PROJET IRRAE 2021-2023

12 SEPTEMBRE 2023

ARBRE - Agence de Recherche pour la Biodiversité à la Réunion

Natacha Nikolic[1,2], Océane Desbonnes[1], Aurélie Bonin[3], Emmanuel Corse[1,4], Thierry Mulochau[1,5], Laure Inçaby[1], Luis Gustavo Cardoso[6], Eric Clua[7], Serge Planes[8], Héloïse Archambeau[3], Marie Pierron[3], Camille Sessegolo[3], Eva Bellemain[3], Estelle Crochelet[1]

Financements : DEAL, Région Réunion, ARBRE

(1) ARBRE, La Réunion - France
(2) INRAE, AQUA, France
(3) ARGALY, France
(4) Université de Mayotte
(5) BIORECIF, La Réunion - France
(6) IO-FURG, Afrique du Sud
(7) EPHE, France
(8) CNRS, France

Inventaire des requins autour de La Réunion à partir d'analyses d'ADN environnemental avec une approche écosystémique (élasmobranches et poissons osseux)

Projet IRRAE

Ce projet s'inscrit dans la continuité de deux projets :

- Le projet MAEO (porté par l'association ARBRE) qui vise à développer un observatoire des élasmobranches dans l'Archipel des Mascareignes, avec comme un des objectifs la caractérisation morphologique et taxonomique des populations d'élasmobranches présents dans les eaux réunionnaises et mauriciennes.
- Le projet MesoRun (porté par Vie Océane et BIORECIF, avec l'association ARBRE comme partenaire) dont l'objectif était de faire un inventaire faunistique non exhaustif sur certains sites situés en zone mésophotique (entre 50 et 150 m de profondeur) sur les pentes des récifs de La Réunion.

Objectifs de l'étude

L'ADN environnemental (ADNe) est un outil moléculaire permettant l'identification non-invasive de la présence d'espèces dans leur milieu. En capturant l'ADN des organismes laissé dans leur environnement, cette étude pilote a ainsi évalué les capacités de l'ADNe à détecter la présence des espèces d'élasmobranches.

Les objectifs de l'étude, développés au sein de ce rapport, sont multiples :

1) Comparer les amorces génétiques pour analyser leurs pouvoirs taxonomiques discriminants et proposer un protocole standardisé afin de détecter les différentes espèces d'élasmobranches dans les eaux réunionnaises.
2) Établir les démarches techniques et les rendre accessibles pour prélever les volumes d'eau de surface marine et sédimentaires nécessaires pour cette détection.
3) Fournir une cartographie des inventaires taxonomiques.
4) Saisir les résultats de ces inventaires dans la base de données Borbonica.
5) Comparer les résultats de détection des espèces avec les résultats déjà obtenus par MAEO (UVC et vidéos).

Liens du projet IRRAE :
https://arb-reunion.fr/nos-projets/projet-irrae/
https://www.facebook.com/arbreunion/posts/7973586226017314/

Table des matières

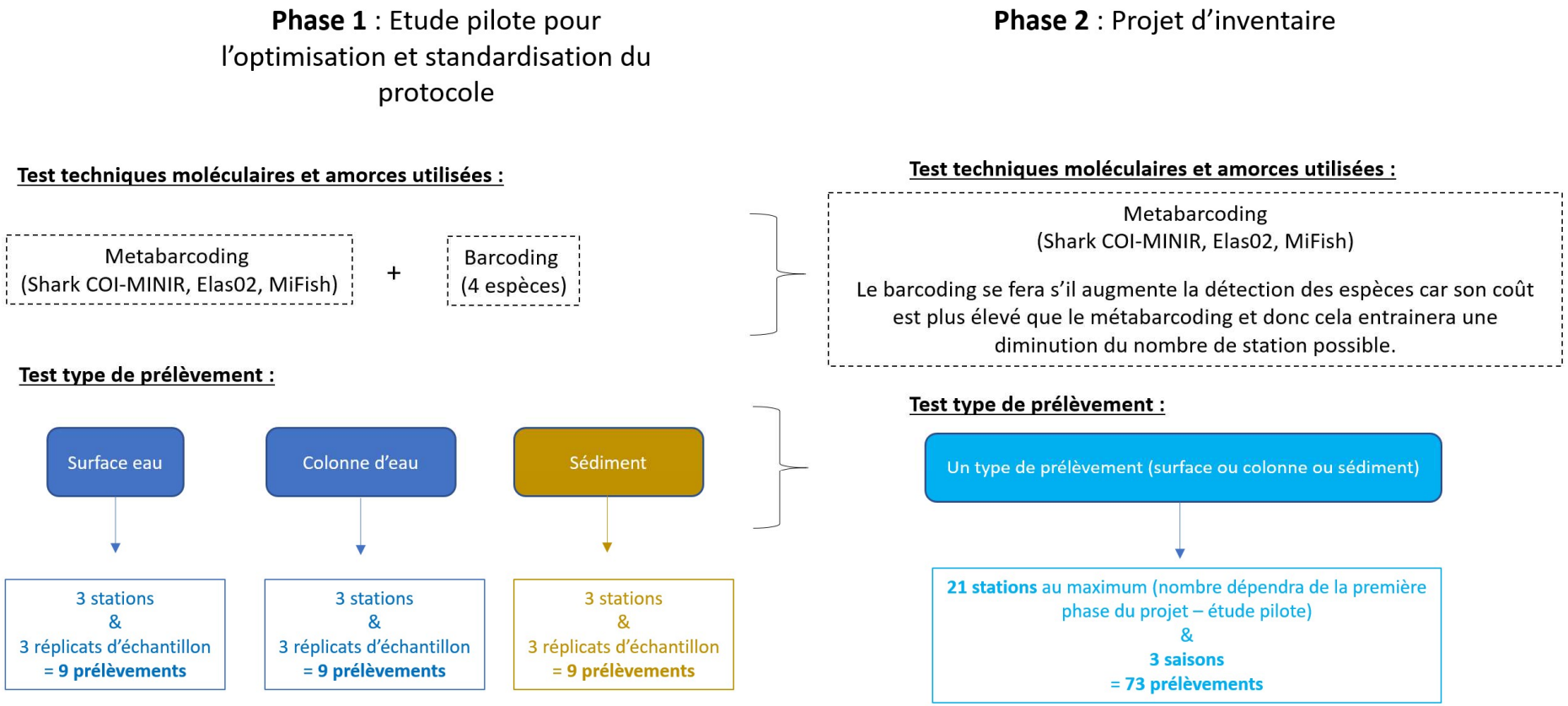
I. RÉSUMÉ DE L'ÉTUDE 4
II. ETUDE PILOTE – 1ère phase 1
A) Objectifs 1
B) Matériel et méthode 2
C) Résultats et discussion 8
III. INVENTAIRE – 2ème phase 15
A) Objectifs 15
B) Matériel et Méthode 16
C) Résultats et discussion 22
IV. APPROCHE ÉCOSYSTÉMIQUE 43
V. COMPARAISON RÉSULTATS - IRRAE et MAEO 45
VI. COMPARAISON RÉSULTATS - IRRAE et CSR 49
VII. LIVRABLES ET CONCLUSIONS 51
VIII. REMERCIEMENTS 52
IX. RÉFÉRENCES 53
X. ANNEXES 55

I. RÉSUMÉ DE L'ÉTUDE

Ce projet est divisé en deux volets (Figure A). Le premier volet, nommé étude pilote, avait pour objectif d'optimiser une méthode non invasive, reproductible et standardisée pour effectuer l'inventaire et le suivi des requins autour de La Réunion, en complétant par une approche écosystémique par l'étude des autres élasmobranches (raies) et des poissons osseux. Pour cela, nous avons utilisé une méthode génétique, l'ADN environnemental (ADNe), qui consiste à identifier les espèces à partir de leur ADN présent dans l'environnement, sans observation directe des animaux *in-situ*. A partir des traces d'ADN contenues dans les échantillons environnementaux (eaux de surface et dans la colonne d'eau, ainsi que les sédiments), cette approche innovante a été comparée selon les procédés moléculaires (métabarcoding et barcoding) pour optimiser la détection des espèces. Cette optimisation a permis de produire un protocole reproductible et standardisé pour le suivi et la veille environnementale des requins et des raies autour de La Réunion.

