

METHODOLOGIE

Acquisition des données ADNe

La collecte des échantillons d'ADN environnemental est réalisée à l'aide d'une technique développée par la société SPYGEN (<http://www.spygen.com/fr/>), permettant la filtration de 30 litres d'eau à travers une capsule de filtration à 0,2 μm . Plus précisément, les kits **VigiDNA MW1** sont utilisés. Ces kits stériles intègrent les consommables nécessaires pour l'échantillonnage et notamment un tuyau, une crépine, une capsule de filtration à très faible porosité (0,2 μm) et un tampon de conservation de l'ADN (CL1). Ces kits sont stériles afin de prévenir toute contamination par de l'ADN humain ou autres ADN.

Deux types de transects sont réalisés.

Les transects en surface sont réalisés avec une pompe péristaltique alimentée par une batterie 12V. L'échantillonnage se fait par filtration de 30 litres d'eau de mer, en surface, par transect, depuis le bateau. Les transects seront réalisés au plus proche de la côte sur une distance de 5 km (1 aller/retour). La vitesse du bateau doit être de 10 km/h, afin de filtrer 30 L en 30 min sur 5km. L'ADNe est prélevé dans la capsule de filtration.

Les transects en plongée sont réalisés à l'aide d'une pompe étanche fixée sur un scooter sous-marin. Ainsi, l'échantillonnage se fera par filtration de 30 litres d'eau de mer, directement sur le fond, au plus près du substrat, pour optimiser les chances de détecter les espèces.



Figure 1 Systèmes d'échantillonnage d'ADN environnemental

L'extraction (réalisée en salle blanche), l'amplification, le séquençage de l'ADNe (technologie Miseq®) et les analyses bioinformatiques sont réalisés par SPYGEN, selon les protocoles présentés dans ces deux publications scientifiques : Valentini et al. 2016 et Pont et al. 2018. 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). Avant la PCR, un tag est ajouté à chaque échantillon, afin de pouvoir l'identifier. Après l'amplification, les échantillons sont titrés par électrophorèse et purifiés. Le séquençage sera réalisé avec un séquenceur Illumina Miseq. 12 PCR seront réalisées sur chaque échantillon pour plus de robustesse, et une PCR de contrôle sera réalisée pour évaluer la contamination.

Afin de pouvoir assigner un taxon aux séquences génétiques amplifiées dans nos échantillons ADNe, il est nécessaire de construire une base de référence taxonomique au préalable avec les espèces pour

lesquelles une séquence d'ADN de 12S contenant l'amorce utilisée est déjà connue. Nous utilisons pour cela la liste des poissons de la mer Méditerranée de FishBase (<http://fishbase.mnhn.fr>), et les informations taxonomiques trouvées sur NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), que nous comparons à la liste des séquences du fragment de gène mitochondrial 12S des Actinoptérygiens et Chondrichthyens de la base de données European Nucleotide Archive (www.ebi.ac.uk/ena). Nous avons complété ces bases 12S récemment ; nous sommes donc en mesure d'identifier plus de 90% des espèces des côtes méditerranéennes occidentales.

Les séquences sont alignées avec le logiciel U-GENE. Pour chaque espèce, nous renseignons également son statut de conservation IUCN, son habitat et sa provenance (native, endémique, introduite). Les séquences de mauvaise qualité sont éliminées. Les séquences identiques sont regroupées en exemplaire unique afin de ne conserver qu'un seul exemplaire de chaque séquence.

La méthode d'assignation est réalisée avec la fonction ecotag du package ObiTools. Le programme utilise 3 entrées : les séquences devant être assignées, une base de données taxonomique renseignant les relations entre taxons, et la base de référence des poissons de méditerranée, dont l'identifiant unique permet de les relier à la taxonomie. Ecotag compare chaque séquence à la base de référence et calcule la similarité comme le ratio entre la longueur de la plus longue chaîne commune et la longueur du plus court alignement correspondant. Ecotag ne garde ensuite que les séquences qui ont la plus grande similarité et leur assigne le taxid du taxon correspondant. Si l'assignation à l'espèce ne peut se faire précisément (>98%), le programme assignera à la séquence le genre (96-98%) ou la famille (90-96%) ou remontera au dernier ancêtre commun selon la base de référence.

