

RAPPORT D'ANALYSE



SOMMAIRE

1. DESCRIPTION DU PROJET	3
2. FICHE TERRAIN (INFORMATIONS SUR L'ECHANTILLONNAGE)	4
3. RESULTATS	5
4. COMMENTAIRES :	6
5. METHODOLOGIE	7

Rédacteur : Axelle Ducrocq

Date de rédaction : 5 novembre 2025

Valideur : Julien Planchon

Date de validation : 5 novembre 2025



1. Description du projet

Code étude : DE-25-0046

Client : EDF - Recherche et Développement

- **Adresse :** EDF Lab Chatou, 6 quai Watier, 78400 CHATOU
- **Contact :** Monsieur Antonin Conan
- **Email :** antonin.conan@edf.fr

Responsable de l'étude : Axelle Ducrocq axelle.ducrocq@spygen.com

Type d'analyse : Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Amphibiens en Petit(s) milieu(x) stagnant(s).

Nombre d'échantillons : 1 – lot 4

2. Fiche terrain (Informations sur l'échantillonnage)

Code SPYGEN	Code du site	Nom du site	Date d'échantillonnage	Heure	Type de milieu (Courant / Stagnant)	Type de kit (Louche / Tuyau)	Réplicat terrain 1 ou 2 (si existant)	Volume filtré (Kit louche)	Nom du préleveur	Espèces / groupes taxonomiques recherchés	Commentaires
SPY2500160	BLE01	Blenod Bassin 1	25/09/2025	10h	Stagnant	Louche	1	2L	Antonin	Amphibiens	

Formation à l'échantillonnage par SPYGEN : Formé

Autres commentaires :

3. Résultats

Les résultats sont présentés ci-dessous dans le tableau I.

➤ **VigiDNA M Amphibiens**

La liste des espèces ne pouvant pas être différenciées est présentée dans le chapitre 5. [Méthodologie](#).

Tableau I : Liste des taxons de Amphibiens détectés. Lot 4.

			Blenod Bassin 1	
			Ble01	
			SPY2500160	
Nom scientifique	Statut	Base de référence	Nombre de réplicats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN
<i>Pelophylax ridibundus</i>	LC	SPYGEN	11	11 990



4. Commentaires :

L'ADN d'espèces consommées ou d'aquariums peut se retrouver dans le milieu même si les individus ne sont pas réellement présents (suite à des rejets de station d'épuration ou de pisciculture par exemple). Si des espèces consommées des données obtenues avec GenBank® sont présentes dans vos résultats, il convient donc de les interpréter avec précaution.

Les taxons peuvent être détectés avec les bases de références SPYGEN® ou GenBank®. Les données présentes dans la base de références SPYGEN® ont été validées par SPYGEN® et ses partenaires. La base de références GenBank® est cependant une base de référence publique et SPYGEN® ne peut garantir la fiabilité des données qu'elle contient.

5. Méthodologie

Spécialisée dans la détection de l'ADN environnemental (ADNe) et plus précisément dans l'ADNe des espèces rares, SPYGEN conçoit depuis 2011 des protocoles d'échantillonnage et d'analyse permettant de maximiser la capacité de détection des traces d'ADN libérées par les taxons recherchés tout en limitant les risques de contaminations. Nos capsules de filtration, développées pour filtrer de grands volumes d'eau, possèdent une membrane de 500 cm² de surface avec une porosité de 0.45 µm et permettent de réaliser un échantillonnage intégrateur sur plusieurs habitats aquatiques.

5.1. Rappel des préconisations d'échantillonnage :

Les stratégies d'échantillonnage à mettre en place dépendent du milieu étudié. Un rappel de la méthodologie employée est donné ci-après pour les 3 types de milieux étudiés : les milieux courants, les petits milieux stagnants et les grands milieux stagnants.