Le second volet de ce projet fourni une première représentation par cette technologie de la présence des requins et des raies autour de l'île, de mars à novembre 2022. De par l'utilisation d'amorces génomiques universelles sur les poissons et les élasmobranches, cette étude apporte des connaissances sur la répartition géographique de ces espèces avec l'identification de 6 espèces de requin et 9 espèces de raies (Requin-tigre - *Galeocerdo cuvier,* Requin bouledogue - *Carcharhinus leucas*, Requin dormeur - *Centroscymnus owstoni*, Requin pointe blanche - *Carcharhinus albimarginatus*, Requin sagrin - *Loxodon macrorhinus*, Requin-marteau halicorne - *Sphyrna lewini*, Raie aigle - *Aetobatus sp*., Raies pastenagues - *Dasyatis sp*., Raie pastenagues à taches noires - *Taeniurops meyeni* nommée auparavant *Taeniura meyeni*, Raie diable - *Mobula sp*., Petite manta - *Mobula thurstoni*, Raie grise ou raie fouet - *Pateobatis fai*, Raie à museau – *Rhinoptera sp*., Grande raie-guitare - *Rhynchobatus djiddensis*, Raie torpille - *Torpedo sp.*). De plus, cette étude apporte des connaissances écosystémiques pour entrevoir le potentiel de cette technologie (ADNe et métabarcoding) sur l'ensemble de l'ichtyofaune.

Figure A. Stratégie d'articulation des deux phases du projet.



II. ETUDE PILOTE – 1ère phase

A) Objectifs

L'ADN environnemental (ADNe) est un outil moléculaire permettant l'identification de la présence d'espèces dans leur milieu, de façon non-invasive. L'un des objectifs du premier volet de ce projet (« étude pilote ») était ainsi de s'appuyer sur les capacités de l'ADNe pour comparer la présence des espèces par des prélèvements sur sédiments et dans les eaux de surface et de la colonne d'eau. Les comparaisons d'échantillons environnementaux sont particulièrement importantes pour fournir des conseils sur les meilleures pratiques en matière de détection des espèces, d'autant que certaines études montrent que des plus grandes richesses d'espèces sont détectées dans les sédiments par rapport à l'eau de surface ou de la colonne d'eau (Holman et al. 2019), et que les concentrations en ADN pourraient être plus élevées dans les sédiments que dans l'eau (Sakata et al. 2020 ; Turner et al. 2015).

L'objectif de cette étude pilote était ainsi d'évaluer la méthodologie ADNe la plus adaptée, en termes de type d'échantillons et d'amorces, pour détecter les élasmobranches sur trois stations autour de La Réunion. Dans ce cadre, plusieurs types d'échantillons ont été testés : sédiments collectés sur les fonds marins, filtrations d'eau à la surface et filtrations d'eau dans la colonne d'eau. Plusieurs couples d'amorces publiés dans la littérature ont été évalués : Elas01 (Miya et al. 2015), Elas02 (Taberlet et al. 2018 ; amorces optimisées à partir de celles de Miya et al. 2015) et Shark-miniCOI (Field et al. 2015 ; Baker et al. 2018). Le protocole de détection des élasmobranches a été optimisé et rendu public dans ce document.

Deux types de techniques moléculaires ont été utilisées. Une première technique, dite de métabarcoding, permet d'obtenir les séquences ADN présentes dans l'échantillon de plusieurs espèces. C'est une approche qui ne cible pas de taxon *a priori* (approche non ciblée) et utilise des amorces PCR « universelles ». Les expertises basées sur l'approche « métabarcoding ADNe » sont notamment utilisées pour le suivi de groupes taxonomiques à enjeux dans les écosystèmes aquatiques et terrestres. Cette approche multi-spécifique est basée sur des techniques de taxonomie moléculaire utilisant des couples d'amorces universelles et des technologies de Séquençage Nouvelle Génération (NGS). Elle permet ainsi une détection à l'aveugle par caractérisation génétique de l'ensemble des espèces d'un groupe ciblé sur un site étudié. Il était donc indispensable de tester cette méthode d'autant qu'elle est actuellement la plus rapide et la moins coûteuse pour évaluer la biodiversité des systèmes écologiques riches en espèces difficiles à déterminer ou inconnues. Pour cette technique, nous avons utilisé trois amorces mitochondriales utilisées dans la littérature, Shark-miniCOI (COI), Elas01 (12S), et Elas02 (12S), décrites dans la Table 3 de ce rapport.

Ces amorces sont normalement dédiées pour identifier les espèces de requins (Shark-miniCOI), d'élasmobranches (Elas02) et de poissons (Elas01 qui est l'équivalent du MiFish). L'approche par métabarcoding permet également de fournir des inventaires sur d'autres espèces et ainsi d'avoir une vision plus écosystémique pour mieux comprendre l'habitat. Selon la publication de Boussarie et al. (2018) (Figure 1), il semblerait que les amorces universelles (ex. Shark COI-MINIR, FishF) aient des pouvoirs de détections différents selon les espèces d'élasmobranches. Nous proposons ainsi de rajouter dans la phase 1 du projet, des tests par barcoding avec de la qPCR (PCR quantitative) pour optimiser les chances de détection

notamment sur les 3 espèces (requin tigre, requin marteau halicorne, et requin nourrice fauve) non détectées par métabarcoding.

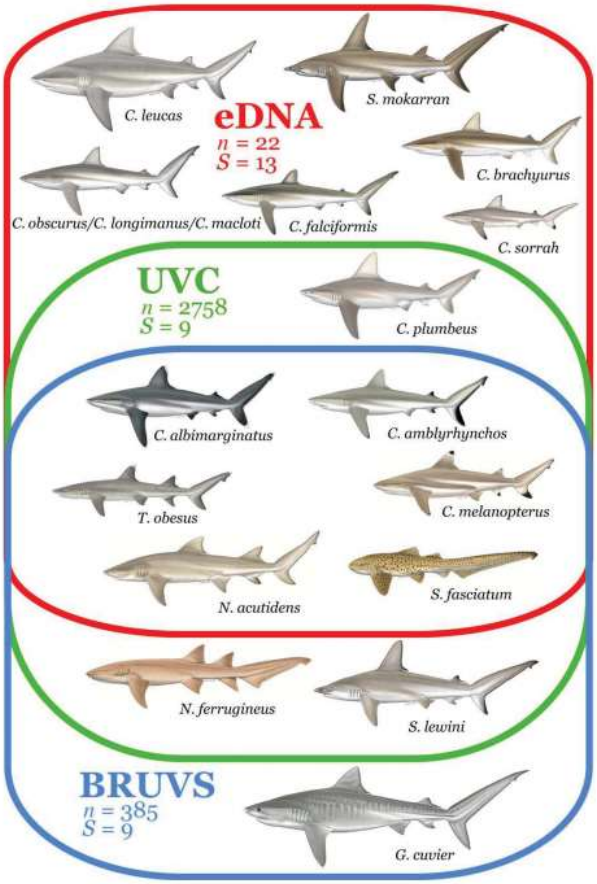


Figure 1. Figure tirée de Boussarie et al. (2018) montrant la détection des espèces de requins avec différentes méthodes d'échantillonnage. Diagramme de Venn montrant les espèces détectées par eDNA (n = 22 échantillons, S = 13 espèces), UVC - recensement visuel sous-marin (n = 2758 échantillons, S = 9 espèces) et BRUVS - méthodes d'enquête par station vidéo sous-marine à distance appâtée (n = 385 échantillons, S = 9 espèces). Dessins sous autorisation de M. Dando dans Boussarie et al. (2018).

La seconde technique, dite de qPCR a été utilisée dans cette étude pilote mais nous la détaillerons dans la seconde phase du projet puisqu'elle a été utilisée lors du design des amorces spécifiques présentées dans le chapitre II.

B) Matériel et méthode

Echantillons ADNe

Trois types de prélèvements (surface / colonne d'eau / sédiment) sur 3 stations différentes ont été effectués en faisant 3 réplicas d'échantillon. La table 1 ci-dessous recense les échantillons qui ont été prélevés ainsi que les informations relatives à chaque prélèvement. Un total de 18 capsules de filtration et cinq échantillons de sédiments ont été collectés pour cette étude pilote.

Table 1. Informations relatives aux échantillons.

