



RAPPORT D'ANALYSES ADNe

Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Poissons,
Mammifères et crustacés en milieu marin pélagique

We Are Méditerranée – Avril 2024



Table des matières

Table des matières.....	2
1) Description du projet.....	3
2) Contexte et objectifs de l'étude.....	3
3) L'ADNe et les expertises VigiDNA ®.....	4
4) Les prélèvements ADNe	4
a. Stratégie d'échantillonnage	4
b. Protocole de prélèvement	5
5) Protocole d'analyses en laboratoire et contrôles qualité	7
a. Marqueurs génétiques	7
b. Protocole de laboratoire	7
c. Analyses bio-informatiques et bases de références.....	7
6) Résultats d'analyses.....	8
a. Mammifères marins.....	8
i. Résultats des assignations taxonomiques	8
ii. Présence et distribution des mammifères dans le sanctuaire Pélagos.....	8
b. Poissons.....	11
i. Résultats des assignations taxonomiques	11
ii. Composition en espèces des sites.....	11
iii. Variations de la biodiversité et indicateurs de biodiversité des poissons	13
c. Crustacés.....	16
7) Conclusions	17
8) Commentaires	17

1) Description du projet

Code étude : DE230471

Client : We Are Méditerranée

- **Adresse** : 61 Boulevard du Mont Boron 06300 NICE
- **Contact** : Greg Lecoeur
- **Email** : greg@greglecoeur.com

Responsable de l'étude : Alicia Dalongeville, Cheffe de projet – alicia.dalongeville@spygen.com

Type d'analyse : Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Poissons, Mammifères et Crustacés en milieu marin pélagique

Nombre d'échantillons : 24

2) Contexte et objectifs de l'étude

« L'ADN environnemental » est une technique innovante pour améliorer la connaissance de la biodiversité. Cette nouvelle approche de surveillance des milieux naturels permet de recenser, à partir des traces d'ADN (sécrétions, excréments, tissus perdus, mucus, écailles...) présentes dans un échantillon d'eau, les espèces présentes dans les milieux aquatiques et terrestres.

Etant donné que les observations de faune marine faites en navigation ou en exploration sous-marine ne représentent que la partie immergée de l'iceberg de toute la diversité benthique et pélagique, il est particulièrement pertinent d'allier expédition d'exploration et analyses d'ADN environnemental (ADNe). Ces analyses peuvent révéler la présence d'espèces rares et rarement observées, et ainsi de renforcer l'idée d'une Mer Méditerranée riche et pleine de surprises.

Le sanctuaire Pelagos est une aire marine protégée entre la France, la principauté de Monaco et l'Italie dédiée à la protection des mammifères marins et leur cortège d'espèces associées. De par sa topographie, cette zone abrite les principaux habitats de Méditerranée et est représentative de sa biodiversité. Ce sanctuaire a cependant été assez peu étudié en comparaison aux Aires Marines Protégées côtières, en raison de la difficulté des observations et des échantillonnages dans la zone du large.

L'objectif du projet est de mettre au point une méthode d'inventaire basée sur l'ADN environnemental (ADNe) durant les expéditions dans le sanctuaire Pelagos. L'objectif de cette première mission d'inventaire exploratoire de la zone Pelagos est de prospecter l'environnement pour détecter des espèces rares ou potentiellement des espèces se trouvant hors de leur aire de répartition connue. Ce projet s'intéresse aux poissons (téléostéens et élasmobranchés), mammifères marins et crustacés. En effet le sanctuaire Pélagos a été mis en place dans l'objectif de protéger les mammifères marins. Les poissons et élasmobranchés sont quant à eux un élément central de la biodiversité marine et indicateur du bon état écologique de l'environnement pélagique. Les crustacés sont un groupe très diversifié qui comprend à la fois des espèces planctoniques importantes pour la chaîne trophique, et des espèces plus emblématiques telles que les homards et langoustes. Ce groupe taxonomique a été très peu étudié par ADNe, et ce projet vise donc à explorer la pertinence de l'utilisation de la technique pour son étude.

3) L'ADNe et les expertises VigiDNA®

Tous les organismes vivants, quelle que soit leur taille ou leur écologie, laissent dans les milieux qu'ils fréquentent des traces d'ADN qui témoignent de leur présence actuelle ou passée. Cet ADN peut être libéré dans l'environnement par l'intermédiaire de fèces, d'urine, de gamètes, de mucus, de salive, de peau, etc. Il peut également provenir de la décomposition d'organismes morts. L'ADNe est caractérisé par un mélange complexe d'ADN nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique, se trouvant sous forme intracellulaire (contenu dans des cellules vivantes) ou extracellulaire. Il permet la détection d'une espèce quel que soit son stade de vie ou son sexe.

Les expertises VigiDNA® développées par SPYGEN sont ainsi basées sur la recherche de traces d'ADN dans l'environnement. Elles permettent d'améliorer le suivi d'espèces rares ou discrètes et visent à renforcer les opérations de veille environnementale à l'échelle mondiale. Elles sont utilisées pour identifier, à partir d'un échantillon d'eau, de sol, de fèces ou de miel, l'ensemble des espèces d'un groupe taxonomique donné présentes dans le milieu étudié (ADNe metabarcoding). Elles permettent également le suivi d'espèces cibles (ADNe barcoding), souvent menacées ou exotiques envahissantes. Ces méthodes sont mises en œuvre dans le cadre d'études réglementaires (études d'impact environnemental) ou de projets de conservation.

Les technologies VigiDNA® reposent aujourd'hui sur 6 brevets et les scientifiques du pôle R&D de SPYGEN sont auteurs de plus de 70 publications scientifiques dans des revues internationales. Depuis 2017, SPYGEN, en partenariat avec des instituts de recherche publics, développe ces méthodes en milieu marin. Menée dans le cadre des explorations de l'Institut Albert II de Monaco, cette nouvelle méthode d'inventaire innovante a pu être développée et mise en application à large échelle dans tous les océans du monde. La méthode est non invasive, standardisée, élimine les biais observateurs et permet aujourd'hui de réaliser les inventaires de biodiversité les plus exhaustifs, sans dérangement de la faune.

4) Les prélèvements ADNe

a. Stratégie d'échantillonnage

Un total de 12 stations a été retenu dans le cadre de cette étude, distribuées sur l'ensemble du sanctuaire Pélagos, mais également dans les zones hauturières entourant la Corse. La localisation des points de prélèvements est présentée sur la Figure 2. Pour chaque station, 2 répliques (2 filtrations) ont été réalisées par filtration continue en surface le long d'un transect linéaire d'environ 2km.