En milieux stagnants :

Les milieux stagnants constituent des milieux relativement fermés. L'ADNe est disponible plus longtemps dans ces milieux plus stables mais sa répartition est plus hétérogène. Le protocole d'échantillonnage est adapté à ces conditions spécifiques :

Cas des petits milieux stagnants (<1 ha environ et/ou périmètre inférieur à 400 m) :

- Réalisation à l'aide d'une louche de 20 sous-prélèvements de 100 ml dans les habitats favorables aux taxons recherchés tout autour du site étudié. Les 2 L d'eau ainsi prélevés sont ensuite filtrés à travers une capsule de filtration. La louche peut être accrochée au bout d'une perche si la ligne d'eau est difficilement accessible ;
- Favoriser la prospection des habitats spécifiques des groupes taxonomiques et des espèces recherchés permet de maximiser les chances de détection des espèces rares ou localisées dans certains habitats ;
- Méthode préconisée sur les plans d'eaux allant jusqu'à 10 ha lorsque l'utilisation d'une embarcation est impossible.

Cas des milieux stagnants de taille intermédiaire (comprise entre 1 et 10 ha et/ou périmètre compris entre 400 et 2000 m) :

- Si aucune embarcation n'est disponible ou si les conditions locales n'en permettent pas l'utilisation, appliquer le protocole conseillé pour les petits milieux stagnants en respectant le nombre d'échantillons à réaliser au prorata de la taille du plan d'eau ;
- Si une embarcation est disponible, utiliser le protocole conseillé pour les grands milieux stagnants en utilisant un kit de filtration sans réplica.

Cas des grands milieux stagnants (>10 ha environ et/ou périmètre supérieur à 2000 m) :

- Réalisation d'un échantillonnage par pompage de 30 L (pompe péristaltique) à l'aide d'une embarcation avançant à vitesse réduite et réalisés sous forme de transects de 2 à 2,5 km de long à moins de 5 m des berges ;
- Un réplica en cas de milieu turbide pour environ 10 ha de surface mouillée.



5.2. Protocole d'analyse et contrôles qualité :

Les expertises ADN environnemental (ADNe) offrent aujourd'hui des perspectives extraordinaires pour le suivi et la conservation de la biodiversité. Néanmoins, travailler sur de l'ADN rare et/ou dégradé occasionne des contraintes importantes au laboratoire. En effet, il est nécessaire de garantir que l'ADN amplifié à partir d'un échantillon environnemental n'est pas lié à une contamination. Pour cela, la plateforme d'analyse ADNe de SPYGEN est composée de plusieurs salles de laboratoires dont certaines sont de type « salle blanche » et possèdent tout particulièrement deux salles dédiées à l'analyse de l'ADN rare et/ou dégradé. Le personnel utilisant ces laboratoires est formé aux différentes techniques utilisées au sein de SPYGEN et doit respecter des pratiques spécifiques à ce type d'analyses en particulier porter les équipements de protection adaptés et l'utilisation des appareils et matériels développés pour les analyses de l'ADNe.

Métabarcoding – VigiDNA M

Notre processus standard de traitement d'un échantillon en VigiDNA M est le suivant :



PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON



EXTRACTION DE L'ADN



AMPLIFICATION DE L'ADN



SÉQUENÇAGE DE L'ADN



ANALYSE BIOINFORMATIQUE



RÉSULTAT : IDENTIFICATION DES ESPÈCES

Le protocole d'extraction de l'ADN a été développé et optimisé sur ces 10 dernières années par les experts de SPYGEN afin de récupérer la plus grande quantité d'ADN y compris le rare et/ou dégradé, issue des capsules de filtration VigiDNA[®]. Ce savoir-faire inclut tout un processus de limitation des contaminations croisées entre échantillons ainsi que la présence systématique de contrôles négatifs en parallèle des échantillons.

L'étape de l'amplification de l'ADNe est une des étapes cruciales du processus d'analyse de l'ADNe, les extraits ADN sont amplifiés à l'aide de couples d'amorces universels développés et validés par nos experts afin de garantir un équilibre entre la détection d'ADN dégradé (fragments courts) et une résolution taxonomique maximale (détection à l'espèce). L'une des spécialités de SPYGEN est la recherche d'espèces rares, afin d'augmenter la possibilité d'observer ces espèces rares dans les échantillons d'ADNe, les PCR sont réalisées 12 fois, on parle alors de répliquas PCR. Ainsi une espèce observée dans 1 répliqua sur 12 est plus rare qu'une espèce observée dans 11 répliquas sur 12. SPYGEN pionnier dans son domaine est aussi le détenteur exclusif de 5 brevets sur des couples d'amorces universels qui ont démontrés leurs efficacités dans les différentes publications scientifiques (disponibles sur demande).

