



Projet de Fin d'Etudes (PFE) 2019 - 2020

**L'ADN environnemental
dans les sédiments aquatiques**

Sous la direction de Stéphane Rodrigues

Amaury Rabouan

**L'ADN environnemental
dans les sédiments aquatiques :
Elaboration d'un protocole
applicable à la Loire**

Stéphane Rodrigues

Amaury Rabouan

2019 - 2020

AVERTISSEMENT

Cette recherche a fait appel à des lectures, enquêtes et interviews. Tout emprunt à des contenus d'interviews, des écrits autres que strictement personnel, toute reproduction et citation, font systématiquement l'objet d'un référencement.

L'auteur (les auteurs) de cette recherche a (ont) signé une attestation sur l'honneur de non plagiat.

Formation par la recherche, Projet de Fin d'Etudes en génie de l'aménagement et de l'environnement

La formation au génie de l'aménagement et de l'environnement, assurée par le département aménagement et environnement de l'Ecole Polytechnique de l'Université de Tours, associe dans le champ de l'urbanisme, de l'aménagement des espaces fortement à faiblement anthropisés, l'acquisition de connaissances fondamentales, l'acquisition de techniques et de savoir-faire, la formation à la pratique professionnelle et la formation par la recherche. Cette dernière ne vise pas à former les seuls futurs élèves désireux de prolonger leur formation par les études doctorales, mais tout en ouvrant à cette voie, elle vise tout d'abord à favoriser la capacité des futurs ingénieurs à :

- Accroître leurs compétences en matière de pratique professionnelle par la mobilisation de connaissances et de techniques, dont les fondements et contenus ont été explorés le plus finement possible afin d'en assurer une bonne maîtrise intellectuelle et pratique,
- Accroître la capacité des ingénieurs en génie de l'aménagement et de l'environnement à innover tant en matière de méthodes que d'outils, mobilisables pour affronter et résoudre les problèmes complexes posés par l'organisation et la gestion des espaces.

La formation par la recherche inclut un exercice individuel de recherche, le projet de fin d'études (P.F.E.), situé en dernière année de formation des élèves ingénieurs. Cet exercice correspond à un stage d'une durée minimum de trois mois, en laboratoire de recherche, principalement au sein de l'équipe Dynamiques et Actions Territoriales et Environnementales de l'UMR 7324 CITERES à laquelle appartiennent les enseignants-chercheurs du département aménagement.

Le travail de recherche, dont l'objectif de base est d'acquérir une compétence méthodologique en matière de recherche, doit répondre à l'un des deux grands objectifs :

- Développer toute ou partie d'une méthode ou d'un outil nouveau permettant le traitement innovant d'un problème d'aménagement
- Approfondir les connaissances de base pour mieux affronter une question complexe en matière d'aménagement.

Afin de valoriser ce travail de recherche nous avons décidé de mettre en ligne sur la base du Système Universitaire de Documentation (SUDOC), les mémoires à partir de la mention bien.

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier Madame Catherine Boisneau qui m'a guidé dans la recherche d'articles concernant l'ADNe, et Monsieur Stéphane Braud qui m'a fourni certaines données SIG de la DREAL Centre-Val de Loire.

Enfin, je remercie grandement Monsieur Stéphane Rodrigues qui m'a encadré durant toute la réalisation de ce projet de fin d'étude. Il m'a notamment permis de mieux comprendre le fonctionnement d'un projet de recherche, de continuer à approfondir mes capacités de raisonnement, d'analyse et de synthèse. En ajoutant à cela son total investissement en faveur du bon fonctionnement de la filière Ingénierie des Milieux Aquatiques, et par conséquent de notre réussite, je tiens à le remercier une nouvelle fois.

SOMMAIRE

Introduction.....	8
Partie I : L'ADN environnemental.....	9
I.1. Définition	9
I.2. Enjeux	9
Partie II : Etat de l'art.....	11
II.1. Un sujet de recherche récent.....	11
II.2. Méthodes existantes	12
Partie III : Application sur la Loire.....	14
III.1. Déroulement de l'étude	14
III.2. Echantillonnage	14
III.2.1 Méthodes de prélèvement.....	14
III.2.2 Description pédologique	15
III.2.3 Sites de prélèvement.....	16
III.3. Analyse des échantillons	20
III.3.1 Extraction de l'ADN	20
III.3.2 Réplication et identification de l'ADN	20
III.3.1 Datation des échantillons.....	20
III.4. Résultats et discussion	21
III.4.1 Présentation des résultats.....	21
III.4.2 Chiffrage de l'étude	21
III.4.3 Discussion	23
Conclusion	24
Bibliographie.....	25

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Répartition des études sur l'ADNe par type de milieux (Sources : Google Trends/Scholar).	11
Figure 2 : Processus d'élaboration et de mise en œuvre de l'étude (Source : Goldberg et al. 2016 , modifié)	14
Figure 3 : Carottier Beeker (Source : SDEC-France).....	15
Figure 4 : Coupe de sol typique d'une île ligérienne (Source : Wintenberger et al. 2015, modifié)	15
Figure 5 : Localisation des sites d'échantillonnage sur le bassin versant de la Loire	16
Figure 6 : Photographies aériennes des sites d'échantillonnage (Source : Google Maps)	18
Figure 7 : Parts du chiffrage de l'étude ADNe sur le bassin de la Loire.....	21
Tableau 1 : Etude comparative des forces et faiblesses des méthodes présentées.....	13
Tableau 2 : Caractéristiques des sites d'échantillonnage	17
Tableau 3 : Chiffrage détaillé de l'étude ADNe sur le bassin versant de la Loire.....	22

Introduction

L'acide désoxyribonucléique environnemental (ADNe) se définit comme un fragment d'ADN fixé sur un support minéral. Son extraction permet d'identifier les organismes présents sur un territoire. Les méthodes de prélèvement et de séparation de l'ADNe de son support étant encore relativement peu développées, leur perfectionnement représente un enjeu majeur dans la gestion des écosystèmes. D'ores et déjà utilisé pour identifier des espèces disparues il y a plusieurs milliers d'années comme le mammoth (Pedersen et al. 2015), l'ADNe pourrait s'avérer être un outil précieux dans la datation de l'arrivée d'espèces exotiques envahissantes ou la disparition d'espèces autochtones.

Il s'agit d'un domaine encore peu exploité d'après la bibliographie. La plupart des études porte sur l'extraction de l'ADNe à partir du sol. Les méthodes appliquées en eaux douces, à partir des sédiments en particulier, sont très peu présentes dans la littérature. Les sédiments ont été utilisés pour dater les différentes sources de contamination chimique de la Loire (Grosbois et al. 2012). Leur capacité à capter des molécules organiques pourrait ainsi permettre de stocker un patrimoine génétique important sous forme d'ADNe (Pietramellara et al. 2009).

Ces méthodes de détection ont un fort potentiel d'évolution dans le domaine des inventaires de la biodiversité et de la détection des espèces envahissantes, menacées ou rares (Miaud et al. 2012). L'objectif de cette étude est donc de répertorier les travaux concernant l'ADNe dans les sédiments aquatiques, notamment fluviaux, puis d'en extraire une méthode applicable à la Loire afin d'élaborer un historique de ses peuplements, anciens ou récents.