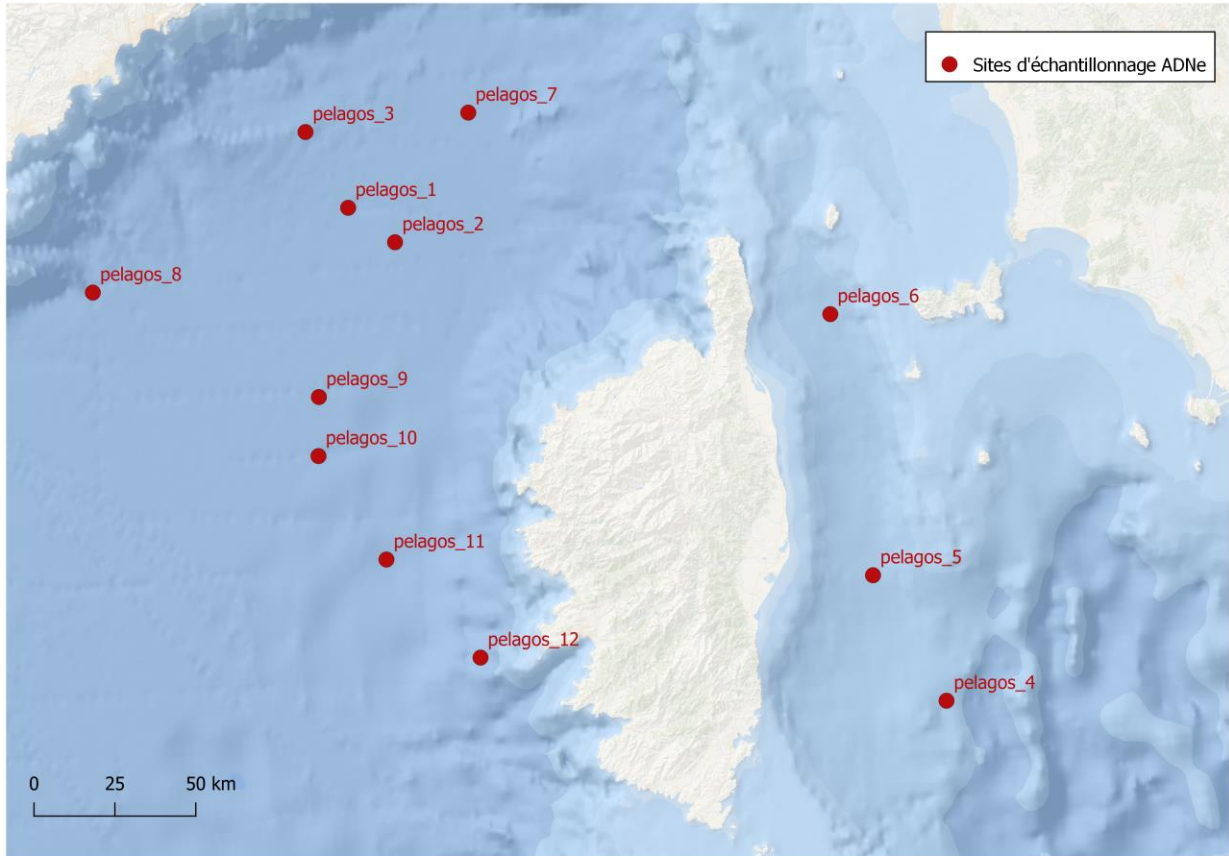


Figure 2 : Localisation des points d'échantillonnage ADN

b. Protocole de prélèvement

L'échantillonnage a été effectué par des agents de l'UMR MARBEC de l'Université de Montpellier, Laure Velez et Franck Pichot. La méthodologie des prélèvements a respecté le protocole défini par les équipes de SPYGEN et MARBEC.

Durant la phase de préparation, la pompe était installée le plus proche possible de l'eau et de l'avant du bateau. Toutes les préparations ont été effectuées sur un support désinfecté avec des gants. Le support était désinfecté avec des lingettes javélistées entre chaque prélèvement. La prise d'eau se trouvait à 1m sous la surface, lestée par un plomb de 3kg (cf photo Figure 4). Le transect était réalisé en avançant à vitesse réduite (environ 2 nœuds) durant les 30min de filtration.

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une pompe péristaltique dans laquelle est insérée un tuyau relié à un filtre d'une porosité de 0,2µm par lequel passe l'eau avant d'être rejetée (cf. Figure 3 ci-dessous). Tous les échantillons ont été prélevés pendant une durée de 30 min à un débit de 1L/min, afin de filtrer un volume total standard de 30L par échantillon. Le filtre était ensuite rempli d'une solution tampon permettant la conservation de l'ADN à température ambiante pendant plusieurs semaines, fermé et étiqueté.

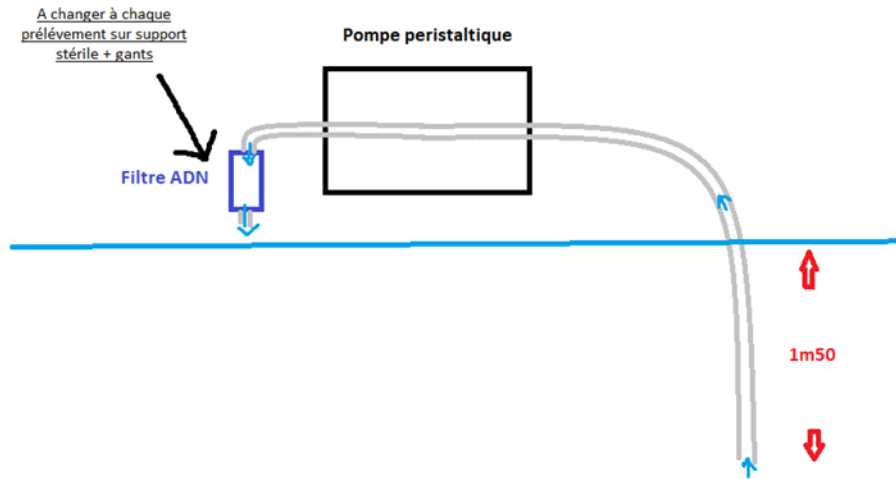


Figure 3 : Schéma de principe des prélèvements



Figure 4 : matériel d'échantillonnage et vues de prélèvements.

5) Protocole d'analyses en laboratoire et contrôles qualité

a. Marqueurs génétiques

Le metabarcoding de l'ADN environnemental, comprenant l'extraction, l'amplification et le séquençage de l'ADN seront réalisés par l'entreprise SPYGEN. Trois marqueurs génétiques différents seront utilisés, permettant de cibler différents groupes taxonomiques. Le choix du marqueur utilisé dépend du groupe taxonomique étudié (eucaryotes, poissons, mammifères, invertébrés), et vise à trouver le meilleur compromis entre résolution taxonomique et détectabilité des espèces les plus rares. Les 3 marqueurs utilisés ciblent l'ADN mitochondrial car ce dernier est plus abondant que l'ADN nucléaire. Le tableau 1 ci-dessous présente les caractéristiques des 3 marqueurs.

Tableau 1 : caractéristiques deux trois marqueurs génétiques utilisés dans le cadre de ce projet

Marqueur	Gène cible	Longueur du fragment	Taxons amplifiés	Référence
<i>teleo</i>	12S	64 pb	Poissons, élasmobranches	Valentini et al., 2016
<i>Mamm01</i>	12S	57 bp	Mammifères	Taberlet et al., 2018
<i>Pleo</i>	16S	150-190 bp	Décapodes, crustacés	Komai et al., 2019

b. Protocole de laboratoire

Les extractions d'ADN sont réalisées dans une salle dédiée à l'ADN rare ou dégradé pour éviter toute contamination avec de précédentes manipulations. Les échantillons sont centrifugés à 15 000 g durant 15 min, à 6°C, après quoi le surnageant est éliminé et 360 µL de tampon ATL sont ajoutés. L'extraction est réalisée avec le kit d'extraction DNeasy Blood and Tissue (Qiagen).

Une fois extrait, l'ADN est amplifié séparément pour chacun des marqueurs génétiques par technique PCR (Polymerase Chain Reaction) afin de produire des millions de copies du marqueur. Pour identifier l'échantillon d'origine d'une séquence, un court fragment ADN appelé « tag » est incorporé aux amorces avant amplification en amont du séquençage. Les fragments amplifiés sont ensuite séquencés par une technique de séquençage haut débit.

Douze répliques PCR par échantillon et par couple d'amorces sont effectués de manière à maximiser la probabilité de détection de l'ADN rare. À chaque étape du protocole des témoins négatifs sont analysés en parallèle des échantillons, afin de contrôler la pureté des consommables utilisés et de détecter d'éventuelles contaminations croisées au cours de la manipulation (*cf. Extraction (-) & PCR (-) dans Contrôles qualité*).

c. Analyses bio-informatiques et bases de références

Après le séquençage, les lectures sont traitées pour supprimer les erreurs et analysées à l'aide de programmes implémentés dans le logiciel WINGY. Brièvement, les séquences identiques sont regroupées, et les séquences trop courtes (< 20 paires de bases) ou comportant moins de 10 occurrences sont exclues. L'ensemble des séquences restantes est ensuite nettoyé pour éliminer les erreurs liées à la PCR.