Date	Lieu	Milieu (profondeur)	Nom Echantillon	Code Echantillon	Code Echantillon ARGALY
10/09/2021	Saint Paul - Le Sec	Surface	Surface #1	SSP1S1	ARB018
			Surface #2	SSP1S2	ARB019
			Surface #3	SSP1S3	ARB020
		Mi-profondeur (30m)	Mi-prof #1	SSP1MP1	ARB009
			Mi-prof #2	SSP1MP2	ARB010
			Mi-prof #3	SSP1MP3	ARB011
		Sédiments (61m)	Sédiments #1	SSP1SED1	ARB004
14/09/2021	Saint Leu - Pointe des Châteaux	Surface	Surface #1	PDCS1	ARB015
			Surface #2	PDCS2	ARB016
			Surface #3	PDCS3	ARB017
		Mi-profondeur (15m)	Mi-prof #1	PDCMP1	ARB012
			Mi-prof #2	PDCMP2	ARB013
			Mi-prof #3	PDCMP3	ARB014
		Sédiments (34,5m)	Sédiments #1	PDCSED1	ARB005
01/10/2021	Saint Paul - Le Sec	Surface	Surface #1	SSP2S1	ARB006
			Surface #2	SSP2S2	ARB007
			Surface #3	SSP2S3	ARB008
		Mi-profondeur (30m)	Mi-prof #1	SSP2MP1	ARB021
			Mi-prof #2	SSP2MP2	ARB022
			Mi-prof #3	SSP2MP3	ARB023
		Sédiments (60m)	Sédiments #1	SSP2SED1	ARB001
			Sédiments #2	SSP2SED2	ARB002
			Sédiments #3	SSP2SED3	ARB003

Les réplicas d'échantillon (3 filtres par site géographique en surface et 3 filtres dans la colonne d'eau) nous ont permis de déterminer les volumes d'eau à filtrer pour optimiser le protocole de prélèvement. Pour les prélèvements d'eau de mer, 30 litres ont été filtrés avec un système de pompe développé par l'équipe de Pierre Taberlet (Université de Grenoble Alpes) et ARGALY (voir Figure 2). Les filtres utilisés pour filtrer l'eau étaient des filtres Waterra à 0,45 microns. Pour les prélèvements en surface, le filtre a simplement été placé à la surface de l'eau. Pour les prélèvements dans la colonne d'eau, des plongeurs munis d'une combinaison, ont fait les prélèvements grâce à des tubes stérilisés toute une nuit dans 10% de javel et pouvant s'ouvrir et se fermer rapidement (Figure 2).

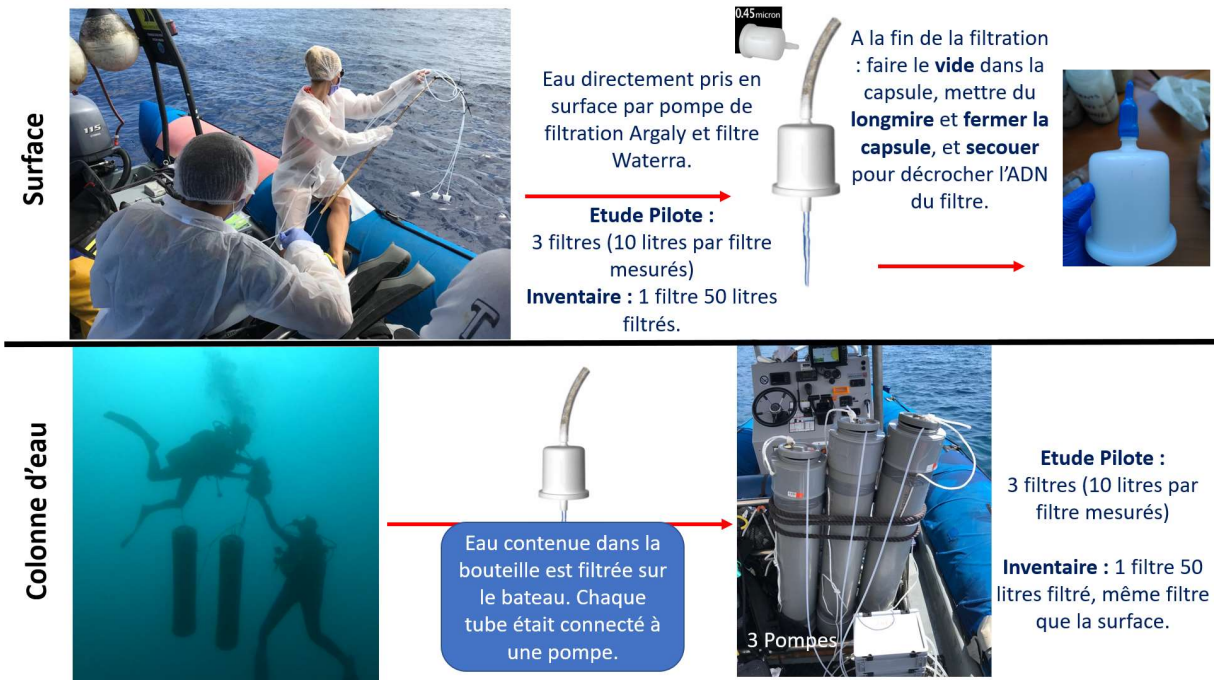


Figure 2. Protocole de filtration en mer à partir d'un filtre Waterra, d'une pompe ARGALY, et du kit ARGALY comprenant un tuyau, des bouchons bleus pour fermer le filtre, une solution longmire et une seringue pour mettre la solution dans le filtre (voir Annexe 1 pour le détail du protocole technique).

Les prélèvements de sédiments ont été réalisés par des plongeurs, à l'aide de sachets plastiques stériles, sur les premiers centimètres de la couche superficielle de substrat (5 points sur une surface de 1m²). Un minimum de 30 grammes de sédiments a ensuite été transvasé dans un flacon plastique (500mL) stérile contenant des sachets de silica (kits fournis par ARGALY). Les flacons ont été conservés au sec jusqu'à leur envoi au laboratoire. La structure des fonds sur 2 sites a permis de réaliser 1 seul prélèvement au lieu de 3 séparés (Figure 3). Les 18 capsules de filtration et cinq échantillons de sédiments ont été envoyés au laboratoire ARGALY.

Figure 3. Prélèvements de sédiments dans les fonds marins, voir la Table 1 pour plus de précisions.

Echantillons de tissus

Des échantillons de tissus de requin ont été envoyés au laboratoire ARGALY pour servir de contrôles positifs pour les manipulations dans le cadre du métabarcoding et détection spécifique. La table 2 recense les échantillons de tissus.

Table 2. Informations relatives aux échantillons de tissus par les collecteurs et corrigées suite aux analyses génétiques.

Identifiant ARBRE	Espèce identifiée par observation	Identification corrigée après alignement génétique	Identifiant Echantillon
002-10102018	*Requin marteau halicorne - Sphyrna lewini*		ARB024
001-28022020	*Requin marteau halicorne - Sphyrna lewini*		ARB025
001-18062021	*Requin bouledogue - Carcharhinus leucas*		ARB026
001-05072021	*Requin bouledogue - Carcharhinus leucas*		ARB027
002-22072021	*Requin tigre - Galeocerdo cuvier*		ARB028
003-11082021	*Requin bouledogue - Carcharhinus leucas*		ARB029
SL-15092021	*Requin marteau halicorne - Sphyrna lewini*		ARB030
003-16092021	*Requin tigre - Galeocerdo cuvier*		ARB031
001-30092021	*Requin tigre - Galeocerdo cuvier*		ARB032
S. Lewini n°1	*Requin marteau halicorne - Sphyrna lewini*	*Requin marteau commun - Sphyrna zygaena*	ARB033
S. Lewini n°2	*Requin marteau halicorne - Sphyrna lewini*		ARB034
CP000029 2018 Tikehau N. Ferrugineus	*Requin nourrice fauve - Nebrius ferrugineus*		ARB035
CP000030 2018 Tikehau N. Ferrugineus	*Requin nourrice fauve - Nebrius ferrugineus*		ARB036

Phase laboratoire

1) Extraction d'ADN

L'ADN des 18 filtrations d'eau a été extrait dans un laboratoire dédié à la manipulation d'échantillons aquatiques, en suivant le protocole NucleoSpin Soil (Macherey Nagel) avec les modifications suivantes : les filtres ont d'abord été agités vigoureusement avec un agitateur mécanique pendant deux minutes afin de permettre aux débris cellulaires d'être remis en suspension dans le tampon de conservation. Tous les filtrats ont ensuite été transférés dans des tubes de 50mL pour être centrifugés 1h à 12000g. Les culots ont été repris dans du tampon ATL et de la protéinase K, puis placés 2h à 56°C pour lyser les cellules et débris cellulaires.

L'extraction s'est poursuivie selon le protocole du fabricant. Les extraits d'ADN ainsi obtenus ont été élués dans un volume final de 100µL de tampon d'élution. L'ADN des cinq échantillons de sédiments a été extrait à l'aide d'une méthode basée sur l'utilisation de tampon phosphate (Taberlet et al. 2012) dans un laboratoire réservé à la manipulation d'échantillons de sols et sédiments.