Partie I : L'ADN environnemental

I.1. Définition

L'ADN dit « environnemental » (ADNe) est composé de fragments plus ou moins grands d'une molécule d'ADN d'un être vivant stockés sur des particules minérales (eau, sédiments...). La concentration en ADNe sur Terre serait dix fois supérieure à celle de la biomasse vivante (Miaud et al. 2012). Celui-ci peut se fixer dans les glaciers, dans le sol, dans les eaux douces ou salées, sur les sédiments marins, lacustres et fluviaux. L'ADNe peut provenir de fragments de peau, de fœtus, de coquille, de poil, d'exuvie (mue d'insecte), de plume, de selle, de salive, de régurgitation ou encore de pollen (Pedersen et al. 2015).

Les fragments d'ADN d'environ 100 bp (« *barpairs* » en anglais) peuvent être conservés jusqu'à dix mille ans dans les régions tempérées et cent mille ans à haute altitude. Cette conservation a permis d'identifier l'aire de répartition du loup à la frontière Franco-suisse (Miaud et al. 2012). Sous forme « environnementale », la conservation de l'ADN est largement multipliée. Celle-ci se caractérise par trois domaines. Tout d'abord son origine, car sa persistance dans le milieu va dépendre de la nature du fragment source. Ensuite, l'état physique de l'individu au moment du captage de l'ADN extracellulaire par une particule minérale va influencer la résistance de celui-ci dans le temps. Enfin, sa destinée va également faire varier la conservation, en qualité et en longévité, de l'ADNe. En effet, les différents supports minéraux n'ont pas la même capacité de conservation. Cette dernière dépend de la composition et de l'environnement du support.

Ces trois domaines vont influencer sur la possibilité de détection de l'ADNe. Trois caractéristiques de l'ADNe déterminent cette dernière. Elle dépend de la qualité de fixation de l'ADNe sur le support minéral qui va influencer la qualité de l'extraction lors du prélèvement. En plus de la période de temps qui va s'écouler entre la fixation et le prélèvement, les déplacements de l'ADNe vont aussi déterminer la détection puisque la migration des sédiments, par exemple, peut diminuer la qualité de l'échantillon (Turner et al. 2015).

I.2. Enjeux

La détection de l'ADNe et son extraction sont déjà largement utilisées pour les virus, les champignons, les bactéries et protistes. Cela a notamment permis de mettre en évidence la présence d'espèces exotiques dans les ports et les eaux de ballast. Une des premières utilisations des méthodes d'identification de vertébrés via l'ADNe a été réalisée en France pour élaborer un inventaire des habitats abritant la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*) en 2007. L'étude a également permis de comparer cette méthode aux méthodes classiques d'inventaire (présence d'œufs, observations à vue, comptages à l'écoute etc...). Un inventaire classique avait permis de trouver sept sites où se trouvait l'amphibien, alors que l'inventaire par extraction d'ADNe dans l'eau et le sol a identifié trente-huit points. L'étude a également montré que la méthode d'inventaire par ADNe ne peut être utilisée pour valider ou non l'efficacité d'une action d'extermination à cause de l'importante durée de conservation de l'ADNe au sein d'un habitat (Miaud et al. 2012).

En effet, la longévité de l'ADNe dans l'environnement est largement supérieure à celle de l'ADN pur. Il en est de même pour sa concentration. Cette caractéristique présente un intérêt notable pour dater l'apparition ou la disparition d'une espèce (Turner et al. 2015).

L'ADN environnemental pourrait donc devenir un outil précieux pour la gestion des écosystèmes aquatiques et notamment pour la biologie de conservation (Turner et al. 2015). En effet, l'ADNe offrirait un meilleur taux de détection des espèces présentes ou anciennement présentes (Miaud et al. 2012). Cela est en partie dû au taux de concentration dans l'environnement plus élevé que pour l'ADN en général, et en particulier dans les sédiments fluviaux. Une étude comparative a été réalisée par Turner et al. (2015). L'hypothèse de départ était donc que la concentration en ADNe est plus élevée dans les sédiments aquatiques que dans l'eau. Suite à l'introduction puis suppression de carpes asiatiques (ADN facilement identifiable), l'étude a montré que l'ADNe était entre huit et mille fois plus concentré par gramme de sédiments que par millilitre d'eau. De plus, la persistance de l'ADNe était de plus de 132 jours. Il s'agit d'une durée de persistance cinq fois supérieure à celle de l'ADNe dans les molécules d'eau (Turner et al. 2015).

La surveillance des hydrosystèmes est donc un intérêt majeur du développement des méthodes de détection via l'ADNe. Elles pourraient permettre de dater l'apparition d'espèces exotiques, comme du Silure glane (*Silurus glanis*) ou de la Jussie rampante (*Ludwigia peploides*) dans la Loire, ou encore la disparition de certaines espèces indigènes comme le Vison d'Europe (*Mustela lutreola*), mais également de déterminer les vecteurs ayant conduit à leur arrivée. De plus, il serait aussi possible de déterminer les conditions environnementales ayant permis leur acclimatation à ce moment-là.

Il est maintenant nécessaire d'accroître la précision d'identification des espèces et de leur abondance. De plus, par rapport aux études ADN classiques, les méthodes ADNe pourraient permettre de réduire les coûts financiers et temporels des études de par la main d'œuvre, la prospection de terrain, les équipements nécessaires, la sécurité et la manipulation des organismes (Pedersen et al. 2015). Pour rendre viable l'utilisation des méthodes de détection de l'ADNe dans les sédiments fluviaux, plusieurs points sont à développer : il est nécessaire d'élaborer une stratégie d'échantillonnage adaptée à l'analyse de l'ADNe. La méthode de prélèvement et la conservation des échantillons sont des points à définir en conséquence. Les contrôles de qualité d'échantillons sont également à améliorer afin de diminuer la part de faux positifs ou faux négatifs, encore très présents dans ce type d'analyse (Miaud et al. 2012). La purification de l'acide nucléique extrait des sédiments peut aussi être une étape limitante pour obtenir un ADN de qualité suffisante, nécessaire pour la mise en place d'un protocole de réplique et amplification (Jackson et al. 1997).

Partie II : Etat de l'art

II.1. Un sujet de recherche récent

Les articles recueillis dans le cadre de ce travail sont dans l'ensemble très récents (fin du XX^{ème} ; début du XXI^{ème} siècle). Beaucoup évoquent l'ADNe sans pour autant développer son utilité. Sur l'ensemble des travaux, la moitié concerne les milieux marins. Les études concernant les eaux continentales ou les sols complètent la moitié restante. Parmi les articles sur l'ADNe dans les eaux continentales, près de deux tiers concernent les milieux lacustres. L'autre tiers concerne les milieux fluviaux. Enfin, parmi les articles relatifs aux milieux fluviaux, environ un article sur dix concerne le sujet recherché : l'ADNe dans les sédiments fluviaux. Les neuf autres portent sur l'ADNe dans l'eau (Figure 1). Cette revue partiellement complète des articles existant sur le sujet montre bien qu'il est encore très récent et qu'il reste à développer.