Les séquences obtenues ont été analysées avec des outils bio-informatiques permettant d'éliminer les erreurs dues à l'amplification ou au séquençage (à l'aide de différents filtres) et de comparer chaque séquence avec les bases de référence SPYGEN MED2023® (pour les poissons uniquement) ainsi que la base publique GenBank® (pour les poissons, mammifères et crustacés). Cette étape dite « d'assignation taxonomique » permet d'établir pour chaque groupe taxonomique une liste d'espèces pour chaque échantillon avec la base de référence utilisée ainsi que le nombre de séquences ADN et le nombre de répliques positifs attribués à chaque espèce.

Les Annexes 1 et 2, jointe en format Exel à ce rapport, présentent les tableaux de résultats produits par SPYGEN à l'issue des analyses bio-informatiques, respectivement pour les mammifères et pour les poissons. Pour chaque échantillon (colonne), le tableau indique le nombre de répliques PCR (sur 12) dans lequel chaque espèce (ligne) a été détectée, ainsi

que le nombre de séquences d'ADN de l'espèce. Pour les mammifères, le nombre de réplicats PCR n'est pas indiqué car cette information n'est donc pas disponible puisque les amorces ne sont pas tagguées différemment par PCR.

Certaines espèces peuvent présenter des séquences ADN identiques sur la région d'ADN étudiée, ce qui ne permet pas de les différencier. Dans ce cas, ces espèces sont identifiées au genre ou à la famille, ou identifiées comme complexes d'espèces (cf. Tableau de résultats en Annexe 1 pour plus de détails).

➤ **Contrôles qualité :**

Type de contrôle	Résultat	Commentaires
Extraction (-)	Négatif	Aucune contamination détectée lors de l'analyse
PCR (-)	Négatif	

6) Résultats d'analyses

a. Mammifères marins

i. *Résultats des assignations taxonomiques*

Un total de 4 taxons différents ont été détectés sur l'ensemble des 24 échantillons ADN. Parmi ces taxons, un seul a pu être assigné au niveau de l'espèce : le rorqual commun (*Balaenoptera physalus*). Les trois autres taxons ont été assignés au niveau de la famille ou du sous-ordre. Un taxon est identifié au niveau de la famille des Delphinidae, dont 5 espèces sont résidentes du sanctuaire Pélagos. Deux taxons sont assignés au sous-ordre des Odontocètes (cétacés à dents), qui comprend les espèces de la famille des Delphinidae ainsi que deux autres espèces résidentes du sanctuaire Pélagos : le cachalot et la baleine à bec de Cuvier.

Une séquence peut être associée à un genre ou famille au lieu de l'espèce si plusieurs espèces du genre/famille partagent la même séquence ADN au marqueur *Mamm01* et ne peuvent donc pas être distinguées l'une de l'autre par l'ADN. C'est le cas notamment de plusieurs espèces de Delphinidae de Méditerranée : le dauphin commun (*Delphinus delphis*), le dauphin bleu et blanc (*Stenella coeruleoalba*) et le grand dauphin (*Tursiops truncatus*). La détection d'une séquence ADN assignée à la famille des Delphinidae dans les échantillons ADN indique donc la présence d'une ou plusieurs de ces trois espèces.

Les deux séquences assignées au sous-ordre des Odontoceti peuvent correspondre à n'importe laquelle des 14 espèces de ce sous-ordre pouvant être présentes en Méditerranée. Ces séquences présentent une similarité insuffisante avec les séquences de la base de référence pour être assignées à un niveau taxonomique plus précis.

ii. *Présence et distribution des mammifères dans le sanctuaire Pélagos*

Neuf espèces de mammifères marins sont résidentes du sanctuaire Pélagos, 8 espèces de cétacés et un pinnipède, le phoque moine de Méditerranée. Certaines espèces de l'Atlantique Nord-Est sont également « visiteuses » en Méditerranée, c'est-à-dire que des individus isolés ou des groupes entrent par le détroit de Gibraltar sans qu'il n'y ait de population installée. Ainsi, 12 espèces de cétacés peuvent être de passage de façon ponctuelle en Méditerranée. Le tableau ci-après présente les espèces de mammifères marins résidentes et visiteuses de Méditerranée, ainsi que la résolution taxonomique à laquelle le marqueur *Mamm01* peut identifier l'espèce et le statut de celle-ci sur la Liste Rouge des Espèces Menacées de l'IUCN.

La Liste Rouge est reconnue comme l'outil de référence le plus fiable pour connaître le niveau des menaces pesant sur la diversité biologique spécifique. Chaque espèce peut être classée dans l'une des neuf catégories suivantes : Éteinte (EX), Éteinte à l'état sauvage (EW), En danger critique (CR), En danger (EN), Vulnérable (VU), Quasi menacée (NT), Préoccupation mineure (LC), Données insuffisantes (DD), Non évaluée (NE). La classification se base sur cinq critères quantitatifs associés au risque d'extinction : taille de population, taux de déclin, aire de répartition géographique, degré de peuplement et de fragmentation de la répartition.

Tableau 2 : espèces de mammifères marins pouvant être présentes en Méditerranée, avec leur statut sur la Liste Rouge des Espèces Menacées de l'IUCN (en danger critique CR, en danger EN, vulnérable VU, quasi-menacé NT, préoccupation mineure LC) ainsi que la résolution taxonomique à laquelle elles peuvent être identifiées par le marqueur Mamm01. Tableau issu du rapport *Marine Mammals and Sea Turtles of the Mediterranean and Black Seas* de l'IUCN (2012).

Ordre	Sous-ordre	Famille	Espèce	Nom vernaculaire	Catégorie Liste Rouge de l'IUCN		Présence dans le sanctuaire Pélagos	Résolution de l'assignation
					Global	Méditerranée		
CETACES	Mysticeti	Balaenidae	Eubalaena glacialis	Baleine franche de l'Atlantique Nord	CR		Visiteur	Genre/Espèce
		Balaenopteridae	Balaenoptera acutorostrata	Baleine de Minke	LC		Visiteur	Espèce
		Balaenopteridae	Balaenoptera borealis	Rorqual boréal	EN		Visiteur	Espèce
		Balaenopteridae	Balaenoptera physalus	Rorqual commun	VU	EN	Résident	Espèce
		Balaenopteridae	Megaptera novaeangliae	Baleine à bosse	LC		Visiteur	Espèce
		Eschrichtiidae	Eschrichtius robustus	Baleine grise	LC		Visiteur	Espèce
	Odontoceti	Delphinidae	Delphinus delphis	Dauphin commun	LC	EN	Résident	Famille
		Delphinidae	Globicephala melas	Globicéphale noir	LC	EN	Résident	Espèce
		Delphinidae	Grampus griseus	Dauphin de Risso	LC	EN	Résident	Espèce
		Delphinidae	Orcinus orca	Orque épaulard	DD		Visiteur	Espèce
		Delphinidae	Pseudorca crassidens	Pseudorque	NT		Visiteur	Espèce
		Delphinidae	Stenella coeruleoalba	Dauphin bleu et blanc	LC	LC	Résident	Famille/Espèce
		Delphinidae	Steno bredanensis	Sténo à rostre étroit	LC		Visiteur	Espèce
		Delphinidae	Tursiops truncatus	Grand Dauphin	LC	LC	Résident	Famille/Espèce
		Kogiidae	Kogia sima	Cachalot nain	LC		Visiteur	Espèce
		Physeteridae	Physeter macrocephalus	Cachalot	VU	EN	Résident	Espèce
		Ziphiidae	Hyperoodon ampullatus	Hyperodon boréal	NT		Visiteur	Espèce
		Ziphiidae	Mesoplodon europaeus	Baleine à bec de Gervais	LC		Visiteur	Espèce
		Ziphiidae	Mesoplodon densirostris	Baleine à bec de Blainville	LC		Visiteur	Espèce
		Ziphiidae	Ziphius cavirostris	Baleine à bec de Cuvier	LC	VU	Résident	Espèce
PINNIPEDES	Pinnipedia	Phocidae	Monachus monachus	Phoque moine de Méditerranée	VU	EN	Résident	Non référencé

Sur les 9 espèces de mammifères marins présentes dans le sanctuaire Pélagos, 6 ont un statut IUCN « en danger » et une « vulnérable » en Méditerranée. Seul le grand dauphin et le dauphin blanc et bleu ont des sous-populations méditerranéennes en préoccupation mineure.