2) Amplification, purification et séquençage

Des qPCR 'tests' ont été effectuées sur plusieurs ADN issus de sédiments et de filtrations et sélectionnés aléatoirement, afin de déterminer la dilution optimale des ADN et le nombre de cycles PCR à effectuer pour chaque couple d'amorces (Elas01, Elas02 et Shark-miniCOI). La table 3 présente les résultats de ces tests. Chaque ADN a ensuite été amplifié en huit réplicas avec chacune des amorces (Elas01, Elas02 et Shark-miniCOI, Tableau 3). À noter que l'amorce forward de Shark-miniCOI est un mélange de deux amorces correspondant à des variants de séquences. Chaque réplica PCR a été identifié de manière unique par une combinaison de deux tags de huit bases accolées en 5' à chaque amorce de PCR. Ces tags servent à assigner les séquences au réplica correspondant pendant l'analyse bioinformatique. Après amplification, tous les échantillons ont été purifiés avec le kit de purification MinElute (Qiagen GmbH). La construction des librairies ainsi que le séquençage ont ensuite été effectués par la société FASTERIS (Genève, Suisse). Les librairies de séquençage ont été préparées suivant le protocole Metafast destiné à limiter les artéfacts de séquençage (https://www.fasteris.com/dna/?q=content/metafast-protocol-amplicon-metagenomic-analysis). Les librairies de séquençage ont ensuite été séquencées dans plusieurs runs Illumina MiSeq avec des lectures paired-end de 2x150bp ou 2x200bp selon les amorces (table 3)

Table 3. Marqueurs étudiés et leurs caractéristiques.

Marqueur (région génétique)	Shark-miniCOI (COI)	Elas01 (12S)	Elas02 (12S)
Références	Field et al. 2015, Bakker et al. 2017	Miya et al. 2015	Taberlet et al. 2018
Dilution des ADN	Sédiments : 1/10 Filtrations : 1/2	Sédiments : 1/2 Filtrations : 1/2	Sédiments : 1/5 Filtrations : 1/2
Nombre de cycles PCR	35 cycles	40 cycles	40 cycles
Amorce forward	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC / TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	GTTGGTAAATCTCGTGCCAGC	CATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG
Amorce Reverse	AAGATTACAAAAGCGTGGGC	CATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG	CATAGTAGGGTATCTAATCCTAGTTTG
Température d'hybridation	52°C	59°C	59°C
Longueur amplicon sans amorces	127 bp	170-185 bp	170-185 bp
	Médiane 127 bp	Médiane 182bp	Médiane 182bp
Type de run	MiseqV2 2*150	MiseqV2 2*200	MiseqV2 2*200

3) Contrôles qualité

Différents contrôles réalisés à chaque étape du protocole permettent de détecter les éventuelles contaminations pour une meilleure interprétation des résultats. Pour chaque réplica PCR, nous avons réalisé deux contrôles négatifs d'extraction, un contrôle négatif PCR, un contrôle positif et huit contrôles bioinformatiques. Le contrôle positif est un mélange des ADN des échantillons ARB024, ARB033 et ARB035, dilués au 1/10ème, et correspondant aux espèces de requins *Sphyrna lewini* et *Nebrius ferrugineus*. Il est à noter que ces ADN ont été sélectionnés avant d'obtenir l'information sur la correspondance des espèces. Le succès des amplifications et des purifications a été vérifié sur gel d'agarose à 2% (E-Gel Power Snap, Invitrogen®).

Analyses bioinformatiques

1) Analyses des séquences

Les données brutes issues du séquençage ont été analysées avec la suite de programmes OBITools (Boyer et al. 2016) spécialement dédiée au traitement de données de métabarcoding. Pour chaque marqueur, les séquences paired-end ont d'abord été assemblées avec le programme *illuminapairedend*, et seules les séquences avec un score d'alignement supérieur à 40 ont été conservées. Ce score correspond à un chevauchement exact de 10 bases. Les séquences alignées ont ensuite été assignées au réplica PCR correspondant à l'aide du programme *ngsfilter*, en autorisant deux mismatchs au plus par amorce PCR, et aucun mismatch sur les tags. Les séquences ont été dérépliquées grâce à *obiuniq*, puis celles contenant des nucléotides indéterminés, celles dont la longueur n'appartenait pas à l'intervalle attendu ([120-140bp] pour Shark-MiniCOI et [170-185bp] pour Elas01 et Elas02) et celles observées une seule fois dans le jeu de données ont été éliminées. Sur les séquences restantes, un clustering à 97% a été réalisé à l'aide du programme *SumaClust* (Mercier et al. 2013) afin d'obtenir des Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs). La séquence la plus abondante au sein d'un cluster a été choisie comme représentante du cluster. Seuls les MOTUs observés au moins dix fois dans au moins un réplica PCR ont été conservés pour le reste des analyses. Le programme *ecotag* de OBITools a été utilisé pour procéder à l'assignation taxonomique des MOTUs. Ce programme compare chaque MOTU à une base de référence de séquences de metabarcodes complets construite à partir de la base de séquences publiques EMBL (version 143) grâce au programme *ecoPCR* (Ficetola et al. 2010). Plus spécifiquement, *ecoPCR* effectue une PCR *in silico* sur les séquences d'EMBL à l'aide des amorces associées au marqueur d'intérêt, et en autorisant au plus trois mismatchs par amorce. Les séquences obtenues ont ensuite été filtrées pour ne conserver que les séquences possédant une assignation à la famille, au genre et à l'espèce.

2) Filtration bioinformatique des données

Après assignation taxonomique, un filtrage supplémentaire des données a été conduit dans R (R Core Team 2020) avec le package *metabaR* (Zinger et al. 2021), afin d'éliminer les séquences artéfactuelles ou contaminantes fréquentes dans les jeux de données de métabarcoding, et qui peuvent biaiser les conclusions écologiques basées sur de telles données (Calderón-Sanou et al. 2020). Plus spécifiquement, nous avons exclu des trois jeux de données (1) les MOTUs avec une faible identité de séquence maximale avec la base de référence (< 90%), car ce sont vraisemblablement des chimères de séquence ; (2) les MOTUs dont la fréquence est maximale dans au moins un réplica de PCR contrôle (méthode « max » de la fonction *contaslayer*), car

ce sont des contaminants externes ; et (3) au sein d'un réplica PCR, les MOTUs avec une fréquence relative <0.03% (fonction *tagjumslayer*), car ce sont vraisemblablement des artéfacts générés au moment de la fabrication de la librairie de séquençage (i.e. « tag jumps »). Les réplicas PCR présentant moins de 1000 séquences ont été éliminés, et enfin ceux appartenant au même échantillon ont été agrégés en utilisant la fonction *aggregate_pcrs*. Enfin, les MOTUs présents avec moins de 10 séquences dans un échantillon ont été supprimés.

C) Résultats et discussion

Métabarcoding – étude pilote

Pour chaque marqueur, un tableau de contingence est joint à ce rapport sous forme de tableau Excel. Ce tableau contient deux pages : une présentant le nombre de séquences obtenues après filtration pour chaque MOTU et chaque échantillon, et une présentant le nombre de séquences pour chaque taxon et chaque échantillon. La table 4 résume le nombre de séquences avant et après filtrage et le nombre de MOTUs et de taxons différents détectés par chaque marqueur. Les chiffres après filtrage incluent également les échantillons que nous avons utilisés comme contrôles positifs. Concernant la table 5, elle récapitule le nombre de séquences après filtrage et le nombre de MOTUs identifiés pour chaque échantillon pour chaque jeu de données.

Table 4. Caractéristiques globales des jeux de données.

	Nombre de séquences brutes	Nombre de séquences après filtrage	Nombre de MOTUs	Nombre de taxons
Shark-MiniCOI	7149275	2056263	7	4
Elas01	2641441	872835	32	26
Elas02	3291041	1054189	43	35

Table 5. Caractéristiques des échantillons pour chaque marqueur.