Le séquençage de l'ADNe nouvellement amplifié est la continuité du processus d'analyse. Cette étape permet d'obtenir une lecture des nucléotides qui composent les fragments d'ADNe. Cela se réalise avec des protocoles, spécifiquement développés et optimisés pour favoriser la détection d'espèces rares et limiter les erreurs de séquençage. Aujourd'hui le séquençage se réalise sur des appareils dit « haut rendement » qui permettent l'obtention d'un grand nombre de séquences, rapidement et d'une grande qualité.



S'en suit l'étape de l'analyse bio-informatique, SPYGEN a développé un logiciel bio-informatique qui permet de trier et filtrer les séquences obtenues afin d'éliminer les erreurs dues à l'amplification ou au séquençage. SPYGEN s'est appuyé sur ses 10 années d'analyses de l'ADNe pour l'établissement des seuils bio-informatiques permettant de différencier une séquence réelle d'une espèce rare, d'un bruit de fond issu d'une erreur de séquençage ou d'une erreur d'amplification, minimisant ainsi les faux positifs et les faux négatifs.

C'est également lors de cette analyse que les séquences sont comparées aux bases de références d'espèces. Aujourd'hui SPYGEN possède plusieurs bases de références privées contenant plus de 2000 espèces de vertébrés à l'échelle mondiale. Ces bases sont en partie construites sur des spécimens fournis par nos partenaires institutionnels tels que l'OFB et le MNHN et sont dûment vérifiées et validées génétiquement par nos experts en interne ainsi que confirmées par les données de terrain. SPYGEN utilise également la base de références internationale GenBank afin de compléter ses bases de références internes et dans un souci d'être le plus exhaustif possible dans la détermination des espèces. Il est à noter que l'ensemble des bases de références (internes et mondialement partagées) font l'objet de mises à jour régulières par nos experts en interne.

Dans le cas de l'analyse VigiDNA M, les résultats se présentent sous la forme d'une liste d'espèces par échantillon associées à un nombre de répliques PCR positif quand il est disponible (pour les amphibiens et les poissons) et un nombre de séquence ADN.

Aide à l'interprétation des résultats VigiDNA M (Métabarcoding) :

Les résultats d'analyse sont présentés sous forme de tableau comme dans les exemples suivants. La ou les bases de référence génétiques utilisées (bases de références de SPYGEN et /ou bases de référence mondialement partagées ainsi que leurs numéros de versions) sont rappelés dans les tableaux de résultats :

Tableau 1: Exemple de résultats d'analyses ADNe pour les poissons

Nom scientifique	Base de référence	Station n°1		Station n°2	
		SPYXX1234	SPYXX1235	SPYXX1234	SPYXX1235
		Nbr de répliques positifs	Nbr de séquences ADN	Nbr de répliques positifs	Nbr de séquences ADN
<i>Anguilla anguilla</i>	SPYGEN			12	59195
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	SPYGEN		*	6	3854
<i>Oncorhynchus sp.</i>	GenBank v247			2	1235
<i>Phoxinus sp.</i>	SPYGEN			12	215077
<i>Pseudorasbora parva</i>	SPYGEN			7	3527
<i>Salaria fluviatilis</i>	SPYGEN			12	23375
<i>Salmo trutta</i>	SPYGEN	11	324240	12	164497

Tableau 2: Exemple de résultats d'analyses ADNe pour les bivalves

Ordre	Nom scientifique	Base de référence	Station n°1	Station n°2	Station n°3
			SPYXX1234	SPYXX1235	SPYXX1236
			Nombre de séquences ADN	Nombre de séquences ADN	Nombre de séquences ADN
Unionida	<i>Unio mancus</i>	SPYGEN	14 511	14 511	14 511
Venerida	<i>Euglesa milium</i>	SPYGEN	1 166	1 166	1 166
Venerida	<i>Euglesa subtruncata</i>	SPYGEN	926	926	926
Venerida	<i>Sphaerium lacustre</i>	SPYGEN	1 766	1 766	1 766
Venerida	<i>Sphaerium ovale</i>	SPYGEN	57	57	57
Venerida	<i>Sphaerium sp.</i>	SPYGEN	126	126	126