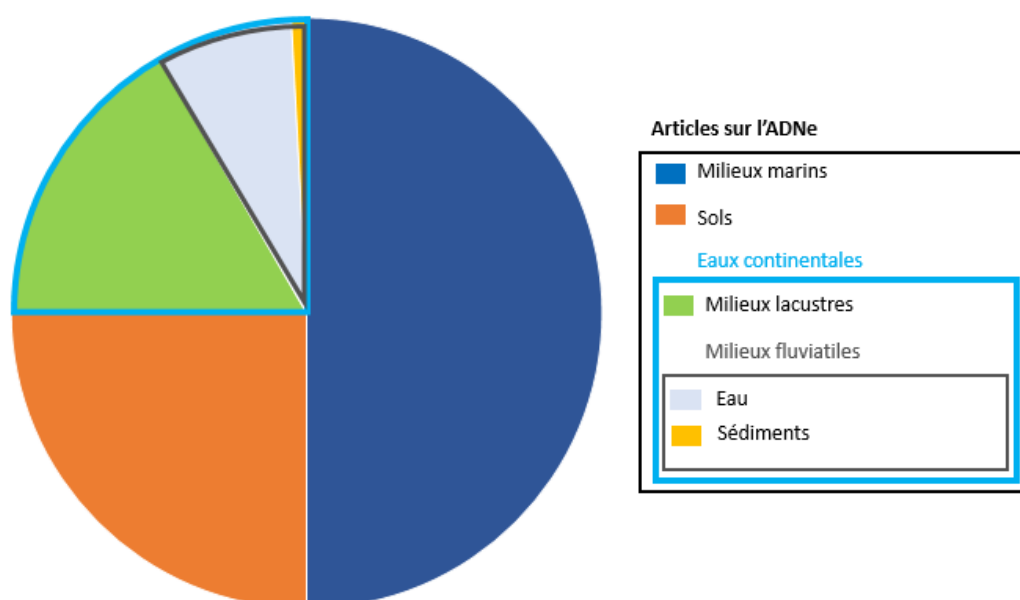


Figure 1 : Répartition des études sur l'ADNe par type de milieu (Sources : Google Trends/Scholar)

Les études en eaux douces sont peu nombreuses. L'étude de l'ADNe dans les sédiments lacustres fournit pourtant un bon indicateur biogéographique pour des espèces présentes dans et autour de l'eau comme ce fût le cas pour la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*) lors d'une des premières études effectuées grâce à l'ADNe en France (Pedersen et al. 2015). Certaines études visaient également à dresser un historique des espèces introduites ou disparues. Suite à celles-ci, les recherches ont aussi pu démontrer l'impact du changement climatique sur la zone étudiée grâce à l'évolution des communautés présentes en fonction de la température (Clarke et al. 2018).

Les méthodes utilisées pour prélever les échantillons sont relativement anciennes (Ogram et al. 1987) et concernent en majorité, le prélèvement d'échantillon de sédiments du sol (Tsai et Olson 1991). Jackson et al. 1997 ont publié une étude comparative des différentes méthodes d'extraction et en ont conclu que les méthodes utilisées ne sont parfois pas adaptées aux conditions physico-chimiques du milieu. C'est pourquoi la détection d'ADNe sur un territoire donné apparaît encore comme une méthode complémentaire plutôt qu'une alternative (Pedersen et al. 2015).

Les lacunes dans la bibliographie autour des méthodes de prélèvement et d'extraction de l'ADNe dans les sédiments fluviaux soulèvent ainsi deux questions : en quoi le développement des méthodes d'échantillonnage et d'extraction de l'ADNe présent dans les sédiments fluviaux pourrait être une opportunité dans la surveillance des hydrosystèmes ? Quel protocole pourrait donc permettre d'adapter cette méthode à un grand cours d'eau tel que la Loire ?

II.2. Méthodes existantes

Les trois méthodes de prélèvement présentées ci-dessous sont tirées de différentes études sur des milieux fluviaux ou lacustres. L'objectif est de mettre en évidence les avantages et inconvénients de chacune, ainsi que d'élaborer une méthode applicable aux sédiments de la Loire.

Prélèvement de sédiments lacustres selon Pedersen et al. 2013

- Objectif de l'étude : élaborer un historique floristique du site d'étude grâce à l'ADNe et le comparer à l'historique existant réalisé à partir des pollens et macrofossiles
- Espèces mises en évidence : Trentaine d'espèces végétales
- Sites d'étude : Lac Comarum (Groenland)
- Méthode : Deux personnes minimum sont nécessaires à la réalisation de ces prélèvements ; quatre ou cinq étant optimum. Des carottiers de Livingston modifiés ont été utilisés. Les échantillons ont immédiatement été fermés hermétiquement afin d'éviter toute contamination. En laboratoire, ils ont été coupés en deux parties à l'aide d'un fil d'acier. Une moitié a été utilisée pour la description pédologique puis stockée, l'autre pour l'analyse ADN. Des prélèvements par frottis le long de la carotte ont été effectués tous les 5 cm (sauf parties basales, tous les 1,5 – 3 cm selon la pédologie) puis stockés dans des tubes à centrifuger au congélateur.
L'ADN a été extrait à l'aide du « *PowerMax Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories)* ».

Prélèvement de sédiments lacustres et fluviaux selon Turner et al. 2015

- Objectif de l'étude : démontrer que la concentration en ADNe ainsi que sa longévité sont plus importantes dans les sédiments que dans l'eau
- Espèces mises en évidence : Carpe à grosse tête (*Hypophthalmichthys nobilis*) et Carpe argentée (*Hypophthalmichthys molitrix*)
- Sites d'étude : Etang expérimental de l'Université du Kansas (USA) et rivières Wabash (Indiana, USA), Kansas (Kansas, USA) et Wakarusa (Kansas, USA)
- Méthode : Trois carottes constituées de tubes en acier inoxydable, d'une longueur de 51 cm et de 5 cm de diamètre, ont été prélevées dans l'eau sur chaque transect (un par site). Pour chaque prélèvement, 5 ml de sédiments ont été mélangés à 10 ml de solution tampon (CTAB + antiseptique) dans un tube à centrifuger. Ces derniers ont été stockés dans la glace à -20°C pendant 10 à 120 minutes, puis à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADNe.
Chaque outil ou contenant a été soigneusement stérilisé entre chaque prélèvement.

Prélèvement de sédiments lacustres selon Alsos et al. 2018

- Objectif de l'étude : élaborer un historique floristique sur onze lacs de Norvège
- Espèces mises en évidence : 489 espèces végétales
- Sites d'étude : Onze lacs dans la partie nord de la Norvège
- Méthode : Trois échantillons (deux analysés, un stocké) par site ont été prélevés à l'aide de carottiers par gravité, composés de tube de 3 cm de diamètre et 63 cm de long. Les 8 premiers cm n'ont pas été analysés. 25 ml de sédiments, prélevés par incréments de 2 cm le long des carottes, ont été placés dans des tubes de faucon de 50 ml puis conservés gelés. Les parties supérieures et inférieures (+ ou – 2 cm) des carottes ont été analysées séparément.
Chaque outil ou contenant a été soigneusement stérilisé entre chaque prélèvement.
L'ADN a été extrait à l'aide du « *PowerMax Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories)* ».