La figure 5 montre la détection des mammifères marins dans les échantillons ADN. Les détections ont été combinées pour les deux répliques terrain de chaque site. La famille Delphinidae a été détectée dans tous les sites sauf 1 (Pélagos 9), et le rorqual commun (*Balaenoptera physalus*) dans 4 sites au Sud-Est, Nord-Ouest et Ouest de la Corse. Un haplotype (une espèce ou plusieurs espèces partageant une même séquence du marqueur *Mamm01*) d'odontocètes (cétacés à dents incluant les dauphins, cachalots, orques et baleines à bec. Cf Tableau 2) a été détecté sur trois sites au Nord-Ouest et Sud-Est de la Corse. Un second haplotype d'odontocètes a été détecté sur un seul site, Pélagos 2 au Nord-Ouest de la Corse (Figure 5).

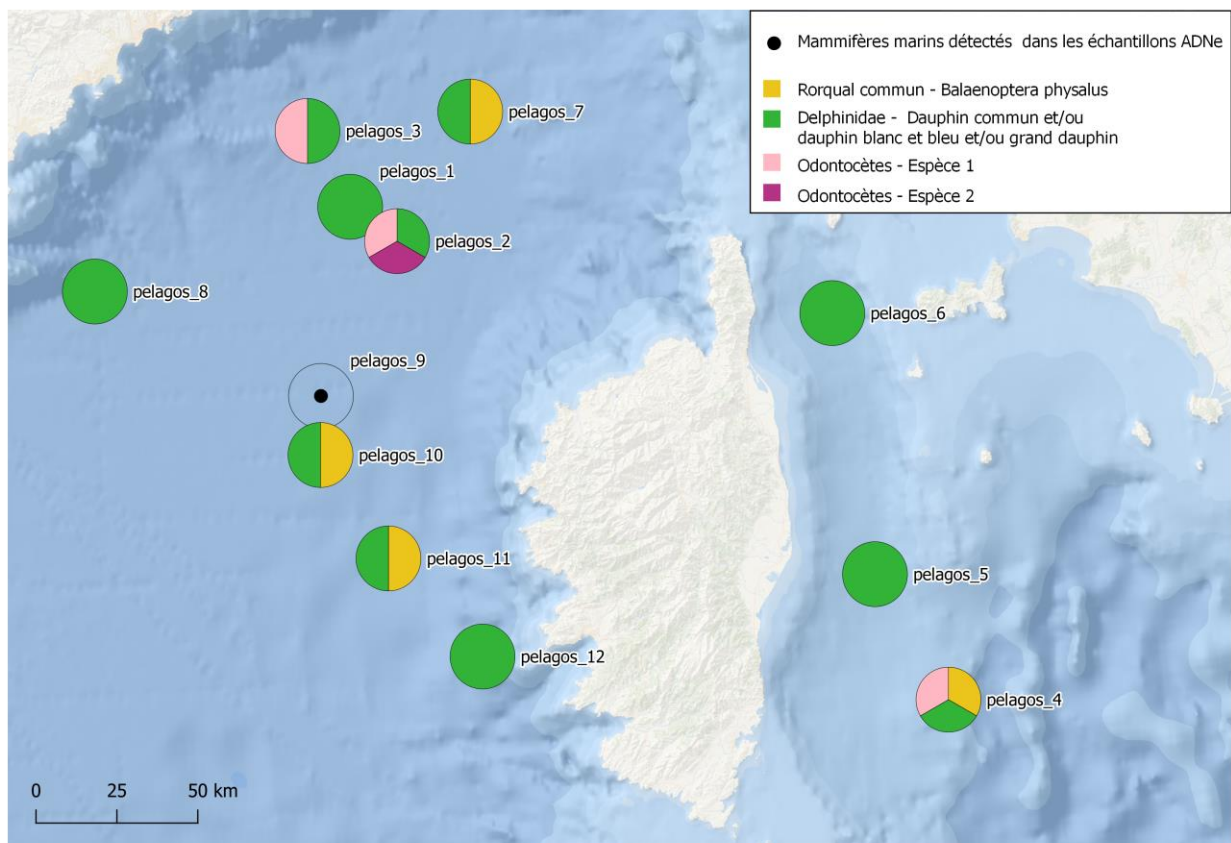


Figure 5 : carte montrant la détection des 4 taxons de mammifères marins identifiés dans les 24 échantillons ADN. Les camemberts montrent la détection ou non des taxons (présence/absence) dans les deux répliques terrain de chacun des 12 sites.

Le rorqual commun a été observé sur 3 des sites au moment de l'échantillonnage (Pélagos 4, 7 et 10), et l'espèce a bien été détectée dans les échantillons ADN des trois sites. Des dauphins bleus et blancs ont également été observés aux sites Pélagos 2 et 4, la séquence assignée à la famille des Delphinidae sur ces sites correspond donc probablement à cette espèce, et il est aussi possible que d'autres espèces de Delphinidae ayant une séquence identique (grand dauphin ou dauphin commun) aient également été présentes.

Les résultats des analyses ADN sur les mammifères marins montrent une présence d'au moins une espèce de mammifère sur 11 des 12 sites d'échantillonnage, ce qui indique une présence de mammifères sur l'ensemble du sanctuaire Pélagos et renforce l'importance de cet espace pour la protection de l'espace de vie des mammifères marins.

b. Poissons

i. Résultats des assignations taxonomiques

Un total de 24 taxons différents ont été détectés sur l'ensemble des 24 échantillons ADN. Un de ces taxons correspond à une espèce d'eau douce saumâtre assigné la famille des Xenocypridae (carpes et ménés), qui a été détecté en très faible quantité dans un seul des répliques du site Pélagos 2. Cet ADN a très probablement été emmené par la consommation humaine ou par du matériel terrain ayant été utilisé en eau douce. Ainsi un total de 23 espèces de poissons marins a été détectés, dont 21 téléostéens et deux élasmobranches : le diable de Méditerranée (*Mobula mobular*) et la pastenague pélagique (*Pteroplatytrygon violacea*).

Parmi les taxons détectés 2 sont identifiés comme des complexes d'espèces car les espèces partagent la même séquence ADN et ne peuvent être distinguées :

- le denté (*Dentex dentex*) et les pagres (*Pagrus pagrus* et *P. auriga*)
- les chinchards (*Trachurus trachurus* et *T. mediterraneus*)

Cinq taxons sont assignés au niveau du genre, soit par ce que plusieurs espèces du même genre partagent la même séquence du marqueur *teleo* (les motelles *Gaidropsarus sp.*), soit par ce que la séquence présente un pourcentage d'identité élevé (>98%) avec plusieurs espèces du genre (ex : les bonites *Auxis sp.*). Le taxon *Brama sp.* correspond très certainement à la grande castagnole *Brama brama*, qui est la seule espèce du genre présente en Méditerranée mais dont la séquence du marqueur *teleo* est absente des bases de références MED_2023 et GenBank.