	Nombre de séquences Shark-MiniCOI	Nombre de MOTUs Shark-MiniCOI	Nombre de séquences Elas01	Nombre de MOTUs Elas01	Nombre de séquences Elas02	Nombre de MOTUs Elas02
ARB001	-	-	-	-	-	-
ARB002	-	-	-	-	-	-
ARB003	-	-	-	-	-	-
ARB004	-	-	-	-	-	-
ARB005	-	-	-	-	-	-
ARB006	-	-	1073	1	28255	1
ARB007	-	-	3494	2	121086	5

ARB008	-	-	4925	2	28143	3
ARB009	-	-	12403	2	31597	4
ARB010	-	-	3716	2	7210	3
ARB011	-	-	7277	1	2617	1
ARB012	-	-	9721	5	51646	7
ARB013	-	-	15728	1	71049	6
ARB014	-	-	13876	1	29645	2
ARB015	-	-	13297	4	143160	10
ARB016	-	-	353301	2	50492	1
ARB017	-	-	2890	3	27814	12
ARB018	-	-	2627	3	148398	3
ARB019	-	-	-	-	10425	1
ARB020	-	-	1214	2	8322	2
ARB021	-	-	75598	3	34377	3
ARB022	-	-	16911	1	21262	2
ARB023	-	-	66845	4	101619	2
CPOS01	2056263	7	267939	8	137072	6

Nous observons que les échantillons ARB001 à ARB005 ne contiennent pas d'ADNe détectable par les trois marqueurs. Il s'agit d'échantillons de sédiments, ce qui indique que les sédiments anoxiques ne sont pas une matrice appropriée pour la détection des élasmobranches, et qu'il faut plutôt favoriser la filtration d'eau autour de La Réunion.

Le marqueur Shark-MiniCOI ne détecte aucun organisme dans les échantillons d'eau. Seul le contrôle positif contient des séquences de requin. Ce marqueur ne parait donc pas adapté à une utilisation pour des échantillons environnementaux.

La plupart des organismes détectées par les paires d'amorces Elas01 et Elas02 dans les échantillons ADNe ne sont pas des élasmobranches, c'est-à-dire les organismes cibles de ces deux marqueurs et aucun requin n'est détecté dans les échantillons d'eau quel que soit le marqueur utilisé. Cependant, l'ADN de requins est bien présent dans les contrôles positifs. Étant donné que Elas01 et Elas02 détectent des raies et des cétacées (comme la baleine à bosse), nous en déduisons que les requins n'étaient pas présents dans les zones étudiées lors de la campagne terrain.

Le marqueur Elas02 semble détecter plus de MOTUs et taxa que le marqueur Elas01 (résultats que nous avons confirmés lors de la deuxième phase du projet). Les taxa détectés par ces deux marqueurs sont majoritairement identiques mais Elas01 détecte quatre taxa non détectés par Elas02 et inversement, Elas02 détecte 12 taxa non détectés par Elas01 (Table 5 ; Figures 4, 5, et 6). Il est à noter également que l'échantillon ARB019 est amplifié par Elas02 (détection d'ADN de baleine à bosse) mais pas Elas01. Ces différents éléments nous permettent de recommander l'utilisation de Elas02.

En ce qui concerne le choix de la profondeur des filtrations, les taxons détectés diffèrent généralement entre les filtrations de surface et celles de la colonne d'eau, sauf dans certains cas. Nous émettons donc l'hypothèse que l'ADN n'est pas réparti de façon homogène dans la colonne d'eau mais plutôt présent très localement selon la présence récente des espèces et

leur habitat. Il est à noter par exemple qu'un taxon n'est parfois détecté que dans un ou deux réplicas sur trois. Les résultats présentés dans les Figures 4A (Elas01) et 4B (Elas02) différenciant la surface de la colonne d'eau montrent que l'échantillonnage est complémentaire (surface et colonne d'eau) plus particulièrement avec Elas02. La stratégie de filtration pour la suite de ce projet a été défini selon ces résultats ainsi qu'en fonction des recommandations trouvées dans la publication de Budd et al. (2021) soit une quantité d'eau à filtrer de 100 litres. Cela signifie qu'à la place de faire 30 litres en surface et 30 litres dans la colonne d'eau, nous avons filtré 50 litres en surface et 50 litres dans la colonne d'eau.

Dans les contrôles positifs, Shark-MiniCOI n'identifie pas l'espèce *Nebrius ferrugineus*, ce qui confirme que ce marqueur n'est pas adapté pour ce projet. Les trois marqueurs (Elas01, Elas02, et Shark-MiniCOI) identifient deux espèces de Sphyrna : *Sphyrna lewini et Sphyrna zygaena,* alors que les tissus utilisés pour ce genre dans le contrôle positif étaient identifiés comme appartenant à l'espèce *Sphyrna lewini* seulement. Il est donc probable qu'il y ait eu une erreur d'identification sur un des tissus fournis (échantillon ARB024 ou ARB033) (voir la Table 2). Grâce à la qPCR, nous avons pu confirmer que c'est l'ADN ARB033 qui avait été mal identifié, c'est-à-dire qui correspond à du *Sphyrna zygaena* plutôt que du *S. lewini*.

Cartographie

Ce chapitre présente les cartographies des résultats de détection des espèces par Elas01 et Elas02 proportionnelle au nombre de séquences par échantillons. Les résultats entre les eaux de surface et de la colonne d'eau pour le même échantillon (c'est-à-dire prélevés au même moment sur le même site) présentent des différences particulièrement avec l'utilisation d'Elas02 (Figure 4). La détection de raies est cohérente entre les deux types d'amorces (Elas01 et Elas02). Les cétacés sont plus détectés avec Elas02 (Figure 4). La détection des poissons osseux est importantes pour les deux types d'amorces (Figures 5 et 6).

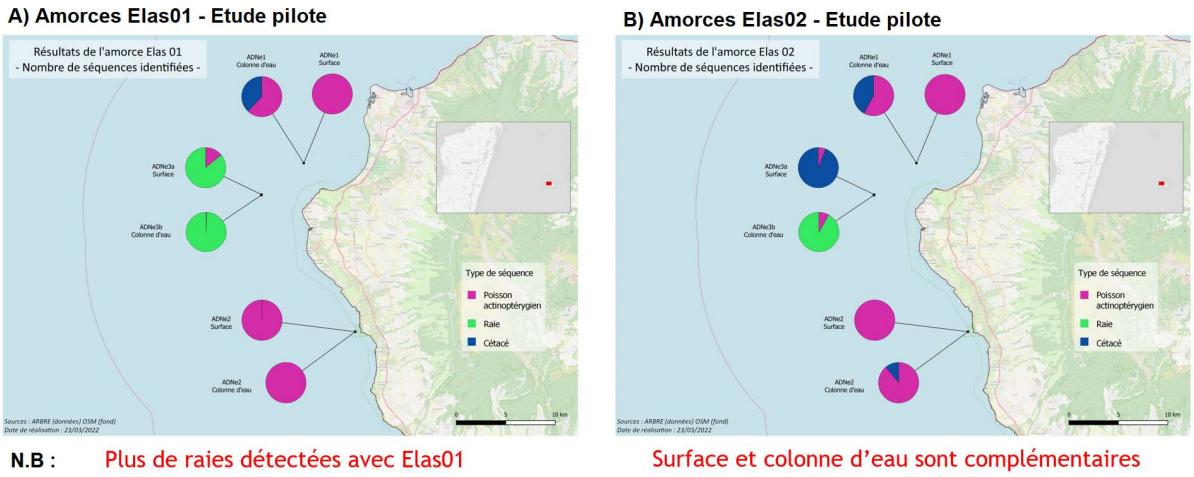


Figure 4. Pour chaque localisation géographique, deux prélèvements (surface et colonne d'eau) ont été réalisés avec 1 filtre de capture d'ADNe pour 30 litres d'eau. Chaque point comprend ainsi 2 camemberts dont les couleurs correspondent aux différents taxons (poissons osseux – rose ; raie – vert ; cétacé – bleu).

