pp. 1263–1274). Wiley. <https://doi.org/10.1080/00028487.2015.1082502>.
- Maruyama, Atsushi, Keisuke Nakamura, Hiroki Yamanaka, Michio Kondoh, et Toshifumi Minamoto. 2014. « The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish ». Édité par Matthias Stöck. *PLoS ONE* 9 (12): e114639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114639>.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., & Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- Murakami, H., Yoon, S., Kasai, A., Minamoto, T., Yamamoto, S., Sakata, M. K., Horiuchi, T., Sawada, H., Kondoh, M., Yamashita, Y., & Masuda, R. (2019). Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries Science*, 85(2), 327–337. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1282-6>
- Nathan, L. M., Simmons, M., Wegleitner, B. J., Jerde, C. L., & Mahon, A. R. (2014). Quantifying Environmental DNA Signals for Aquatic Invasive Species Across Multiple Detection Platforms. In *Environmental Science & Technology* (Vol. 48, Issue 21, pp. 12800–12806). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/es5034052>
- O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciuffo, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., ... Pruitt, K. D. (2015). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 44, Issue D1, pp. D733–D745). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Pawlowski, J., L. Apothéoz-Perret-Gentil & F. Altermatt, 2020. Environmental DNA: What’s behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology* 29: 4258–4264.
- Pawlowski, J., M. Kelly-Quinn, F. Altermatt, L. Apothéoz-Perret-Gentil, P. Beja, A. Boggero, A. Borja, A. Bouchez, T. Cordier, I. Domaizon, M. J. Feio, A. F. Filipe, R. Fornaroli, W. Graf, J. Herder, B. van der Hoorn, J. Iwan Jones, M. Sagova-Mareckova, C. Moritz, J. Barquín, J. J. Piggott, M. Pinna, F. Rimet, B. Rinkevich, C. Sousa-Santos, V. Specchia, R. Trobajo, V. Vasselon, S. Vitecek, J. Zimmerman, A. Weigand, F. Leese & M. Kahlert, 2018. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 637–638: 1295–1310.
- 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: 1–13.
- Ruppert, K. M., R. J. Kline & M. S. Rahman, 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17: 1–29.
- Sales, N., O. Wangensteen, D. Carvalho, K. Deiner, K. Præbel, I. Coscia, A. D. Mcdevitt & S. Mariani, 2021. Space-time dynamics in monitoring neotropical fish communities using eDNA metabarcoding. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142096>.
- Sanders, R., Huggett, J. F., Bushell, C. A., Cowen, S., Scott, D. J., & Foy, C. A. (2011). Evaluation of Digital PCR for Absolute DNA Quantification. In *Analytical Chemistry* (Vol. 83, Issue 17, pp. 6474–6484). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/ac103230c>
- Sato, Y., Miya, M., Fukunaga, T., Sado, T., & Iwasaki, W. (2018). MitoFish and MiFish pipeline: A mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1553–1555. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy074>
- Sayers, E. W., Agarwala, R., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Clark, K., Connor, R., Fiorini, N., Funk, K., Hefferon, T., Holmes, J. B., Kim, S., Kimchi, A., Kitts, P. A., Lathrop, S., Lu, Z., Madden, T. L., Marchler-Bauer, A., Phan, L., ... Ostell, J. (2019). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D23–D28. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1069>
- Seymour, M., I. Durance, B. J. Cosby, E. Ransom-Jones, K. Deiner, S. J. Ormerod, J. K. Colbourne, G. Wilgar, G. R. Carvalho, M. de Bruyn, F. Edwards, B. A. Emmett, H. M. Bik & S. Creer, 2018. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology* Springer, US 1: 1–8.