Les 16 autres taxons détectés sont identifiés à l'espèce.

ii. Composition en espèces des sites

Comme attendu, les compositions en espèces des sites est dominée par des poissons pélagiques (anchois, thons, bonites, chinchards, poisson lune, espadon etc.) et ne contient aucune espèce crypto-benthique et peu de poissons démersaux. La richesse en espèce est relativement faible par rapport à des sites côtiers (sur lesquels le nombre d'espèces moyen par échantillon est de l'ordre de 10 à 50 espèces), ce qui est attendu du fait de la densité des organismes vivants bien plus faible au large que près des côtes, et de la dilution rapide de l'ADN par une circulation importante des masses d'eau.

Nous avons réalisé une analyse canonique des correspondances afin de représenter la similarité des sites en termes de communautés d'espèces de poissons. Cette méthode d'ordination permet d'ordonner les sites les uns par rapport aux autres de manière à éloigner les sites donc la composition en espèces est la plus différente, et de rapprocher ceux dont la composition est plus similaire (Figure 6). L'analyse montre une différenciation des sites Pélagos 2 et 3 sur l'axe 1 d'ordination, et du site Pélagos 7 sur l'axe 2 d'ordination. L'axe 1 d'ordination est contraint par la présence de la grande castagnole (*Brama sp.*, probablement *Brama brama*), de la lanterne de Méditerranée (*Notoscopelus elongatus*), des chinchards (*Trachurus sp.*) et du poisson lune *Mola mola* (Figure 6). La présence de ces espèces pélagiques non-prédatrices est caractéristique de la communauté des sites Pélagos 2 et 3 situés sur la radiale Nice/Calvi. L'axe 2 d'ordination est contraint par la présence de serpes (*Nansenia sp.*) et du barbier (*Anthias anthias*). Ces espèces de profondeur et de petite taille sont donc caractéristique du site Pélagos 7, situé légèrement à l'Est des sites 2 et 3. Les autres sites sont groupés dans le plan d'ordination, ce qui indique qu'ils ont une composition en espèces similaire.

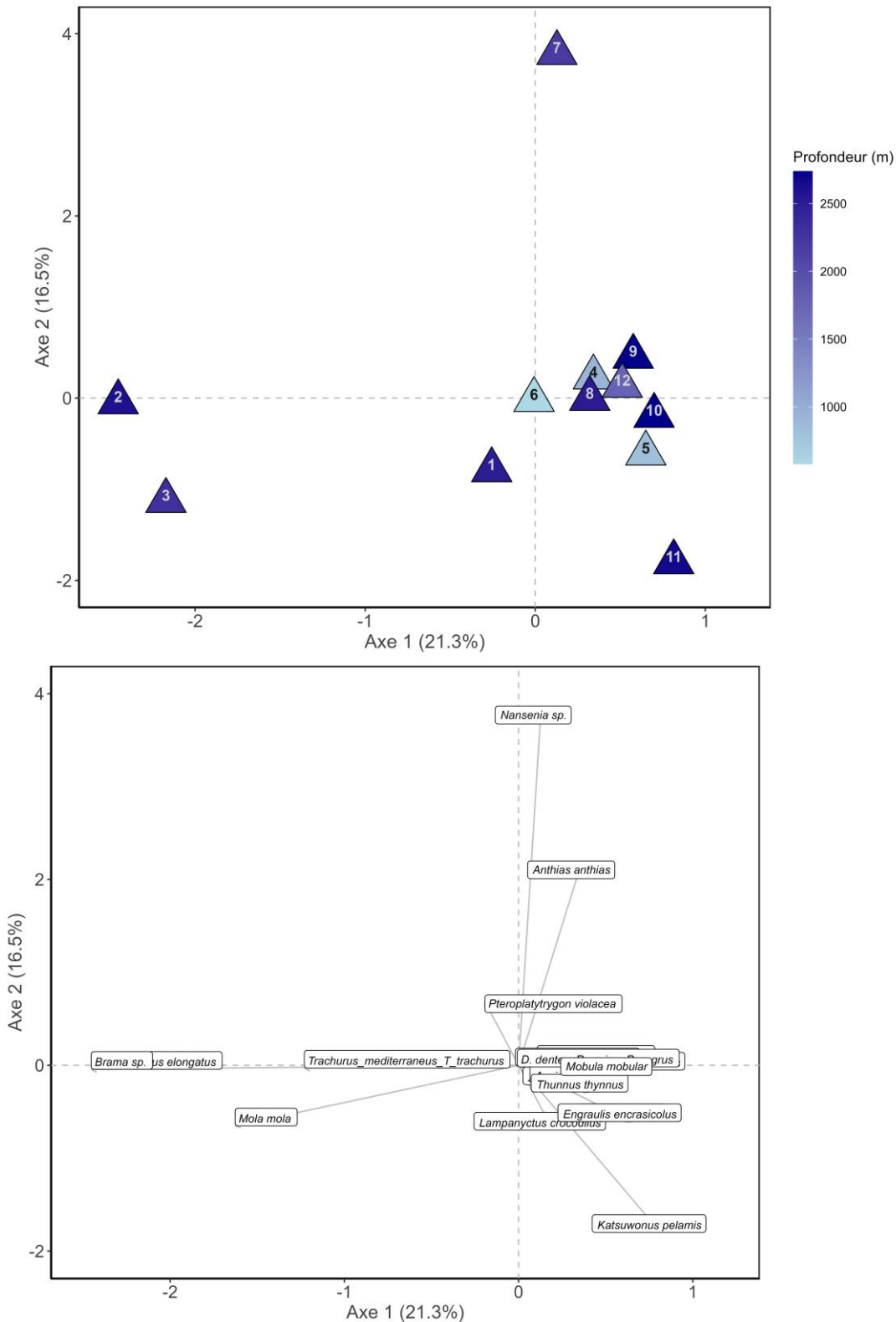


Figure 6 : Représentation de la distribution des communautés de poissons échantillonnées en fonction du site suite à une analyse canonique des correspondances. Cette représentation graphique permet d'interpréter les distances entre sites en termes de composition en espèces. Sur le graphe du haut, les sites les plus rapprochés sur le graphique ont des communautés similaires. Sur le graphe du bas, les espèces sont représentées. Le gradient de couleur indique la profondeur du site.

iii. Variations de la biodiversité et indicateurs de biodiversité des poissons

Nous avons ensuite analysé la différence en termes de nombre d'espèces entre les 12 stations. La figure 7 présente le nombre d'espèces de poissons détectées dans chacune des 12 stations, en poolant les listes d'espèces des 2 répliques prélevés dans chaque station. Le nombre d'espèces varie entre 1 (Pélagos 3) et 11 (Pélagos 5). Le nombre d'espèces détectées semble plus élevé sur les sites les moins profonds.