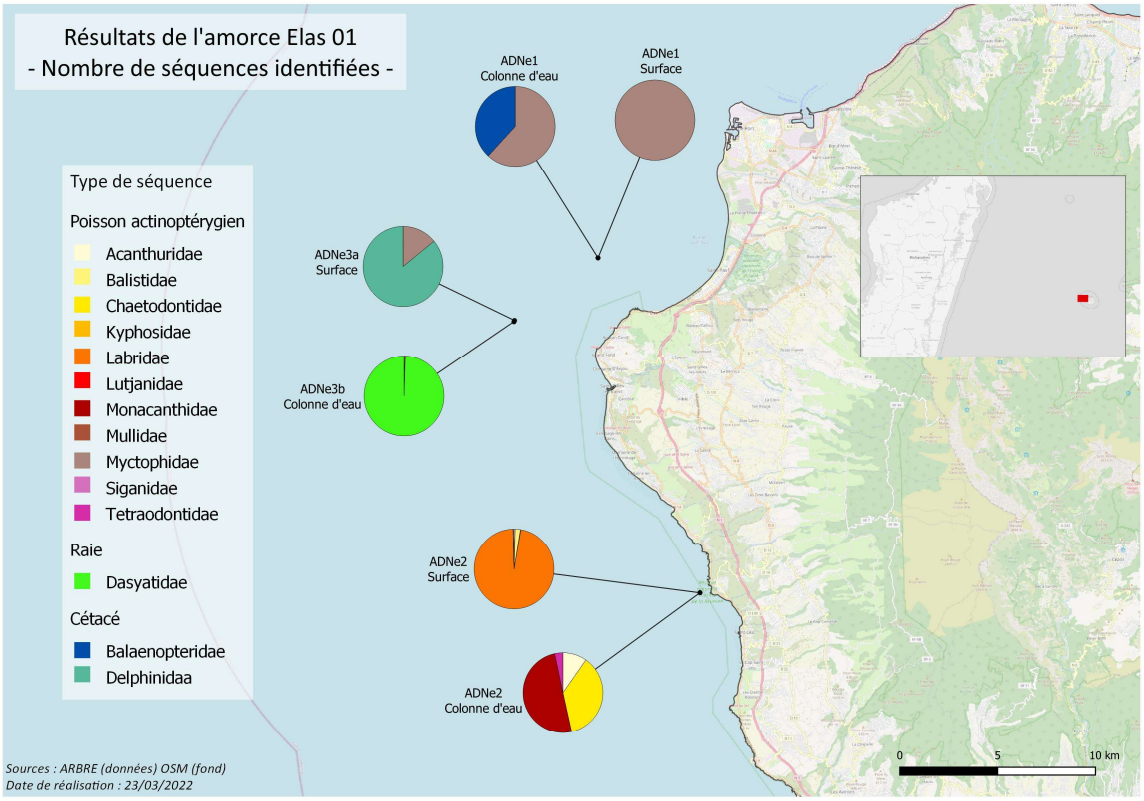


Figure 5. Résultats de la détection des espèces avec les amorces Elas01 à partir des échantillons d'eau de mer (30 litres) prélevés en surface et dans la colonne d'eau.

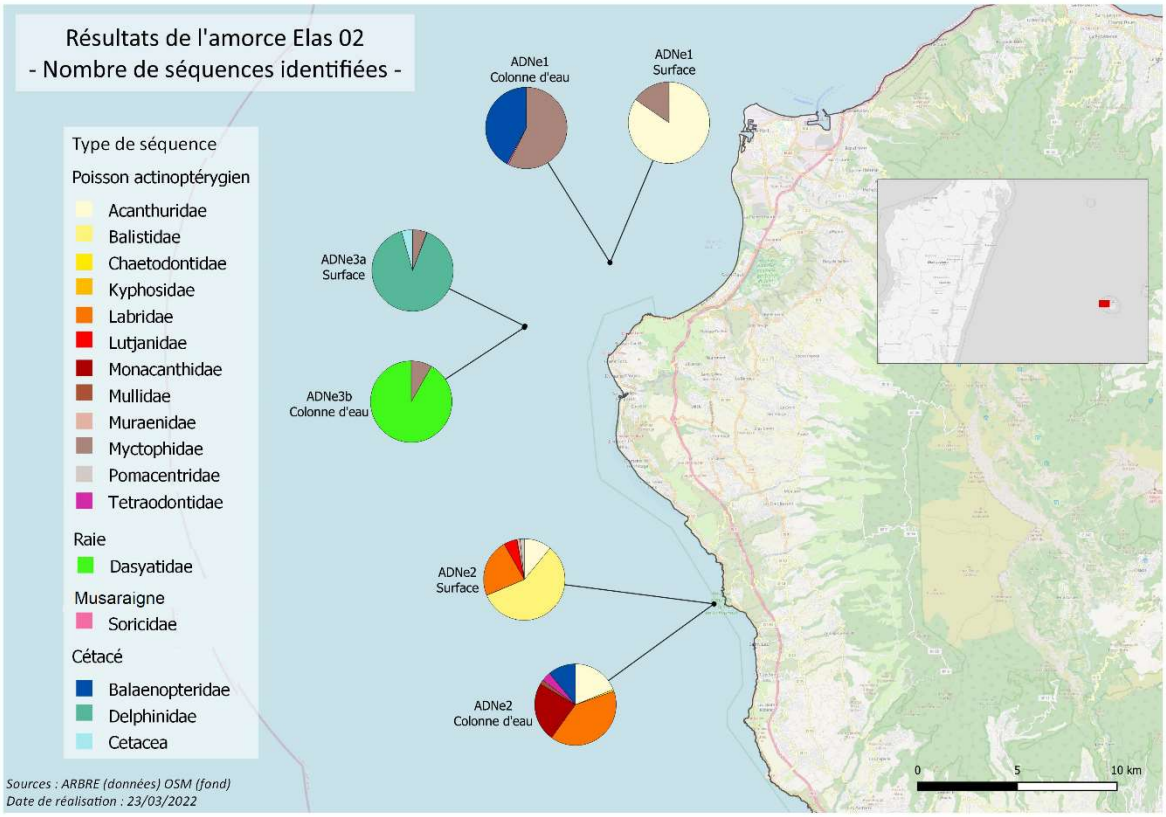


Figure 6. Résultats de la détection des espèces avec les amorces Elas02 à partir des échantillons d'eau de mer (30 litres) prélevés en surface et dans la colonne d'eau.

Comparaison avec les résultats du programme MesoMay

La détection des élasmobranches à partir des échantillons du programme MesoRun n'a pas fonctionnée. Nous soupçonnons une dégradation de l'ADN lors des processus de décongélation et préservation car les concentrations d'ADN étaient faibles alors que les analyses ADNe de MesoRun avec le MiFish lors des premières manipulations moléculaires de métabarcoding avaient été concluantes. La plateforme qui s'en est occupée (NatureMetrics) n'a pas pu nous donner d'explication concluante. Ainsi, nous avons comparéles résultats du programme IRRAE avec ceux du programme MesoMay. Nous disposions de 10 échantillons, dont la concentration d'ADN n'avait pas bougée. Le programme MesoMay porté par Vie Océane et BIORECIF sur Mayotte, avec l'association ARBRE comme partenaire, avait le même objectif que le programme MesoRun, c'est-à-dire réaliser un inventaire faunistique non exhaustif sur certains sites situés en zone mésophotique (entre 50 et 150 m de profondeur) mais autour de Mayotte.

Les résultats sur le marqueur MiFish (équivalent Elas01) montrent une détection d'une grande quantité d'espèces de poissons, ce qui est cohérent avec les analyses à La Réunion (Figure 7). Les amorces Elas02 détectent 3 espèces de requins et 3 espèces de raies dans 7 échantillons (Figure 8). Pour finir, les amorces Shark-miniCOI détectent moins d'espèces de requins ce qui est cohérent avec les résultats autour de La Réunion (Figure 9). Selon ces résultats et nous le verrons par la suite avec la phase 2 sur l'inventaire, les amorces Elas02 sont à privilégier.

Figure 7. Proportion des espèces détectées par les amorces MiFish à Mayotte au sein du projet MesoMay.

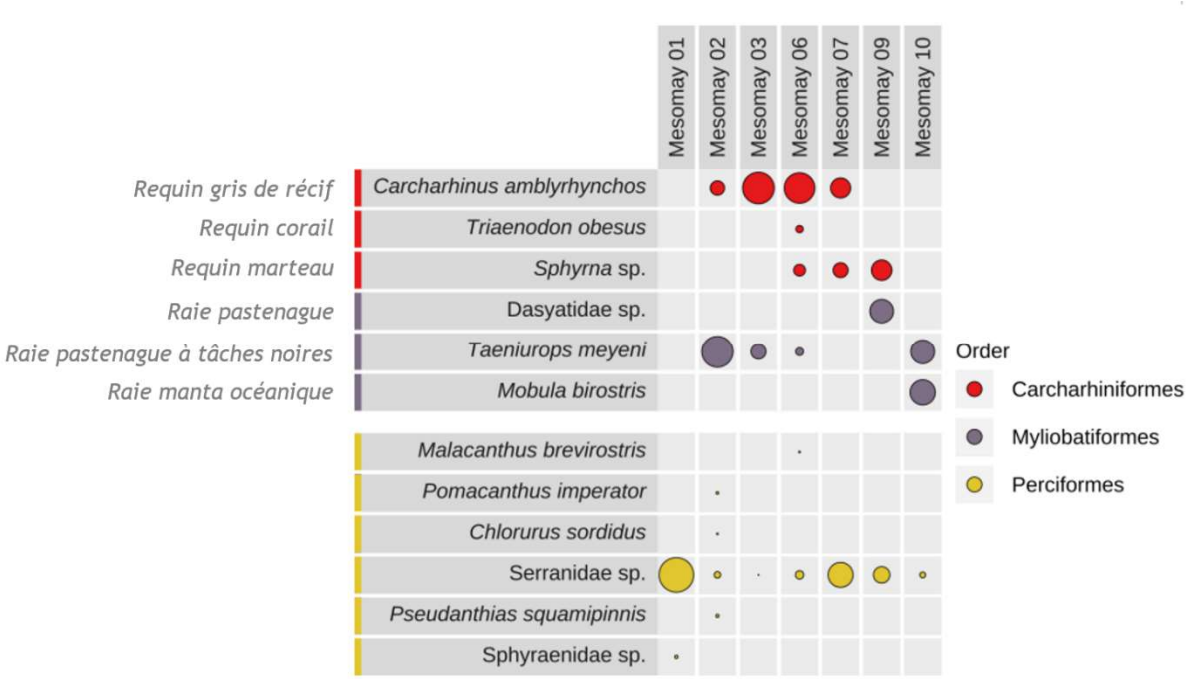


Figure 8. Proportion des espèces détectées par les amorces Elas02 à Mayotte au sein du projet MesoMay.