Le tableau suivant (*Tableau 1*) compare les différents éléments de chaque étude en fonction de leur adaptabilité à une étude réalisable sur la Loire. Les études concernant les sédiments lacustres sont toutefois à prendre en considération car elles sont réalisées sur des sédiments prélevés en bordure des lacs ce qui peut être appliqué sur les rives ou les îles de la Loire. La conservation des échantillons est un atout de la méthode selon Turner et al. 2015. Néanmoins, cette étude visant simplement à détecter la présence actuelle ou ancienne d'une espèce donnée est peu adaptée à la réalisation d'un inventaire de biodiversité. Les approches de Pedersen et al. 2015 et de Alsos et al. 2018 consistant à adapter la quantité de prélèvements sur une carotte en fonction de la pédologie pourraient également être intéressantes à mettre en œuvre du fait du profil pédologique de la Loire. L'utilisation du « *PowerMax Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories)* » paraît être une solution intéressante pour extraire l'ADN du support minéral.

Tableau 1 : Etude comparative des forces et faiblesses des méthodes présentées

Méthode selon...	Forces	Faiblesses
Pedersen et al. 2013	- Description pédologique - Adaptabilité de la quantité de prélèvements sur les carottes en fonction de la pédologie - Extraction de l'ADN autonome	- Sédiments lacustres - Mise en œuvre (moyens humains)
Turner et al. 2015	- Sédiments fluviaux et lacustres - Conservation des échantillons	- Prélèvements des carottes dans l'eau - Pas adapté pour un historique des espèces anciennement présentes - Extraction de l'ADN par un prestataire extérieur
Alsos et al. 2018	- Prélèvements distincts sur les carottes pour les parties supérieures et inférieures - Extraction de l'ADN autonome	- Sédiments lacustres - Sites d'études nombreux, jeu de données très important

Partie III : Application sur la Loire

III.1. Déroulement de l'étude

L'objectif de ce projet est, à partir des études existantes, d'élaborer un protocole d'extraction et d'identification de l'ADNe applicable à un grand fleuve tel que la Loire. Une telle étude pourrait permettre de valider ou non certaines hypothèses quant à l'arrivée d'espèces exotiques comme la Jussie rampante (*Ludwigia peploides*) ou à la disparition d'espèces emblématiques telles que le Vison d'Europe (*Mustela lutreola*).

L'élaboration de cette étude s'est appuyée sur les recommandations de Goldberg et al. 2016 (Figure 2). Après avoir effectué une étude bibliographique (Partie II : Etat de l'art), le déroulement de l'étude va être présenté dans cette partie. Celle-ci contient la méthode d'échantillonnage retenue, les sites de prélèvement proposés, la conservation des échantillons, leur analyse, la présentation des résultats obtenus et les limites du projet.

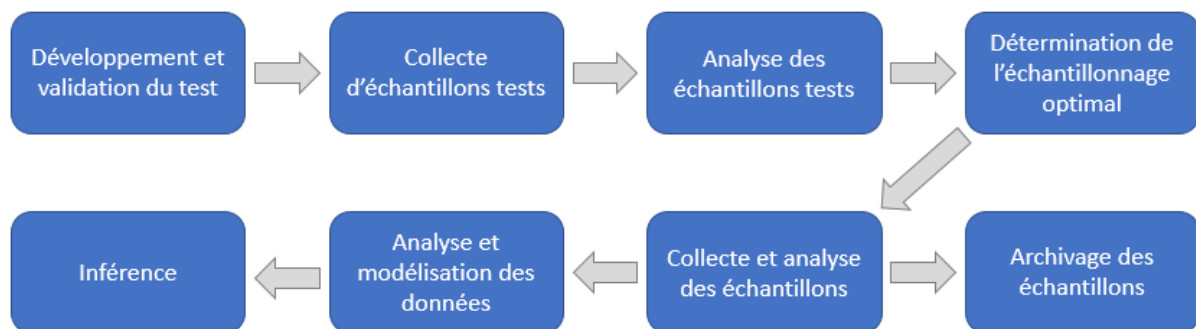


Figure 2 : Processus d'élaboration et de mise en œuvre de l'étude (Source : Goldberg et al. 2016 , modifié)

L'étude devra donc être précédée par un échantillonnage test sur l'un des sites retenus afin de valider ou non la méthode, et de l'optimiser.

III.2. Echantillonnage

III.2.1 Méthodes de prélèvement

Selon la physionomie de l'île (voir III.2.3 Sites de prélèvement), la méthode pourra être adaptée. En cas de présence d'une berge d'érosion la méthode A sera privilégiée. Sinon, la méthode B sera mise en œuvre. Quelle que soit la méthode, la période d'étiage sera privilégiée pour réaliser l'échantillonnage.

Veiller à désinfecter les équipements et outils entre chaque site.

Méthode A : prélèvements sur une berge d'érosion

- Choisir si possible, une berge d'érosion franche d'une hauteur de 3 à 4 m
- Enfoncer, perpendiculairement à la paroi, un tube PVC de 7 à 10 cm de longueur et 1 cm de diamètre intérieur
- Retirer délicatement le tube et fermer hermétiquement les 2 extrémités à l'aide d'un parafilm

- Répéter cette action à un intervalle de 1,5 à 5 cm selon la pédologie (voir [III.2.2 Description pédologique](#)) le long de toute la paroi
- Conserver les échantillons dans la glace à -20°C
- En laboratoire, diviser chaque échantillon en trois parties :
 - 1 pour analyse ADN (minimum 0,25 g)
 - 1 pour datation
 - 1 pour archivage
 Les placer dans un tube à centrifuger et y ajouter 10 ml d'une solution tampon (antiseptique + CTAB « *Cetyl trimethylammonium bromide* »)
- Conserver les échantillons à -80°C jusqu'à analyse.

Méthode B : prélèvements par carottier

- Utiliser un carottier sédimentaire à piston stationnaire pour éviter la compaction des sédiments (Adiyah et Kelderman 2014)
Un carottier de type Beeker ([Figure 3](#)) serait optimal car l'échantillon prélevé d'1 m est contenu dans un tube fermé hermétiquement
- Réaliser 3 à 4 carottes d'1m sur la même verticale
- Conserver les échantillons dans la glace à -20°C
- En laboratoire, prélever 3 échantillons (analyse ADN, datation, archivage) d'au moins 0,25 g à intervalle régulier en fonction de la pédologie (voir [III.2.2 Description pédologique](#)) le long des carottes de sédiments
- Conserver les échantillons à -80°C jusqu'à analyse.



Figure 3 : Carottier Beeker (Source : SDEC-France)

III.2.2 Description pédologique

La description pédologique (avant échantillonnage pour la méthode A, après pour la méthode B) va permettre de déterminer l'intervalle de prélèvement. En effet, la vitesse de formation des couches de sol d'une île évolue en fonction de sa hauteur (Wintenberger et al. 2015). Il apparaît donc pertinent d'adapter l'intervalle de prélèvement en fonction des couches pédologiques.