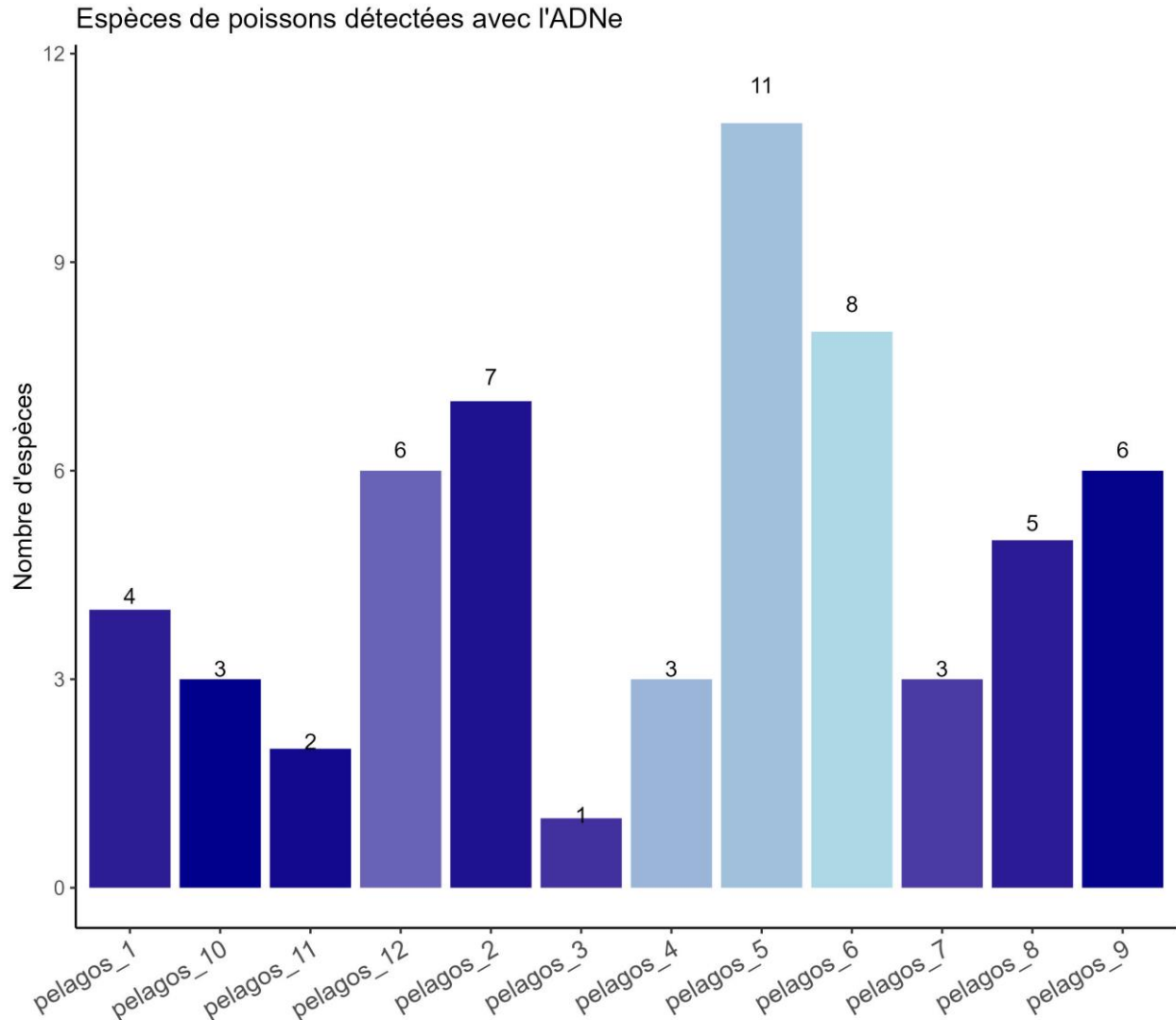
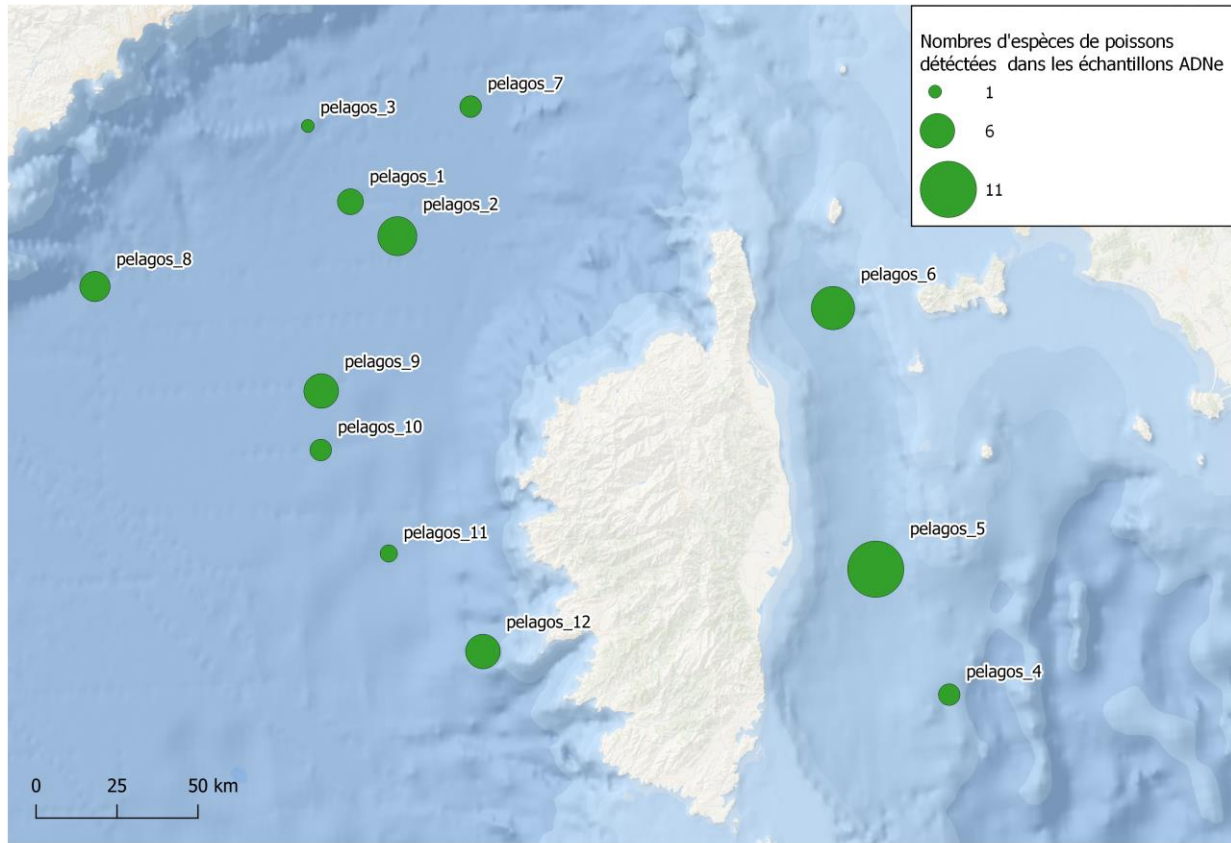


Figure 7 : Nombre d'espèces de poissons détectés dans les stations d'échantillonnage ADNe. Le gradient de couleur indique la profondeur du site (profondeur moyenne sous le bateau durant le transect).

La figure 8 montre la carte de la richesse spécifique en poissons (nombre d'espèces). Les sites les plus proches de la Corse semblent avoir une richesse spécifique plus élevée que les sites plus au large, ce qui peut s'expliquer par une plus grande densité d'organisme dans cette zone de transition entre le large et la côte et/ou par les caractéristiques physico-chimiques des masses d'eau ou la profondeur. Les deux sites situés à l'Est de la Corse (5 et 6) sont les plus riches en espèces. Cette zone semble donc particulièrement riche en poissons.



Données source projet Expédition Pélagos - WE ARE MEDITERRANNE & ESRI Topo basemap layer ; cartographie SPYGEN 28/03/2024

Figure 8 : carte montrant la richesse spécifique en poissons (nombre total d'espèces) détectée dans les échantillons ADNé (2 échantillons par site)

Nous avons également calculé trois indicateurs de biodiversité basés sur la présence/absence des espèces de poissons (Figure 9) :

- **La diversité spécifique** totale : nombre total d'espèces de poissons. Cet indice répond donc au descripteur D1 (biodiversité) du bon état écologique de la stratégie pour le milieu marin (DCSMM).
- **L'indicateur commercial** : quantifie le nombre d'espèces de poisson à intérêt commercial dans l'échantillon. Il répond donc au descripteur D3 (espèces commerciales) de la DCSMM. La liste des poissons à intérêt commercial est issue de Fishbase (fishbase.org) et amendée par des experts du domaine en méditerranée issus de la recherche scientifique, de la gestion d'aires marines protégées et de la pêche petit métier.
- **L'indicateur espèces menacées** : informe sur le statut de conservation des espèces présentes dans l'échantillon. Cet indicateur correspond au nombre d'espèces classées comme quasi-menacées (NT), vulnérables (VU), en danger (EN) et en danger critique (CR) sur la Liste rouge des espèces menacées de l'IUCN (<https://www.iucnredlist.org/>). Il répond au descripteur D1 (biodiversité) du bon état écologique car en lien avec la capacité des AMPs à préserver les espèces vulnérables.