- Shaw, J. L. A., L. Weyrich & A. Cooper, 2017. Using environmental (e)DNA sequencing for aquatic biodiversity surveys: a beginner's guide. *Marine and Freshwater Research* 68: 20–33.
- Simpfendorfer, C. A., Kyne, P. M., Noble, T. H., Goldsbury, J., Basiita, R. K., Lindsay, R., Shields, A., Perry, C., & Jerry, D. R. (2016). Environmental DNA detects critically endangered largemouth sawfish in the wild. *Endangered Species Research*, 30, 109–116. <https://doi.org/10.3354/esr00731>
- Stat, M., John, J., DiBattista, J. D., Newman, S. J., Bunce, M., & Harvey, E. S. (2019). Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity. *Conservation Biology*, 33(1), 196–205. <https://doi.org/10.1111/cobi.13183>
- Stewart, T. R., Mäkinen, M., Goulon, C., Guillard, J., Marjomäki, T. J., Lasne, E., Karjalainen, J., & Stockwell, J. D. (2021). Influence of warming temperatures on coregonine embryogenesis within and among species. In *Hydrobiologia* (Vol. 848, Issue 18, pp. 4363–4385). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04648-0>
- Stoeckle, B. C., Beggel, S., Cerwenka, A. F., Motivans, E., Kuehn, R., & Geist, J. (2017). A systematic approach to evaluate the influence of environmental conditions on eDNA detection success in aquatic ecosystems. *PLoS One*, 12(12), e0189119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189119>
- Taberlet, P., E. Coissac, M. Hajibabaei, & L. H. Rieseberg, 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 1789–1793
- Thomsen, P. F., Møller, P. R., Sigsgaard, E. E., Knudsen, S. W., Jørgensen, O. A., & Willerslev, E. (2016). Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS One*, 11(11), e0165252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165252>
- Thomsen, P. F. & E. Willerslev, 2015. Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183: 4–18.
- Tsuji, Satsuki, Hiroaki Murakami, et Reiji Masuda. 2022. « Analysis of the Persistence and Particle Size Distributional Shift of Sperm-Derived Environmental DNA to Monitor Jack Mackerel Spawning Activity ». *Environmental Science & Technology* 56 (15): 10754–63. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01904>.
- Turner, C. R., K. L. Uy & R. C. Everhart, 2015. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation* 183: 93–102.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 40, Issue 15, pp. e115–e115). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vautier, M., Chardon, C., & Domaizon, I. (2020). Fish eDNA: DNA extraction from water samples filtered through Sterivex filter unit and preserved in buffer v1. ZappyLab, Inc. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bfk8jkwz>
- Vautier, M., Chardon, C., & Domaizon, I. (2021). Fish eDNA: water sampling and filtration through Sterivex filter unit v1. ZappyLab, Inc. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.br5rm856>
- Vautier, M., Chardon, C., Goulon, C., Guillard, J., & Domaizon, I. (2023). A quantitative eDNA-based approach to monitor fish spawning in lakes: Application to European perch and whitefish. In *Fisheries Research* (Vol. 264, p. 106708). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2023.106708>
- Wangensteen, O. S., & Turon, X. (2017). Metabarcoding techniques for assessing biodiversity of marine animal forests. In S. Rossi, L. Bramanti, A. Gori, & C. Orejas (Eds.), *Marine animal forests: The ecology of benthic biodiversity hotspots* (pp. 445–473). Springer International Publishing.
- Wilcox, T. M., K. S. McKelvey, M. K. Young, A. J. Sepulveda, B. B. Shepard, S. F. Jane, A. R. Whiteley, W. H. Lowe & M. K. Schwartz, 2016. Understanding environmental DNA detection probabilities: a case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation* 194: 209–216.
- Wood, S. A., L. Biessy, J. L. Latchford, A. Zaiko, U. von Ammon, F. Audrezet, M. E. Cristescu & X. Pochon, 2020. Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.13531>.
- Wood, SA, Pochon, X, Laroche, O, von Ammon, U, Adamson, J, Zaiko, A. A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and metabarcoding for species-specific detection in environmental DNA. *Mol Ecol Resour.* (2019); 19: 1407– 1419. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13055>
- Wu, L., Wu, Q., Inagawa, T., Okitsu, J., Sakamoto, S., & Minamoto, T. (2023). Estimating the spawning activity of fish species using nuclear and mitochondrial environmental DNA concentrations and their ratios. *Freshwater Biology*, 68, 103– 114. <https://doi.org/10.1111/fwb.14012>
- Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K. et al. (2016) Environmental DNA as a 'Snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, sea of Japan. *PLoS ONE*, 11, e0149786.