Les résultats des analyses pour les espèces piscicoles (Cf. tableau 1) et pour les amphibiens (non présentés ici) mettent en évidence deux paramètres, le nombre de répliques positifs et le nombre de séquences lues par espèce et par échantillon lors de l'analyse associée. Dans le cas des analyses VigiDNA M réalisées sur les autres groupes taxonomiques, seul le nombre de séquences lues est présenté dans les résultats (Cf. tableau 2).

Nombre de répliques positifs (cas des analyses sur les poissons et les amphibiens) :

- Le nombre de répliques positifs correspond au nombre de fois où, sur les 12 amplifications réalisées par échantillon, l'ADN du taxon indiqué, a été détecté,
- Plus ce nombre est élevé, plus la quantité d'ADN pour ce taxon est importante dans l'échantillon,
- Une case vide correspond à une absence de détection, soit aucune amplification positive sur les 12 réalisées,
- Une case remplie du symbole « * » indique la détection d'une faible quantité d'ADN de l'espèce considérée dans l'échantillon de base mais pas en quantité suffisante pour permettre de conclure à la présence avérée de l'ADN de cette espèce dans l'échantillon ou à la positivité d'un réplique.

Nombre de séquences (cas général) :

- Le nombre de séquences affiché dans le tableau représente le nombre de séquences ADN lues lors du séquençage. Il est corrélé au nombre de brins d'ADN initialement présents dans l'échantillon de base et constitue donc l'abondance de ces derniers dans l'échantillon.
- Cette valeur peut être comparée au sein d'un même échantillon et d'un même groupe taxonomique. Par exemple, dans le tableau 1, il peut être conclu qu'il y a une proportion relativement comparable de *Pseudorasbora parva* et d'*Oncorhynchus mykiss* dans le milieu d'où est issu l'échantillon à droite du tableau. D'autre part, dans le cas de nombre de séquences différentes, l'abondance des espèces les unes par rapport aux autres peut être déduit directement de ces valeurs,
- Il est possible de comparer les nombres de séquences d'un échantillon à l'autre, au sein d'un même groupe taxonomique mais seulement en regard de l'abondance relative des séquences d'un échantillon à l'autre. Par exemple, dans le tableau 1, les 324 240 séquences d'ADN de *Salmo trutta* représentent la totalité des séquences dénombrées dans le premier échantillon et 164 497 séquences dans le second. Conclure que l'abondance relative de l'ADN de *Salmo trutta* dans le premier échantillon est le double de celle du second est erroné. L'abondance relative de séquences de cette espèce dans le second échantillon est de l'ordre de 35 % ($164\,497 / 469\,525$), contre 100 % dans le premier, dans lequel il y avait donc 3 fois plus de brins d'ADN dans le milieu 1 que dans le milieu 2.

5.3. Limites des bases de références :

Amphibiens

Tableau annexe : Liste des taxons d'Amphibiens présents dans la base de références SPYGEN et ne pouvant pas être identifiés à l'espèce.

Nom scientifique tel que présenté dans les rapports	Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Bufo sp.</i>	<i>Bufo bufo</i> / <i>Bufo spinosus</i>	Crapaud commun / Crapaud épineux
<i>Pelophylax complexe 1</i>	<i>Pelophylax bedriagae</i> / <i>Pelophylax ridibundus</i>	Grenouille de Bedriaga / Grenouille rieuse
<i>Pelophylax complexe 2</i>	<i>Pelophylax kl. esculentus</i> / <i>Pelophylax lessonae bergeri</i> / <i>Pelophylax lessonae lessonae</i> / <i>Pelophylax ridibundus</i>	Grenouille commune / Grenouille de Berger / Grenouille de Lessona / Grenouille rieuse
<i>Pelophylax complexe 3</i>	<i>Pelophylax kl. grafi</i> / <i>Pelophylax perezii</i>	Grenouille de Graf / Grenouille de Pérez

Bivalves

Tableau annexe : Liste des taxons de Bivalves présents dans la base de références SPYGEN et ne pouvant pas être identifiés à l'espèce.