Pour la couche supérieure, composée essentiellement de sédiments fins, l'intervalle d'échantillonnage sera réduit à 1,5 cm du fait de la faible vitesse de dépôt. En deçà de cette couche, l'intervalle sera de 5 cm ([Figure 4](#)). De plus, la couche supérieure est susceptible de contenir un plus grand nombre de fragments d'ADNe du fait de leur meilleure adhérence sur les sédiments argileux que sur les sableux (Pedersen et al. 2015).

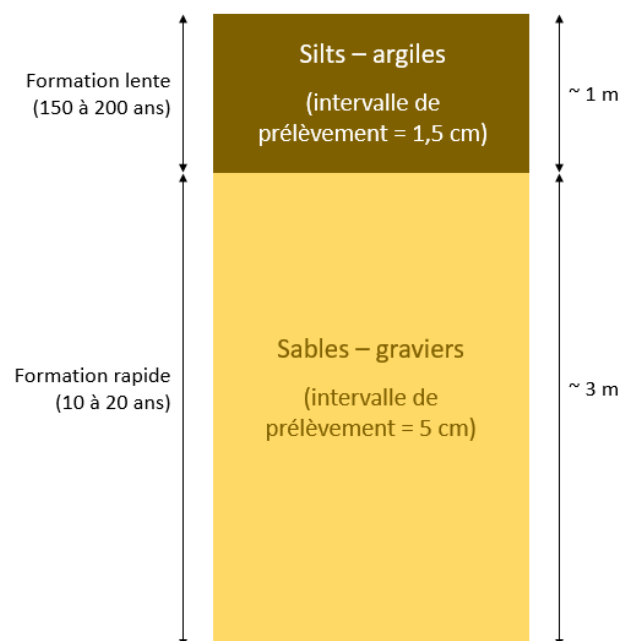


Figure 4 : Coupe de sol typique d'une île ligérienne (Source : Wintenberger et al. 2015, modifié)

III.2.3 Sites de prélèvement

Les sites de prélèvements choisis sont des îles réparties sur l'ensemble du bassin versant de la Loire (*Figure 5 ; Tableau 2*) car ce sont des lieux de dépôt de sédiments caractéristiques, et donc potentiellement d'ADNe. Elles ont été déterminées en fonction de leur maturité et de leur végétation à l'aide des cartes morphologiques et de végétation fournies par les données du SIEL de la DREAL Centre-Val de Loire. Les informations relatives aux sites d'échantillonnages comme la végétation, les hydroécorégions (niveau 1) et le climat, sont précisés dans le *Tableau 2*.

Un site de prélèvement a été placé dans le lit de la Loire en aval de chaque confluence avec un de ses principaux affluents ainsi que sur l'affluent lui-même (*Figure 6*).

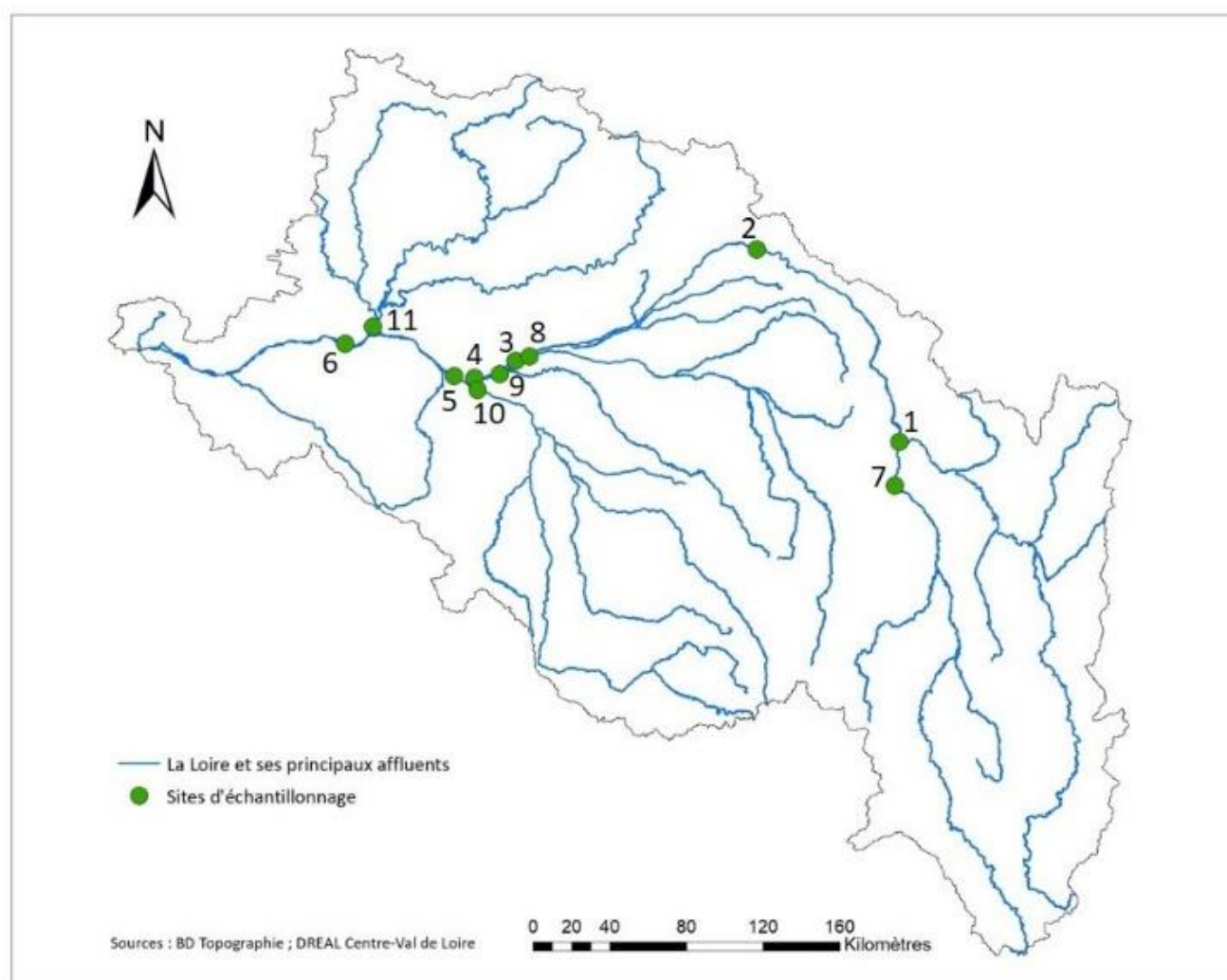


Figure 5 : Localisation des sites d'échantillonnage sur le bassin versant de la Loire