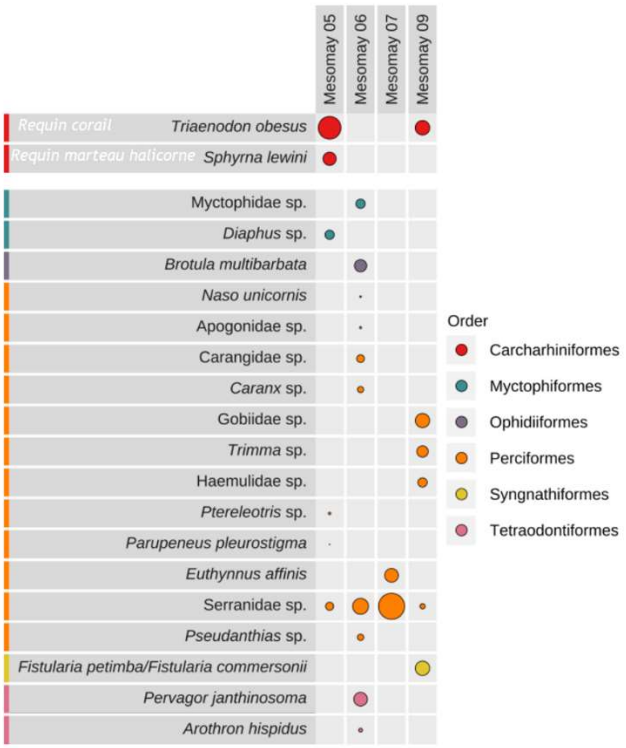


Figure 9. Proportion des espèces détectées par les amorces Shark-miniCOI à Mayotte au sein du projet MesoMay.

III. INVENTAIRE – 2ème phase

A) Objectifs

Pour cet inventaire, deux types de techniques moléculaires ont été utilisées. La première technique, dite de métabarcoding est détaillée dans le chapitre II. La seconde technique, dite de qPCR passe seulement par une phase d'amplification de l'ADN en utilisant des amorces PCR spécifiques à une ou plusieurs espèces (approche ciblée). Pour tester cette technique, nous avons ciblé 4 espèces de requins et 2 espèces de raies choisies selon leur statut défini sur la liste rouge des espèces menacées établie par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature), potentiellement identifiables en des lieux bien précis, et contenant les 3 espèces de requins non détectées par métabarcoding dans une précédente étude (Figure 1) :

- *Galeocerdo cuvier* (requin tigre).
- *Sphyrna lewini* (requin marteau halicorne).
- *Nebrius ferrugineus* (requin nourrice fauve).
- *Carcharhinus leucas* (requin bouledogue).
- *Rhynchobatus djiddensis* (raie guitare géante).
- *Taeniura meyeni* (raie pastenague tachetée).

Vingt et une stations ont été échantillonnées durant 3 campagnes entre mars 2022 et novembre 2022 (Figure 10).

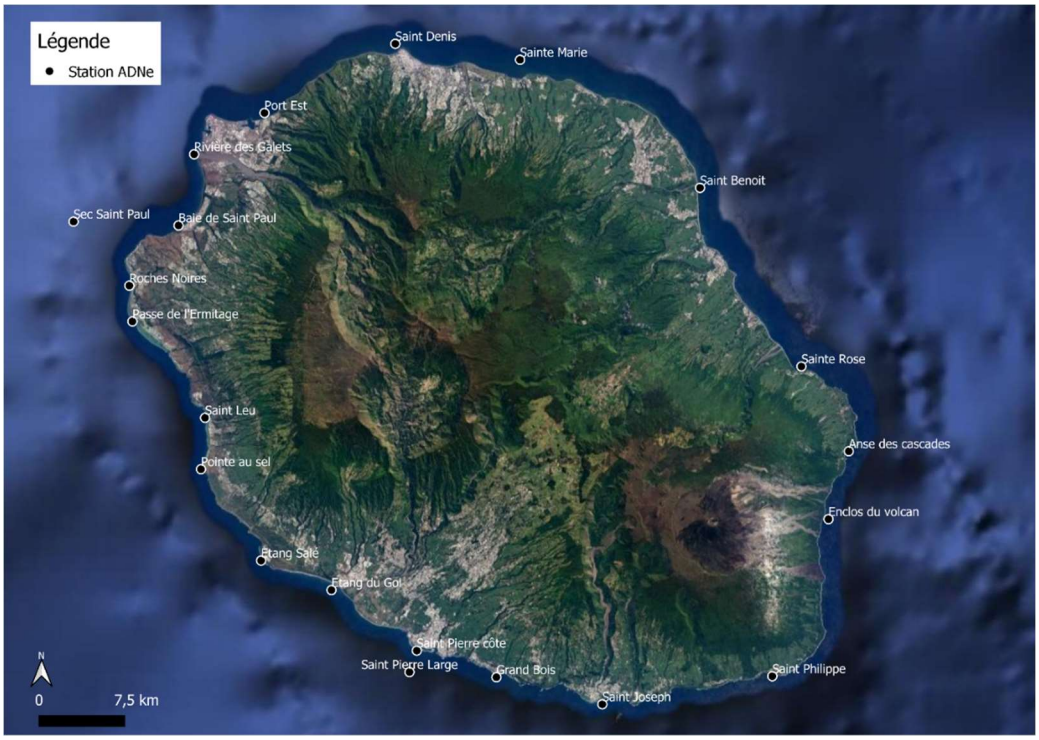


Figure 10. Stations de prélèvements comprenant 21 localisations géographiques autour de l'île de La Réunion (sud-ouest de l'océan Indien).

B) Matériel et Méthode

Dans notre cas, suite à des recherches bibliographiques, nous avons pu découvrir des amorces qPCR pour le requin bouledogue (Drymon et al. 2020), le requin tigre (Nielsen et al. 2017) et le requin marteau halicorne (Budd et al. 2021). En revanche, les amorces qPCR des autres espèces n'ont pas été trouvées. Nous avons ainsi réalisé une optimisation des marqueurs pour les 3 premières espèces et un design d'amorces pour les 3 autres espèces.

B.1. Échantillons

La table 6 ci-dessous recense les échantillons d'ADNe (100 litres d'eau de mer filtrés) qui ont été prélevés ainsi que les informations relatives à chaque prélèvement. Les dosages effectués sur les ADN extraits sont également indiqués sur cette table (à noter que certains extraits ne contenaient pas assez d'ADN pour que leur concentration soit mesurée).

Table 6. Informations relatives aux échantillons de filtrations d'eau (ADNe) prélevés autour de l'île de La Réunion.