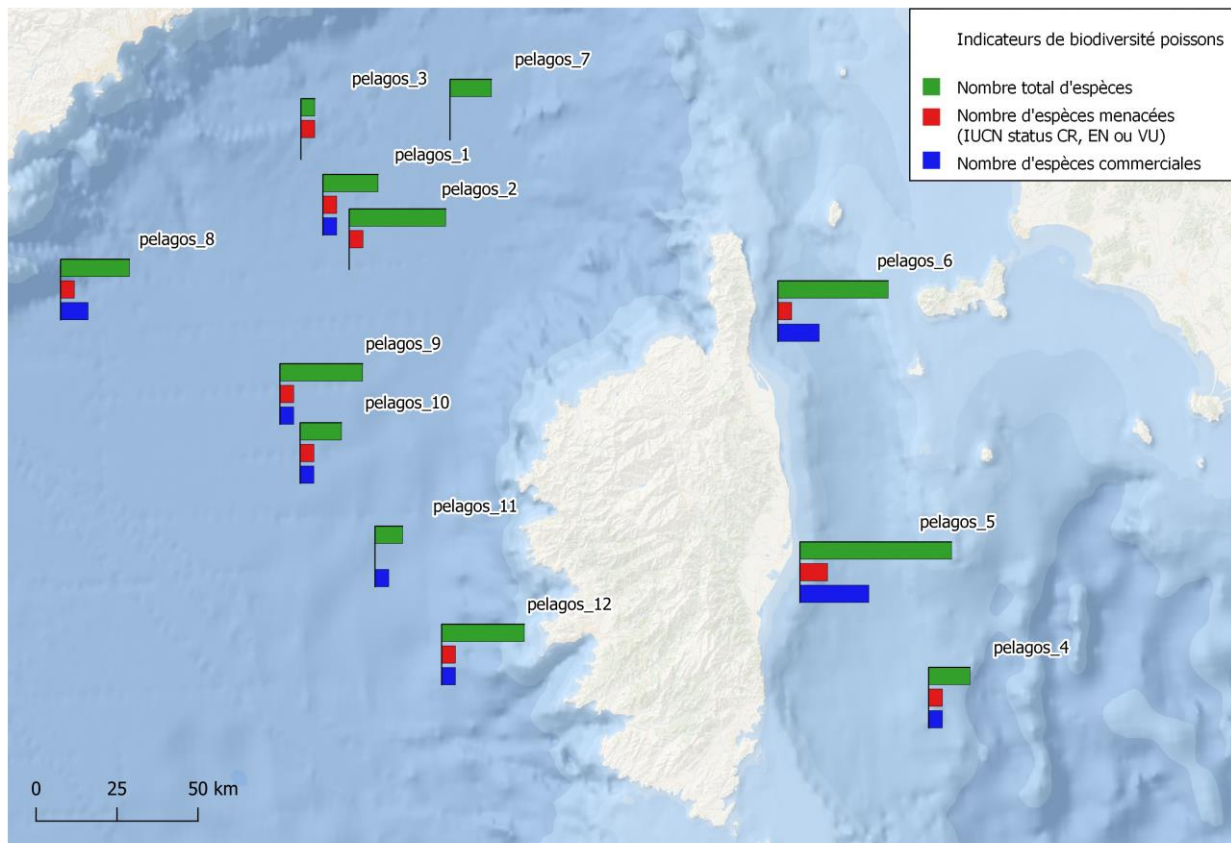


Figure 9 : carte montrant pour chaque site la valeur des trois indicateurs de biodiversité en poissons : en vert la richesse spécifique totale, en bleu l'indicateur commercial et en rouge l'indicateur espèces menacées.

La diversité des espèces à intérêt commercial est plus élevée sur les sites 5 et 6 à l'Est de la Corse. Cette tendance est due notamment à la détection des rougets, anchois et chinchards. Les Scombridae (thons et bonites), espèces à très haute valeur commerciale, sont quant à eux retrouvés dans la grande majorité des sites (hormis pélagos 2,3 et 7). La présence de ces espèces prédatrices pélagiques, et en particulier du thon rouge de Méditerranée (*Thunnus thynnus*) dont on détecte l'ADN en abondance dans 14 des 24 échantillons, indique l'importance de la zone du Pélagos pour l'ensemble de la chaîne trophique et pour le renouvellement des stocks de pêche.

Deux espèces menacées et une espèce quasi-menacée ont été détectées dans les échantillons ADNe. Le diable de mer (*Mobula mobular*), espèce classée en danger (EN) sur la Liste Rouge des espèces menacées de l'IUCN, a été détecté sur 5 sites (pélagos 4,5,9,10 et 12) au sud-est et ouest/nord-ouest de la Corse. Cette espèce a été observée lors de l'échantillonnage sur les sites pélagos 10 et 11. L'absence de détection de l'espèce dans les échantillons ADNe du site 11 peut s'expliquer soit par une dilution rapide de l'ADN dû au courant, ou par la dominance d'une ou plusieurs autre(s) espèce(s) dont l'abondance de l'ADN masquerait l'ADN plus rare. En effet, les amorces utilisées pour amplifier l'ADN se fixent de façon aléatoire aux fragments d'ADNe de l'échantillon lors de la réaction. Si l'ADN d'une espèce est rare, la probabilité de l'amplifier diminue. Les deux échantillons du site Pélagos 11 sont très riches en séquences de thon rouge, il est donc probable que cette espèce est masquée la détection du diable de mer.

Le poisson lune (*Mola mola*), espèce emblématique classée vulnérable (VU) sur la Liste Rouge des espèces menacées de l'IUCN, a été détecté sur 3 sites (pélagos 1,2 et 3) au milieu de la radiale Calvi-Nice. Cette espèce a été observée lors de l'échantillonnage sur les sites 1 et 2 seulement.

L'espadon (*Xiphias gladius*), espèce classée quasi-menacée (NT) sur le Liste Rouge IUCN a également été détectée sur 3 sites (pélagos 5, 6 et 8) à l'Est de la Corse et au sud-est de l'île du Levant.

Il convient d'interpréter ces résultats en notant que l'ADNe ne permet pas de différencier les stades de vie des espèces (larvaire, juvénile ou adulte). Ainsi, certaines espèces détectées peuvent être présentes uniquement à certains stades de leur cycle de vie, et donc assurer différentes fonctions écologiques. L'ADNe ne permet également pas de quantifier l'abondance ni la biomasse car la méthode ne renseigne ni sur le nombre ni sur la taille des individus.

c. Crustacés

L'analyse VigiDNA M pour les crustacés marins représente une démarche pilote puisque ces échantillons sont les premiers échantillons marins pour lesquels SPYGEN a utilisé les amorces *Pleo*. Ces résultats sont donc une avancée significative en termes de retour d'expérience sur la pertinence des amorces pour les crustacés pélagiques. En revanche, la base de référence publique GENBANK est assez pauvre sur ce groupe taxonomique, en particulier sur les micro-crustacés pélagiques, qui constituent la grande majorité de la biomasse des crustacés du large.