Ordre	Nom scientifique tel que présenté dans les rapports	Nom scientifique	Nom vernaculaire
Unionida	<i>Unio crassus spp.</i> <i>Unio mancus spp.</i>	<i>Unio crassus crassus</i> / <i>Unio crassus courtillieri</i> <i>Unio mancus mancus</i> / <i>Unio mancus requienii</i> / <i>Unio mancus turtonii</i>	Mulette épaisse / Mulette ligérienne Mulette méridionale / Mulette rhodanienne / Mulette corse
Venerida	<i>Corbicula sp.</i>	<i>Corbicula fluminalis</i> / <i>Corbicula fluminea</i> / <i>Corbicula leana</i>	Corbicule striée / Corbicule asiatique / Corbicule japonaise

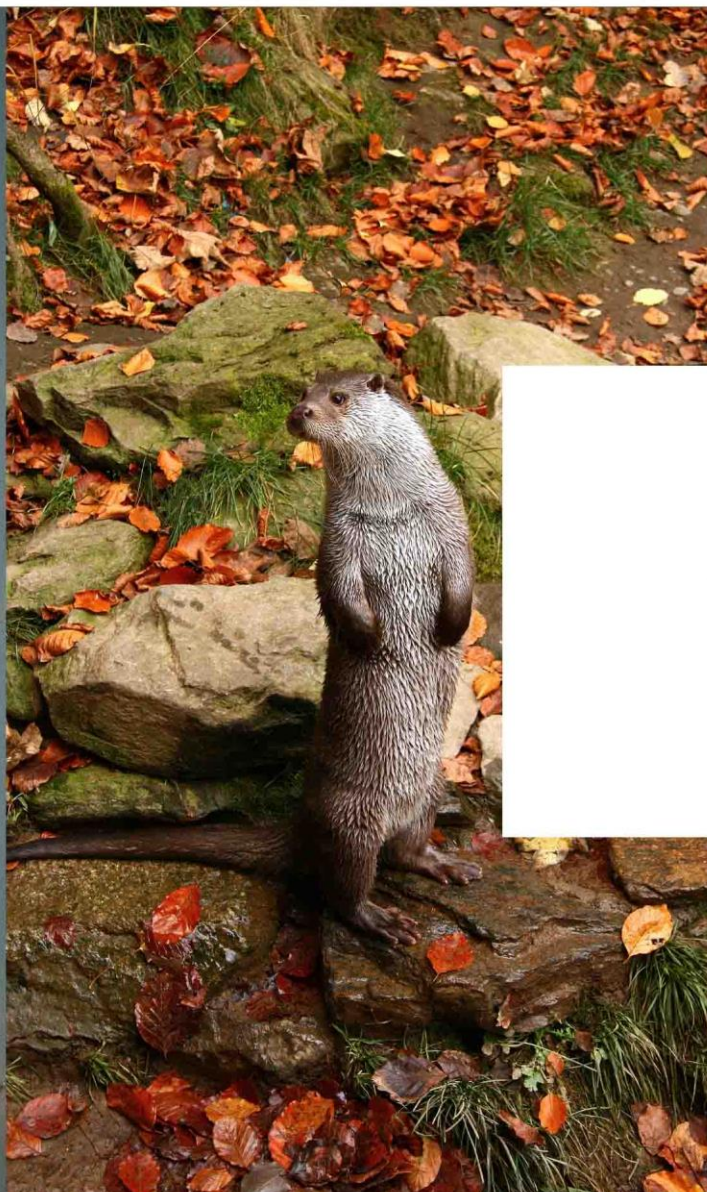
Mammifères aquatiques et semi-aquatiques

En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible de différencier le campagnol amphibie (*Arvicola sapidus*) des autres campagnols du genre *Arvicola sp.*.