Tableau 2 : Caractéristiques des sites d'échantillonnage

ID	Dénomination	Hydro-écorégion	Commune (CP)	Végétation	Altitude (m NGF)	Température annuelle moyenne (°C)	Température estivale moyenne (°C)	Température hivernale moyenne (°C)	Pluviométrie annuelle (mm)	Coordonnées GPS (DD)	
										Longitude	Latitude
La Loire (117 881,97 km²)											
1	Iles de Marzy	Tables calcaires	Marzy (58180)	Bois tendres	170,97	10,6	18,4	2,8	757	3,067879	46,971242
2	Rue du Bois Minet	Dépôts argilo-sableux	Bou (45430)	Saulaies ; landes	97,33	10,8	18,8	3,0	641	2,073614	47,871637
3	Ile du Château	Tables calcaires	Langeais (37130)	Bois tendres	40,51	11,6	19,3	4,0	669	0,416606	47,321975
4	Grande île de Chouzé	Tables calcaires	Chouzé-sur-Loire (37140)	Bois durs ; bois tendres ; prairies	33,18	11,7	19,4	4,2	671	0,133917	47,236186
5	Ile de Souzay	Tables calcaires	Souzay-Champigny (49400)	Prairies pâturées ; bocage	29,52	11,7	19,3	4,3	672	-0,008189	47,241545
6	Ile de Montravers	Armoricaïn	Chalonnnes-sur-Loire (49290)	Prairies pâturées ; pleupleraie	14,5	11,7	19,0	4,6	667	-0,768345	47,371412
L'Allier (14 326,04 km²)											
7	Ile du Veudre	Dépressions sédimentaires	Le Veudre (03320)	Chênaie alluviale	186,21	10,8	18,7	2,9	745	3,039587	46,764850
Le Cher (13 693,27 km²)											
8	Rue Le Colombier	Tables calcaires	Villandry (37510)	Bois durs ; jussie	41,89	11,5	19,3	3,9	676	0,507630	47,345433
L'Indre (3 421,55 km²)											
9	Ile du Mêlier	Tables calcaires	Rigny-Ussé (37420)	Bois durs	33,3	11,6	19,3	4,0	669	0,309516	47,258207
La Vienne (21 121,16 km²)											
10	Ile à Seguin	Tables calcaires	Beaumont-en-Véron (37420)	Bois tendres	31,39	11,3	19,0	3,8	695	0,158146	47,179448
La Maine (22 323,99 km²)											
11	Ile Robinson	Armoricaïn	Angers (49000)	Bois durs	15,69	11,5	18,8	4,4	650	-0,578753	47,457283

Sources : Cartes morphologiques, cartes de végétation, DREAL Centre – Val de Loire, Les données du SIEL ; data.gouv.fr ; climat-data.org



1. Ile de Marzy, La Loire



2. Le Bois Minet, La Loire



3. Ile du Château, La Loire



4. Grande île de Chouzé, La Loire



5. Ile de Souzay, La Loire



6. Ile de Montravers, La Loire

Figure 6 : Photographies aériennes des sites d'échantillonnage (Source : Google Maps)



7. Ile du Veudre, L'Allier



8. Le Colombier, Le Cher



9. Ile du Mêlier, L'Indre



10. Ile à Seguin, La Vienne



11. Ile Robinson, La Maine

III.3. Analyse des échantillons

III.3.1 Extraction de l'ADN

La séparation de l'ADN et du support minéral est une étape limitante du protocole. En effet, la qualité de l'identification des brins d'ADN va en dépendre (Turner et al. 2015).

L'extraction de l'ADN pourra être sous-traitée dans un laboratoire spécialisée. L'utilisation du « *PowerMax Soil DNA Isolation Kit* » des laboratoires Mo Bio est également envisageable. Un kit valant environ 450\$, permet de réaliser l'extraction d'ADN de 10 g de sol soit 40 échantillons (*Mo Bio Laboratories*).

III.3.2 Réplication et identification de l'ADN

Les fragments d'ADNe comptent généralement moins de 150 bp (Pedersen et al. 2015). Les techniques d'identification nécessitant plus de 500 bp, l'amplification préalable par réaction en chaîne par polymérase (PCR) de l'ADN est nécessaire. Ces étapes du protocole seront sous-traitées.

III.3.1 Datation des échantillons

Afin de connaître les périodes de présence des espèces qui auront été identifiées via les analyses ADN, les échantillons de sédiments seront datés au carbone 14. Ce protocole de datation permettra notamment de déterminer l'intervalle de temps qui s'est écoulé depuis le dépôt des fragments d'ADNe à partir de mesures basées sur la radioactivité du carbone 14 contenu dans toute matière organique (CIRAM 2013). Cependant, la datation au carbone 14 présente parfois une distorsion temporelle conséquente (Briant et al. 2004). C'est pourquoi il serait également intéressant de dater les échantillons grâce à une autre technique comme la datation OSL (« *Optically Stimulated Luminescence* »).

La datation des échantillons permettra, d'une part de connaître les conditions ayant favorisé la présence d'une espèce, et d'autre part de comparer les résultats de détection via analyse ADN avec les publications relatant son apparition ou sa disparition. Par exemple, l'apparition du Silure glane (*Silurus glanis*) dans la Loire est estimée entre 1970 et 1975, suite au déversement d'individus dans la Sane morte, affluent de la Saône, en 1968. Ces derniers auraient ainsi rejoint la Loire en empruntant le canal du Centre (Valadou et al. 2007). Cependant, est-il envisageable que le silure ait atteint la Loire différemment avant 1970 ? Une autre espèce de silure a-t-elle autrefois été présente sur le bassin de la Loire comme c'est le cas sur le Rhône ? L'analyse de l'ADNe pourrait permettre de valider ou non ces hypothèses, et par conséquent d'approfondir la compréhension des procédés ayant abouti à l'acclimatation de cette espèce.

III.4. Résultats et discussion

III.4.1 Présentation des résultats

Les résultats de l'étude devront comprendre (liste non exhaustive) :

- La description pédologique de chaque site d'échantillonnage
- L'échelle temporelle (datation) des couches de sol
- Le nombre d'échantillons prélevés sur chaque site
- Le nombre d'organismes détectés par échantillons et par site
- La liste des espèces identifiées et non identifiées par échantillons et par site
- La présence actuelle ou ancienne des espèces détectées
- La ou les publications relatant la présence ou apparition ou disparition pour chaque espèce détectée

L'objectif est de mettre en évidence les apparitions ou disparitions de certaines familles d'organismes, de pouvoir dater ces événements et par conséquent, de valider ou non les informations déjà existantes dans la littérature.

III.4.2 Chiffrage de l'étude

Le [Tableau 3](#) fournit une estimation des coûts potentiels à la réalisation de l'étude en fonction des différentes options/méthodes envisagées. Deux à trois personnes sont nécessaires pour réaliser les prélèvements :

- Une ou deux personnes pour réaliser les prélèvements
- Une personne pour répertorier et conditionner les échantillons

Le maximum de prélèvements par site se situe aux alentours de 130 échantillons :

- Un prélèvement tous les 1,5 cm pour la couche supérieure (environ 1 m), soit 68 échantillons
- Un prélèvement tous les 5 cm pour la couche inférieure (maximum 3 m), soit 62 échantillons

Les coûts de réalisation sont détaillés pour chacun des 11 sites proposés. L'étude préalable sera effectuée sur le site numéro 3 pour des questions de proximité et de facilité d'accès.