L'analyse a permis d'identifier 5 taxons de crustacés sur l'ensemble des échantillons ADNe, tous des micro-crustacés pélagiques, dont un seul a pu être assigné au niveau de l'espèce. Quatre des taxons identifiés sont des copépodes, un groupe de petits crustacés (1 à 2mm), libres ou parasites, formant la base du zooplancton dans les eaux marines et les eaux douces. Les copépodes planctoniques jouent un rôle important dans les réseaux trophiques marins, ils constituent notamment l'alimentation favorites des espèces de poissons commerciaux tels que les sardines et anchois, et le cycle du carbone. Ils régulent les populations de protistes et d'algues unicellulaires. Ils contribuent au micromélange des couches d'eau par le battement incessant de leurs appendices natatoires.

Les copépodes forment un groupe extrêmement diversifié. On y distingue actuellement 9 ordres totalisant environ 210 familles, 2400 genres et plus de 14000 espèces dont plus de 10000 sont marines. Les quatre taxons détectés dans nos analyses sont de l'ordre des Calanoida, des copépodes libres (non parasites). L'ordre des Calanoida domine dans le plancton marin, où l'on dénombre dans certaines mers plusieurs dizaines de milliers d'individus de l'espèce dominante par mètre carré de surface. Nous avons détecté 3 taxons de la famille des Centropagidae, qui ne comprends que deux genres marins : *Centropages* et *Isias*. Un taxon est identifié à l'espèce *Centropages Kröyeri*, et un au genre *Centropages* sp. *C. Kröyeri* est une espèce à distribution épipélagique abondante en eaux tropicales et tempérées. L'autre famille de copépode identifié dans nos échantillons est la famille des Metridinidae, le plancton bioluminescent, qui comprend trois genres. Les communautés de copépodes de Méditerranée montrent généralement des variations saisonnières, liées à la température de l'eau et à la quantité de phytoplancton. Il serait donc intéressant d'effectuer des échantillonnages à différentes saisons.

Le dernier taxon identifié est assigné à la famille des Euphausiidae, qui correspond au krill. Le krill est formé de petits crustacés d'eaux froides qui constituent un élément fondamental du réseau trophique des écosystèmes marins. Ces crustacés sont de la classe des malacostracés (homards et crabes) et non pas des décapodes (crevettes) malgré leur ressemblance morphologique avec ces dernières. La plupart des espèces mesurent 1 à 2 cm à l'âge adulte, et se distinguent des autres crustacés par des branchies externes très développés. La plupart des espèces d'Euphausiacés migrent verticalement quotidiennement, ce qui nourrit les prédateurs près de la surface la nuit et dans les eaux plus profondes pendant la journée. Ils se regroupent en énormes bancs qui s'étendent sur des kilomètres avec des milliers d'individus concentrés dans un seul mètre cube d'eau. Le krill a un fort intérêt commercial dans de nombreux pays où il est utilisé en aquaculture, pour la fabrication d'aliments pour aquariums, comme appâts dans la pêche sportive ou dans l'industrie pharmaceutique. Au Japon, aux Philippines et en Russie, il est également utilisé pour la consommation humaine. Ils constituent également une source d'alimentation importante pour les baleines.

Le krill a été détecté en faible quantité dans un seul échantillon du site Pelagos 8. La communauté crustacé des sites est dominée par le genre *Centropages* sp. qui est détectée dans 13 des 24 échantillons avec un grand nombre de séquences d'ADN. Cette ou ces espèces semblent donc être les plus abondantes dans la zone d'étude. Le site Pelagos 6 présente la plus grande diversité de crustacés avec 4 taxons différents identifiés. Quatre sites n'ont aucun taxon détecté (Pelagos 4, 9, 11 et 12) dans aucun des deux répliques terrain. Il est cependant important de noter qu'une majorité des séquences ADN ne peuvent être assignées à aucun ordre, famille, genre ou espèce en raison du manque de couverture de la base de référence. Il est en effet très improbable que les échantillons ne contiennent pas de microcrustacés pélagiques, il est plus vraisemblable qu'aucune assignation taxonomique n'ai pu être faite en raison du manque de séquence de référence pour les organismes présents. Il sera intéressant de refaire l'analyse bioinformatique après avoir complété la base de référence pour les espèces de microcrustacés les plus abondantes de Méditerranée.

7) Conclusions

Cette étude pilote en Metabarcoding d'ADNe en milieu hauturier dans le cadre de l'expédition Pélagos a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- ✓ L'échantillonnage ADNe de surface en zone hauturière donne un nombre d'espèces de poissons limité par rapport au milieu côtier, en raison de la plus faible biodiversité et densité d'organismes au large, mais également d'une probable dilution plus rapide de l'ADNe dû au mouvement des masses d'eau. Il serait donc intéressant de filtrer des volumes d'eau plus grand (60 à 90L) afin de maximiser la détection des espèces les plus rares (par exemple les requins).
- ✓ Les résultats des analyses ADNe sur les mammifères marins montrent une présence d'au moins une espèce de mammifère sur 11 des 12 sites d'échantillonnage, ce qui indique une présence de mammifères sur l'ensemble du sanctuaire Pélagos et renforce l'importance de cet espace pour la protection de l'espace de vie des mammifères marins.
- ✓ La famille Delphinidae a été détectée dans tous les sites sauf un, il peut s'agir d'une ou plusieurs des 3 espèces de la famille présentes sur le Pélagos : le dauphin commun, le dauphin bleu et blanc et le grand dauphin. Le rorqual commun a été détecté de manière concordante avec les observations terrain. Deux haplotypes (une ou plusieurs espèce(s) ayant la même séquence du marqueur Mamm01) d'odontocètes (cétacés à dents incluant notamment le cachalots et les baleines à bec) ont également été détectés sur 4 sites.
- ✓ Le manque de résolution taxonomique des assignations pour les mammifères marins (les espèces ne peuvent pas être distinguées les unes des autres) vient de leur très forte similarité génétique pour ce groupe, et du fait que la variabilité intraspécifique (différence génétique entre individus au sein de l'espèce) est parfois plus importante que la variabilité entre les espèces. Le développement d'un nouveau marqueur situé sur une zone plus variable (ex : D-loop) pourrait permettre d'affiner ces assignations.
- ✓ La communauté ichtyologique détectée dans les échantillons est cohérente avec la communauté attendue en zone hauturière sur des fonds de profondeur importante (550 à 2750m), avec une large dominance d'espèces pélagiques et très peu d'espèces benthiques.
- ✓ Plusieurs espèces menacées ont été détectées, en particulier le diable de mer et le poisson lune détectés respectivement dans 5 et 3 des sites. Ces espèces emblématiques semblent donc être présentes sur l'ensemble de la zone Pelagos.
- ✓ Les sites présentant la plus grande diversité en poissons (Est de la Corse) ne sont pas ceux dans lesquels le plus de mammifères sont détectés (radiale Calvi-Nice et ouest de le Corse).
- ✓ Quelques espèces de profondeur tels que les poissons lanternes (famille des Myctophidae), ont été détectées dans plusieurs échantillons. Il pourrait s'agir de stades larvaires pélagiques.
- ✓ Les analyses crustacées présentent un pilote intéressant pour ce groupe taxonomique qui constitue un élément fondamental du réseau trophique marin, en particulier en milieu pélagique. La couverture de la base de référence est cependant faible ce qui limite fortement l'assignation des séquences ADNe. Il paraît donc indispensable de compléter la base de référence pour les espèces de microcrustacés les plus abondantes de Méditerranée.

8) Commentaires

Les résultats concernant la détection d'espèces consommées doivent être interprétés avec précaution. En effet l'ADN de ces espèces peut se retrouver dans le milieu même si les individus ne sont pas réellement présents (suite à de la consommation humaine ou déchets de pêche), notamment s'il y eu du poisson à bord du bateau depuis lequel les prélèvements ADNe ont été effectués.



Tél. : +33 (0)4 79 26 15 83
contact@spygen.com

SPYGEN S.A.S.
Savoie Technolac - BP274
17, rue du Lac Saint-André
73375 Le Bourget du Lac Cedex
FRANCE

www.spygen.com