Autre références bibliographiques

- Azzurro, E., Pais, A., Consoli, P., Andaloro, F., 2007. Evaluating day–night changes in shallow Mediterranean rocky reef fish assemblages by visual census. *Mar. Biol.* 151, 2245–2253. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0661-9>
- Brosse, S., Grossman, G.D., Lek, S., 2007. Fish assemblage patterns in the littoral zone of a European reservoir.

- Freshw. Biol. 52, 448–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01704.x>
- Brosse, S., Laffaille, P., Gabas, S., Lek, S., 2001. Is scuba sampling a relevant method to study fish microhabitat in lakes? Examples and comparisons for three European species. *Ecol. Freshw. Fish* 10, 138–146.
- Charlebois P., Marsden J. E., Goettel R. G., Wolfe R. K., Jude D. J. et Rudnika S., 1997. The Round Goby, *Neogobius melanostomus* (Pallas), a Review of European and North American Literature. Zion, IL : Illinois-Indiana Sea Grant Program and Illinois Natural History Survey.
- Galafassi, S., Sala, P., Volta, P., 2019. Shoreline fish distribution in Italian lakes assessed by electrofishing. *Freshw. Metadata J.* 1–5. <https://doi.org/10.15504/fmj.2019.42>
- Halford, A.R., Thompson, A.A., 1994. Visual census surveys of reef fish. Australian Institute of Marine Science Townsville.
- Houston, B. E., Rooke, A. C., Brownscombe, J. W. & Fox, M. G. Overwinter survival, energy storage and reproductive allocation in the invasive round goby (*Neogobius melanostomus*) from a river system. *Ecology of Freshwater Fish* 23, 224–233 (2014).
- Keith P., Poulet N., Denys G., Changeux T., Feuteun E. & Persat H. (coords.), 2020. – Les poissons d'eau douce de France. 2ème édition. Biotope Editions Mèze ; Museum national d'Histoire naturelle, Paris (collection Inventaires et biodiversité), 704 p.
- Kornis M.S., Mercado-Silva N. et Vander Zanden M.J., 2012. Twenty years of invasion: a review of round goby *Neogobius melanostomus* biology, spread and ecological implications. *J. Fish Biol.* 80, 235-285.
- Kornis, M. S., Weidel, B. C. & Vander Zanden, M. J. Divergent life histories of invasive round gobies (*Neogobius melanostomus*) in Lake Michigan and its tributaries. *Ecol Freshw Fish* 26, 563–574 (2017).
- Lapointe, N.W.R., Corkum, L.D., Mandrak, N.E., 2006. A Comparison of Methods for Sampling Fish Diversity in Shallow Offshore Waters of Large Rivers. *North Am. J. Fish. Manag.* 26, 503–513. <https://doi.org/10.1577/M05-091.1>
- Manne S., Poulet N., et Dembski S., 2013. Colonisation of the Rhine basin by non-native gobiids: an update of the situation in France. *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.*, 411(02), 1-17.
- Manne S., 2014. Réseau de Contrôle de Surveillance (RCS) – Synthèse des données piscicoles « cours d'eau » - Bassin Rhin-Meuse – Période 2007-2012 – Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques, 38 p + annexes.
- Manne S., 2017. Les gobies d'origine Ponto-Caspienne en France : détermination, biologieécologie, répartition, expansion, impact écologique et éléments de gestion – Synthèse des connaissances 10 ans après les premières observations dans les rivières du nord-est de la France, 70 p
- Meunier B., Yavno S., Ahmed S. et Corkum L. D., 2009. First documentation of spawning and nest guarding in the laboratory by the invasive fish, the round goby (*Neogobius melanostomus*). *Journal of Great Lakes Research* 35, 608-312.
- Nagelkerken, I., Van der Velde, G., Gorissen, M.W., Meijer, G.J., Van't Hof, T., Den Hartog, C., 2000. Importance of mangroves, seagrass beds and the shallow coral reef as a nursery for important coral reef fishes, using a visual census technique. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51, 31–44.
- Plichard, L., Capra, H., Mons, R., Pella, H., Lamouroux, N., 2017. Comparing electrofishing and snorkelling for characterizing fish assemblages over time and space. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 74, 75–86.
- Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civade, R., Jean, P., Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H., Dejean, T., 2018. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Sci. Rep.* 8, 10361. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>
- Tomanova, S., Tedesco, P.A., Roset, N., Berrebi dit Thomas, R., 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. <https://doi.org/10.1111/fme.12045>