Les parts du chiffrage attribuées à chaque coût sont représentées sur la [Figure 7](#).

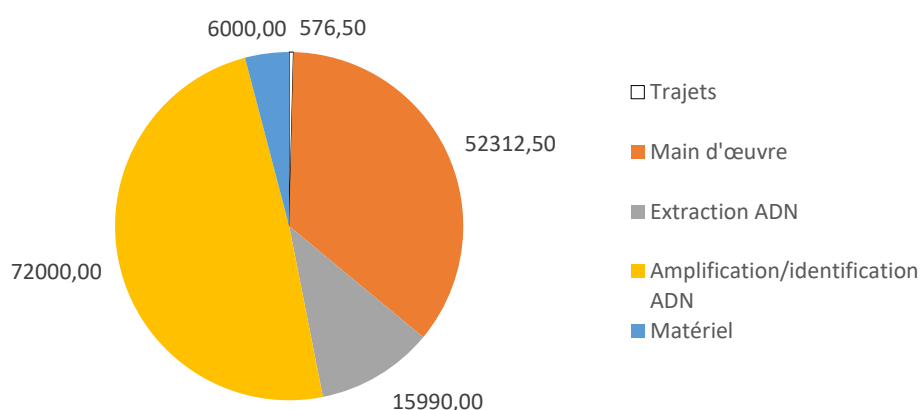


Figure 7 : Parts du chiffrage de l'étude ADNe sur le bassin de la Loire

Tableau 3 : Chiffrage détaillé de l'étude ADNe sur le bassin versant de la Loire

Sites	Trajet (km)	Coût trajet (€) ¹	Durée trajet (h)	Durée prélèvement (h)	Analyse des données (h)	Coût main d'œuvre (€) ²	Nombre échantillons	Coût extraction ADN (€) ³	Coût sous traitance (€) ⁴	Coût total par site (€)
Etude préalable (3)	28	14,00	0,5	6	16	4218,75	130	1332,50	6000,00	11565,25
1	228	114,00	3	6	16	4687,50	130	1332,50	6000,00	12134,00
2	143	71,50	1,5	6	16	4406,25	130	1332,50	6000,00	11810,25
3	28	14,00	0,5	6	16	4218,75	130	1332,50	6000,00	11565,25
4	54	27,00	0,75	6	16	4265,63	130	1332,50	6000,00	11625,13
5	65	32,50	1	6	16	4312,50	130	1332,50	6000,00	11677,50
6	150	75,00	1,75	6	16	4453,13	130	1332,50	6000,00	11860,63
7	223	111,50	2,5	6	16	4593,75	130	1332,50	6000,00	12037,75
8	14	7,00	0,5	6	16	4218,75	130	1332,50	6000,00	11558,25
9	40	20,00	0,75	6	16	4265,63	130	1332,50	6000,00	11618,13
10	55	27,50	0,75	6	16	4265,63	130	1332,50	6000,00	11625,63
11	125	62,50	1,5	6	16	4406,25	130	1332,50	6000,00	11801,25

Forfait matériel (€) ⁵	6000,00
Coût total de l'étude (€)	146 879,00 €

¹ 0,25€/km aller-retour

² 62,5€/h/personne (3 personnes)

³ Utilisation du « *PowerMax Soil Isolation Kit* » : 10,25€/échantillon

⁴ Sous-traitance en laboratoire de l'amplification (PCR) et identification de l'ADN

⁵ Matériels divers : tubes PVC, tubes à centrifuger, carottier Beaker...

III.4.3 Discussion

La qualité des résultats va dépendre de la qualité des prélèvements et de l'identification des brins d'ADN. Cependant, la séparation de l'ADNe et de son support minéral est l'étape limitante de ce protocole. En effet, ce processus va déterminer la pureté de l'ADN et donc la faisabilité de la réplication puis de l'identification. De plus, la détection des espèces via l'identification peut conduire à des faux positifs ou faux négatifs. Celle-ci pourra être ajustée à l'aide des probabilités de présence actuelle ou ancienne de l'organisme. Malgré l'utilisation de courbe de calibration, la datation au carbone 14 dépend de nombreux facteurs, comme le taux de carbone radioactif dans l'atmosphère au moment de la mort de l'organisme étudié ou la vitesse de décroissance de cette concentration, ce qui peut conduire à des datations parfois approximatives voire même aberrantes (CIRAM 2013). La méthode OSL pourrait être une alternative. Il est également possible d'effectuer un calage temporel avec une ou plusieurs espèces dont les aires de répartition spatiales et temporelles sont connues.

Le chiffrage proposé pourra être ajusté suite à l'échantillonnage test. Les coûts de sous-traitance sont actuellement forfaitaires. Ils pourront aussi être précisés par des demandes de devis suite au test préalable à l'étude. Selon l'application de la méthode de prélèvement A ou B en fonction du site, les coûts vont différer de par le matériel utilisé. Un forfait de 6 000€ de matériel est probablement légèrement sous-estimé. La méthode A nécessitant peu de matériel, pourrait potentiellement être applicable partout en utilisant une pelle mécanique pour creuser le site et obtenir une coupe de sol substituant la berge d'érosion. Néanmoins, les coûts de service seront des éléments à prendre en considération, de même que l'aspect foncier de l'opération. Enfin, le nombre de prélèvement fera également varier le chiffrage, 130 échantillons étant approximativement le maximum.

Finalement, la validation du test préalable à l'étude déterminera la mise en œuvre du projet. En effet, celui-ci permettra d'ajuster le protocole afin d'optimiser la qualité des résultats.

Conclusion

L'extraction de l'ADNe est donc une méthode à développer et notamment dans le domaine de l'écologie des milieux aquatiques. Les enjeux sont nombreux : surveillance des hydrosystèmes, gestion des espèces exotiques envahissantes, protection des espèces vulnérables ou en danger critique d'extinction etc... Toutefois, ce type de protocole ne serait parfois pas rentable, en termes de temps et de coûts, pour certaines espèces lorsque les méthodes classiques d'identification peuvent être appliquées rapidement (Turner et al. 2015).

Bien qu'il existe encore peu d'études sur l'ADNe dans les sédiments fluviaux, certains considèrent les méthodes d'extraction et d'identification via l'ADNe comme des démarches encore en développement. Il apparaît donc nécessaire de vérifier la cohérence des résultats grâce aux méthodes classiques jusqu'à ce que le potentiel, mais aussi les limites de l'ADNe, ne soient pleinement explorées (Pedersen et al. 2015).

L'objectif de ce projet est ainsi de contribuer au développement d'une méthode applicable à un grand cours d'eau tel que la Loire. Bien qu'il soit nécessaire de l'ajuster en fonction des échantillonnages et identifications, le protocole pourrait être un point d'inflexion dans ce domaine et permettre de développer la surveillance d'espèces exotiques telles que *Ludwigia peploides*. Enfin, les résultats, s'ils s'avèrent concluants, pourront à terme conditionner la mise en place ou le renforcement de plan de gestion des hydrosystèmes.