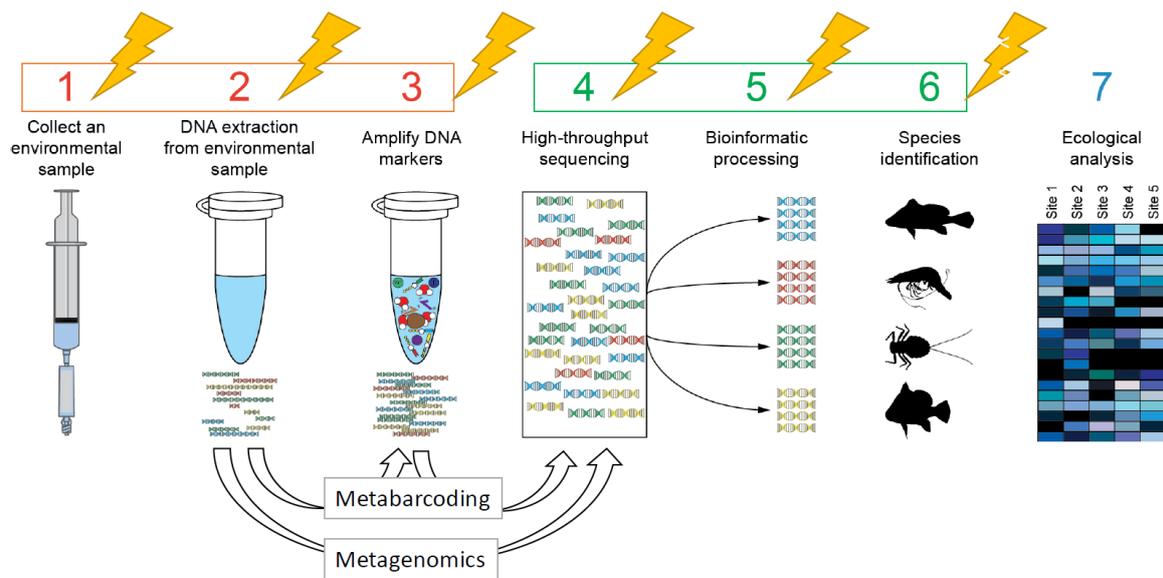


Figure 2 Schéma récapitulatif de la chaîne de traitement des échantillons d'ADN

Analyse des données

L'analyse des échantillons d'ADN environnemental permet d'obtenir une liste des espèces observées.

Plusieurs informations ont été extraites de la base de données « FishBase » (Froese and Pauly, 2015) pour les espèces de poissons identifiées dans les vidéos :

- Taille maximale d'un individu de l'espèce ;
- Groupe trophique (régime alimentaire): herbivore, zooplanctonivore diurne ou nocturne, macrocarnivore, mesocarnivore, piscivore ou omnivore.
- Habitat préférentiel
- Statut de protection UICN
- Températures habituelles d'observation

Description des assemblages

La base de données est manipulée et analysée avec le logiciel R (R Core Team, 2016). La première phase de l'analyse des données consiste à dresser une description des cortèges ichtyologiques des sites échantillonnés. Pour ce faire, nous avons retenu plusieurs **descripteurs et indices de diversité** dont la formule et la définition sont indiquées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Descripteurs des assemblages ichtyologiques

Descripteurs	Formules	Composants	Finalités
Richesse spécifique			nombre d'espèces comptées sur un point d'échantillonnage
Indicateur de diversité fonctionnelle			diversité des traits écologiques (régime alimentaire, croissance, reproduction, taille etc..) au sein d'un site
Large Reef Fish Indicator			nombre d'espèces de poissons de récif de grande taille (20 cm ou plus à l'âge adulte)
Indicateur crypto-benthique			nombre d'espèces de poissons de récif de petite taille 10 cm ou moins à l'âge adulte)
Indicateur UICN			Nombre d'espèces présente sur la liste rouge de l'UICN
Indicateur non indigène			Nombre d'espèces invasives ou exotiques

	présentes sur le site échantillonné
Indicateur thermique	température "préférée" des espèces de poissons sur un site

Ces indicateurs sont calculés à différentes échelles :

- **Site** (trois habitats confondus) ;
- **Site-Habitat** (habitat pour chaque site) ;
- **Habitat** (tous sites confondus).

Les données sont analysées à l'aide de modèles et de méthodes statistiques classiques (modèle linéaire, test de Fisher, test de Student, ...) pour faire ressortir les relations entre indicateurs et variables explicatives.