Certains taxons de Poissons peuvent être identifiés au genre ou à la famille. Tous les taxons non identifiés à l'espèce dans la base de références SPYGEN sont détaillés dans le Tableau annexe ci-dessous. Il convient d'être vigilant lorsque *Barbus meridionalis* est détecté dans un échantillon où *Barbus barbus* est présent car ces deux espèces sont génétiquement proches (mélange de leur ADN mitochondrial).

Tableau annexe : Liste des taxons de Poissons présents dans la base de références SPYGEN et ne pouvant pas être identifiés à l'espèce.

Nom affiché sur les rapports	Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Alosa</i> sp.	<i>Alosa alosa</i> / <i>Alosa fallax</i>	Grande alose / Alose feinte
Ammodytidae	<i>Ammodytes marinus</i> / <i>Ammodytes tobianus</i> / <i>Hyperoplus lanceolatus</i>	Lançon équille / Lançon commun
<i>Barbatula</i> sp.	<i>Barbatula barbatula</i> / <i>Barbatula quignardi</i>	Loche franche / Loche du Languedoc
<i>Barbus barbus</i>	<i>Barbus barbus</i>	Barbeau fluviatile
<i>Barbus meridionalis</i>	<i>Barbus meridionalis</i>	Barbeau méridional
<i>Carassius</i> sp.	<i>Carassius auratus</i> / <i>Carassius carassius</i> / <i>Carassius gibelio</i>	Carassin doré / Carassin commun / Carassin argenté
<i>Coregonus</i> sp.	<i>Coregonus lavaretus</i> / <i>Coregonus oxyrinchus</i>	Lavaret / Bondelle
<i>Cottus</i> sp.	<i>Cottus aturi</i> / <i>Cottus duranii</i> / <i>Cottus gobio</i> / <i>Cottus hispaniolensis</i> / <i>Cottus perifretum</i> / <i>Cottus petiti</i> / <i>Cottus rhenanus</i>	Chabot du Béarn / Chabot d'Auvergne / Chabot commun / Chabot des Pyrénées / Chabot fluviatile / Chabot du Lez / Chabot de Rhénanie
Cyprinidae - Complexe 1	<i>Chondrostoma nasus</i> / <i>Parachondrostoma toxostoma</i> / <i>Telestes souffia</i>	Hotu / Toxostome / Blageon
Cyprinidae - Complexe 2	<i>Ctenopharyngodon idella</i> / <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Amour blanc / Carpe argentée
Cyprinidae - Complexe 3	<i>Abramis brama</i> / <i>Blicca bjoerkna</i>	Brème commune / bordelière
Cyprinidae - Complexe 4	<i>Alburnus alburnus</i> / <i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Ablette / Rotengle
<i>Gobio</i> sp.	<i>Gobio alverniae</i> / <i>Gobio gobio</i> / <i>Gobio lozanoi</i> / <i>Gobio occitaniae</i>	Goujon d'Auvergne / Goujon / Goujon de l'Adour / Goujon occitan
<i>Lampetra</i> sp.	<i>Lampetra fluviatilis</i> / <i>Lampetra planeri</i>	Lamproie fluviatile / Lamproie de Planer
<i>Leuciscus</i> sp.	<i>Leuciscus idus</i> / <i>Leuciscus leuciscus</i>	Gardon rouge / Vandoise
<i>Phoxinus</i> sp.	<i>Phoxinus bigerri</i> / <i>Phoxinus phoxinus</i> / <i>Phoxinus septimaniae</i>	Vairon basque / Vairon / Vairon du Languedoc
Pleuronectidae - Complexe 1	<i>Platichthys flesus</i> / <i>Pleuronectes platessa</i>	Flet d'Europe / Plie d'Europe
Pleuronectidae - Complexe 2	<i>Hippoglossoides platessoides</i> / <i>Limanda limanda</i>	Balai / Limande
<i>Pomatoschistus</i> sp.	<i>Pomatoschistus microps</i> / <i>Pomatoschistus minutus</i>	Gobie tacheté / Gobie buhotte
<i>Salvelinus</i> sp.	<i>Salvelinus fontinalis</i> / <i>Salvelinus alpinus</i>	Omble de fontaine / Omble chevalier



SPYGEN S.A.S

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

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