Bibliographie

- Adiyiah, J., et P. Kelderman. 2014. « Assessment of the levels of heavy metals in vertical sediment cores of Lake Markermeer in the Netherlands ». *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*.
- Alsos, Inger Greve, Youri Lammers, Nigel Giles Yoccoz, Tina Jørgensen, Per Sjögren, Ludovic Gielly, et Mary E. Edwards. 2018. « Plant DNA Metabarcoding of Lake Sediments: How Does It Represent the Contemporary Vegetation ». Édité par Christopher Carcaillet. *PLOS ONE* 13 (4): e0195403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195403>.
- Briant, Rebecca M., Geoffrey Russell Coope, Richard C. Preece, et Philip Gibbard. 2004. « Evidence for Early Devensian (Weichselian) Fluvial Sedimentation: Geochronological and Palaeoenvironmental Data from the Upper Pleistocene Deposits at Deeping St James, Lincolnshire, England [Mise En Évidence d'une Sédimentation Fluviale Du Devensien (Wechselien) Ancien : Données Géochronologiques et Paléoenvironnementales Des Dépôts Du Pléistocène Supérieur de Deeping St James, Lincolnshire, Angleterre.] ». *Quaternaire* 15 (1): 5-15. <https://doi.org/10.3406/quate.2004.1750>.
- CIRAM, AMS. 2013. « La datation des objets en bois, ivoire, os, tissu, ... Le carbone 14 par AMS ». CIRAM Science for art - Cultural heritage.
- Clarke, Charlotte L., Mary E. Edwards, Tony Brown, et Ludovic Gielly. 2018. « Holocene floristic diversity and richness in northeast Norway revealed by sedimentary ancient DNA (sedaDNA) and pollen », septembre, 19. <https://doi.org/10.1111/bor.12357>.
- Data.gouv.fr Hydroécorégions de niveau 1 (consulté le 29/11/2019) <https://www.data.gouv.fr/fr/datasets/hydroecoregions-de-niveau-1-her-1/>
- DREAL Centre-Val de Loire, Les données du SIEL (consulté le 29/11/2019) <http://www.centre-val-de-loire.developpement-durable.gouv.fr/les-donnees-du-siel-r557.html>
- Goldberg, Caren S., Cameron R. Turner, Kristy Deiner, Katy E. Klymus, Philip Francis Thomsen, Melanie A. Murphy, Stephen F. Spear, et al. 2016. « Critical Considerations for the Application of Environmental DNA Methods to Detect Aquatic Species ». Édité par M. Gilbert. *Methods in Ecology and Evolution* 7 (11): 1299-1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>.
- Grosbois, C., M. Meybeck, L. Lestel, I. Lefèvre, et F. Moatar. 2012. « Severe and Contrasted Polymetallic Contamination Patterns (1900–2009) in the Loire River Sediments (France) ». *Science of The Total Environment* 435-436 (octobre): 290-305. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.056>.
- Jackson, Colin R, Jennifer P Harper, Dache Willoughby, Eric E Roden, et Perry F Churchill. 1997. « A Simple, Efficient Method for the Separation of Humic Substances and DNA from Environmental Samples », décembre, 3.
- Miaud Claude, Pierre Taberlet, Tony Dejean, Éric Coissac, Christian Miquel, François Pompanon, Alice Valentini, 2012, ADN « environnemental » : un saut méthodologique pour les inventaires de la biodiversité, Sciences Eaux & Territoires 2012/1 (Numéro 6).
- Mo Bio Laboratories, <https://us.vwr.com/store/product/12783055/mo-bio-laboratories-powermax-soil-dna-isolation>
- Ogram, Andrew, Gary S. Sayler, et Tamar Barkay. 1987. « The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments ». *Journal of Microbiological Methods* 7 (2-3): 57-66. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X).
- Pedersen, Mikkel Winther, Aurélien Ginolhac, Ludovic Orlando, Jesper Olsen, Kenneth Andersen, Jakob Holm, Svend Funder, Eske Willerslev, et Kurt H. Kjær. 2013. « A Comparative Study of Ancient Environmental DNA to Pollen and Macrofossils from Lake Sediments Reveals Taxonomic Overlap and Additional Plant Taxa ». *Quaternary Science Reviews* 75 (septembre): 161-68. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2013.06.006>.

- Pedersen, Mikkil Winther, Søren Overballe-Petersen, Luca Ermini, Clio Der Sarkissian, James Haile, Micaela Hellstrom, Johan Spens, et al. 2015. « Ancient and Modern Environmental DNA ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370 (1660): 20130383. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0383>.
- Pietramellara, G., J. Ascher, F. Borgogni, M. T. Ceccherini, G. Guerri, et P. Nannipieri. 2009. « Extracellular DNA in Soil and Sediment: Fate and Ecological Relevance ». *Biology and Fertility of Soils* 45 (3): 219-35. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>.
- SDEC-France (consulté le 05/01/2020) <https://www.sdec-france.com/carottiers-manuels-echantillonnage-sediments-non-remaniés.html>
- Tsai, Yu-Li, et Betty H Olson. 1991. « Rapid Method for Direct Extraction of DNA from Soil and Sediments ». *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 57: 5.
- Turner, Cameron R., Karen L. Uy, et Robert C. Everhart. 2015. « Fish Environmental DNA Is More Concentrated in Aquatic Sediments than Surface Water ». *Biological Conservation* 183 (mars): 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017>.
- Valadou, B., T. Changeux, J.-P. Proteau, J. Belliard, et O. Ledouble. 2007. « Le silure glane (*Silurus glanis*, L.) en France. Evolution de son aire de répartition et prédiction de son extension. » Conseil Supérieur de la Pêche et de la Protection des milieux aquatiques. <http://s3.e-monsite.com/2010/08/08/86157153rapport-silure-csp-pdf.pdf>.
- Wintenberger, Coraline L., Stéphane Rodrigues, Jean-Gabriel Bréhéret, et Marc Villar. 2015. « Fluvial Islands: First Stage of Development from Nonmigrating (Forced) Bars and Woody-Vegetation Interactions ». *Geomorphology* 246 (octobre): 305-20. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2015.06.026>.

Directeur de recherche :

Stéphane Rodrigues

Amaury Rabouan

PFE/DAE5/IMA

2019 - 2020

**L'ADN environnemental dans les sédiments aquatiques :
Elaboration d'un protocole applicable à la Loire**

Résumé :

La détection d'espèces grâce à l'extraction de l'ADNe présent dans les sédiments fluviaux représente une opportunité dans la gestion des hydrosystèmes. Suite à une étude bibliographique du sujet, l'objectif de ce projet a été de comparer les diverses méthodes de prélèvement de l'ADNe dans les sédiments aquatiques puis d'élaborer un protocole applicable à un grand cours d'eau tel que la Loire. Les sites proposés ainsi que les méthodes d'échantillonnage retenues sont présentés dans cette étude. Les résultats attendus et le chiffrage du projet comprenant les coûts détaillés également. Le protocole sera ajusté dans son ensemble en fonction des résultats d'un échantillonnage test. Son développement pourra alors aboutir à l'élaboration d'outils utilisables par les gestionnaires des grands bassins versants.

Mots-clés : ADNe, sédiments, Loire, extraction, identification, datation