IX. Annexes

Tableau S1: Données ADNe obtenues pour tous les échantillons issus des quatre plan d'eau et en ciblant les deux espèces cibles, le gobie à tache noire (GOBIE À TACHE NOIRE) et la perche Commune (PER). SPO04 : Serre-Ponçon, BRU0' : Brunet, ESP04 : Esparron et SCR83 : Sainte Croix.

Nom échantillon	Concentration ADNe_GOBIE À TACHE NOIRE	Concentration ADNe_PER (copie/L d'eau filtré)
-----------------	---	--

	(copie/L d'eau filtré)	
SPOO4-Reallon 1	0,0	0,0
SPOO4-Savine 2	0,0	30,9
SPOO4-St Michel 3	0,0	196,7
SPOO4-Chantel. 4	0,0	37,4
SPOO4-Témoin terrain	0,0	0,0
SPOO4-St Michel 1	0,0	65,8
SPOO4-Ubbaye 2	0,0	12,3
SPOO4-Chantel.3	0,0	425,4
SPOO4-Reallon 4	0,0	271,0
SPOO4-Savine 5	0,0	212,3
SPOO4-Témoin terrain	0,0	0,0
BRUO4-Prise d'eau 1	72,1	144,2
BRUO4-Rive Sud 2	132,0	88,0
BRUO4-Rive Ouest 3	868,4	578,8
BRUO4-Témoin terrain	0,0	17,1
ESPO4-Barrage 1	0,0	43,9
ESPO4-Prise d'eau 2	0,0	9,4
ESPO4-Gorge 3	0,0	0,0
ESPO4-Quinson 4	9,9	129,0
ESPO4-MAE Esp.5	15,5	15,5
ESPO4-Témoin terrain	0,0	0,0
SCR83-Pont Gal 1	85,5	550,6
SCR83-Bauduen 3	74,5	3203,7
SCR83-Barrage 4	101,8	471,0
SCR83-Croix 5	159,8	689,3
SCR83-Témoin terrain	0,0	0,0

Tableau S2: Données de pêche électrique, observations sub-aquatiques et ADNe pour la gravière de Brunet.

Gravière de Brunet			
Site	Pêche élec	Obs sub-aqua	ADNe
Prise d'eau	1	n/a	72,08
Rive sud	5	n/a	132,00
rive Ouest	2	n/a	868,38

Tableau S3: Données de pêche électrique, observations sub-aquatiques et ADNe pour le lac de Ste Croix.

Ste Croix			
Site	Pêche élec	Obs sub-aqua	ADNe
Pont Galeta	n/a	0	85,54
Bauduen	0	20	74,49
Barrage	n/a	5	101,76

St Croix	n/a	3	159,80
----------	-----	---	--------

Tableau S4: Données de pêche électrique, observations sub-aquatiques et ADNe pour le lac d'Esparron.

Esparron			
Site	Pêche élec	Obs sub-aqua	ADNe
Barrage	0	0	0
Prise d'eau	0	0	0
Gorge	0	0	0
Quinson	1	0	9,92
MAE esparron	0	0	15,54

Tableau S5: Données de pêche électrique, observations sub-aquatiques et ADNe pour le lac de Quinson.

Quinson			
Site	Pêche élec	Obs sub-aqua	ADNe
Montpezat	17	50	n/a
Aertignosc	30	n/a	n/a

Tableau S6: Données de pêche électrique, observations sub-aquatiques et ADNe pour le lac de Serre-Ponçon.

Serre-Ponçon			
Site	Pêche élec	Obs sub-aqua	ADNe
Reallon sept	0	0	0
Savine sept	0	0	0
St Michel sept	0	0	0
Chanteloube sept	0	0	0
St Michel juil	0	0	0
Saint Pierre juil	0	0	0
Chanteloube juil	0	0	0
Reallon juil	0	0	0
Savines juil	0	0	0