Id ARGALY	ID ARBRE	Dosage ADN (ng/µL)	Date	Lieu
ARBB037	ARB-037	17.5	11/3/2022	Anse des Cascades
ARBB038	ARB-038	24.6	11/3/2022	Port de Sainte Rose
ARBB039	ARB-039	6.84	15/3/2022	Saint Benoit
ARBB040	ARB-040	44	15/3/2022	Sainte Marie
ARBB041	ARB-041	29.2	15/3/2022	Saint Denis
ARBB042	ARB-042	32.8	16/3/2022	Etang du Gol
ARBB043	ARB-043	30.6	16/3/2022	Etang salé
ARBB044	ARB-044	28	16/3/2022	Pointe au sel
ARBB045	ARB-045	36.8	16/3/2022	Sec à zitte
ARBB046	ARB-046	42.6	16/3/2022	Rivière des Galets
ARBB047	ARB-047	16.8	17/3/2022	Sec Saint Paul
ARBB048	ARB-048	58	17/3/2022	Passe Ermitage
ARBB049	ARB-049	69.6	17/3/2022	Roches Noires
ARBB050	ARB-050	66.4	17/3/2022	Baie Saint Paul
ARBB051	ARB-051	42	17/3/2022	Port Est
ARBB052	ARB-052	21.8	18/3/2022	Grands Bois
ARBB053	ARB-053	74.6	18/3/2022	Large Saint Pierre
ARBB054	ARB-054	30.4	18/3/2022	Ravine Blanche
ARBB055	ARB-T55	Trop faible	11/5/2022	Marine Vincendo
ARBB056	ARB-056	34.2	11/5/2022	Marine Vincendo
ARBB057	ARB-T56	Trop faible	14/5/2022	Bassin Manapany
ARBB058	ARB-T57	Trop faible	14/5/2022	Bassin Manapany
ARBB059	ARB-057	61.2	14/5/2022	Marine Saint Philippe
ARBB065	ARB-058	6.34	14/5/2022	Marine Saint Philippe
ARBB066	ARB-059	6.02	1/6/2022	La Tortue Saint Leu

ARBB067	ARB-060	6.2	1/6/2022	Passe Ermitage
ARBB068	ARB-061	3.74	1/6/2022	Roches Noires
ARBB069	ARB-062	4.90	1/6/2022	Roches Noires
ARBB070	ARB-063	6.4	1/6/2022	Barge Saint Paul
ARBB071	ARB-064	12	1/6/2022	Rivière des Galets
ARBB072	ARB-T65	0.168	03/06/2022	Saint Benoit
ARBB073	ARB-065	12.9	03/06/2022	Sainte Marie
ARBB074	ARB-T66	Trop faible	03/06/2022	Sainte Marie
ARBB075	ARB-066	10.2	03/06/2022	Saint Denis
ARBB076	ARB-067	7.56	03/06/2022	Saint Denis
ARBB077	ARB-T68	Trop faible	03/06/2022	Port Est
ARBB078	ARB-068	7.82	14/06/2022	Sec Saint Paul
ARBB079	ARB-069	5.18	14/06/2022	Sec Saint Paul
ARBB080	ARB-070	4.32	14/06/2022	Pointe au sel
ARBB081	ARB-071	7.04	14/06/2022	Pointe au sel
ARBB082	ARB-072	13.1	17/06/2022	Etang salé
ARBB083	ARB-075	6.66	17/06/2022	Etang du Gol
ARBB084	ARB-074	5.78	17/06/2022	Ravine Blanche
ARBB085	ARB-073	10.2	17/06/2022	Grands Bois
ARBB086	ARB-076	14.7	17/06/2022	Large Saint Pierre
ARBB087	ARB-077	8.06	06/07/2022	Bassin Manapany
ARBC001	ARB-050	1,69	06/07/2022	Marine Saint Philippe
ARBC002	ARB-78	11,8	26/07/2022	Pointe du Tremblet
ARBC003	ARB-79	57	02/08/2022	Anse des Cascades
ARBC004	ARB-80	25,2	02/08/2022	Port de Sainte Rose
ARBC005	ARB-81	20,2	07/09/2022	Etang du Gol
ARBC006	ARB-82	55,8	07/09/2022	Etang salé
ARBC007	ARB-83	214	07/09/2022	Pointe au sel
ARBC008	ARB-84	56,8	07/09/2022	Sec à zitte
ARBC009	ARB-85	29,8	09/09/2022	Sec Saint Paul
ARBC010	ARB-86	68,8	09/09/2022	Baie Saint Paul
ARBC011	ARB-T86	Trop faible	09/09/2022	Baie Saint Paul
ARBC012	ARB-87	105	09/09/2022	Passe Ermitage
ARBC013	ARB-88	75,8	09/09/2022	Roches Noires
ARBC014	ARB-89	106	03/11/2022	Bassin Manapany
ARBC015	ARB-T89	Trop faible	03/11/2022	Bassin Manapany
ARBC016	ARB-90	72,6	03/11/2022	Marine Saint Philippe
ARBC017	ARB-91	47,4	03/11/2022	Pointe du Tremblet
ARBC018	ARB-92	121	04/11/2022	Anse des Cascades
ARBC019	ARB-T92	Trop faible	04/11/2022	Anse des Cascades
ARBC020	ARB-93	206	04/11/2022	Port de Sainte Rose
ARBC021	ARB-94	280	04/11/2022	Saint Benoit
ARBC022	ARB-95	121	04/11/2022	Sainte Marie
ARBC023	ARB-97	133	16/11/2022	Saint Denis
ARBC024	ARB-98	38	16/11/2022	Saint Denis

ARBC025	ARB-99	133	16/11/2022	Port Est
ARBC026	ARB-100	71,8	16/11/2022	Rivière des Galets
ARBC027	ARB-101	89	18/11/2022	Large Saint Pierre
ARBC028	ARB-102	57,6	18/11/2022	Grands Bois
ARBC029	ARB-103	42,2	18/11/2022	Ravine Blanche

Les échantillons de tissus (Table 2) ont été utilisés pour produire des témoins positifs. Les témoins (nommés CPOS01 pour les échantillons ARBB et CPOS308 pour les échantillons ARBC) étaient constitués de mélange des ADN provenant des échantillons ARB025, ARB026, ARB028 et ARB035, dilués au 1/10ème et correspondant aux espèces de requins *Sphyrna lewini, Carcharhinus leucas, Nebrius ferrugineus,* et *Galeocerdo cuvier*.

B.2. Optimisation et design des amorces requins et raies

Les amorces qPCR pour quatre espèces de requins et deux amorces de raies ont été désignées ou optimisées par Aurélie Bonin (ARGALY) grâce à des outils bioinformatiques (Table 7). Les oligos des amorces et sondes fluorescentes ont ensuite été commandés puis testées au laboratoire à partir d'ADN de tissus de ces espèces.

Table 7. Informations relatives aux amorces qPCR raies et requins dessinées (désignées) et optimisées.

Espèce - nom commun (*nom latin*)	Région ciblée	Nom amorce / sonde	Séquence	Tm	Taille attendue (avec amorces)
Requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*)	mtDNA ND2	Cleuc01F	TAACTATAAGTCCTAACCCAAT	54°C	104
		Cleuc01R	AAGGAGGATGGATAAGATTG		
		Sonde_Cleuc01	CTGACGAACAAAATCCAACCAC		
Requin nourrice fauve (*Nebrius ferrugineus*)	COI	Nfer01_F	AAAGAAGATTATTACGAAAGC	51°C	125
		Nfer01_R	TAGTGGGTTTAGCCCTTA		
		Sonde_Nfer01	ATCATCTCCTAAGAGAGATCCA		
Requin tigre (*Galeocerdo cuvier*)	COI	Gcuv01_F	GACGATCAAATCTATAATGTA	52°C	116
		Gcuv01_R	CCAATTATTAACGGAACTAG		
		Sonde_Gcuv01	AGTTATACCAATCATAATTGGTGGC		
Requin marteau halicorne (*Sphyrna lewini*)	12S	Slew01_F	AGGTGGATTTAGCAGTAAG	53°C	122
		Slew01_R	TTAAGAGAGTGTGTTTATAGAA		
		Sonde_Slew01	TGTGCTTATCTCAGGGCCG		
Raie à tâches noires (*Taeniura meyeni*)	COI	Tmey01_F	GGGACTTCATGTTAATGATTG	55°C	60
		Tmey01_R	CTTCCGTAGACCTTGCCA		
		Sonde_Tmey01	TGATGCTAGAATAGAGGAGATACCG		
Grande raie guitare (*Rhynchobatus djiddensis*)	COI	Rdji01_F	AGCCTCTGTAGACTTAGC	53°C	122
		Rdji01_R	GATAGTTGTTACAAGGATTGA		
		Sonde_Rdji01	TATTAACATGAAACCCCCAGCAATT		

B.3. Phase laboratoire

1) Extraction d'ADN

L'ADN des filtrations d'eau a été extrait dans un laboratoire dédié à la manipulation d'échantillons aquatiques, en suivant le protocole NucleoSpin Soil (Macherey Nagel) avec les modifications suivantes : les filtres ont été agités vigoureusement avec un agitateur mécanique pendant deux minutes afin de permettre aux débris cellulaires d'être remis en suspension dans le tampon de conservation. Tous les filtrats ont été transférés dans des tubes de 50 mL pour être centrifugés 1h à 12000 g. Les culots ont été repris dans du tampon ATL et de la protéinase K, puis placés 2h à 56°C pour lyser les cellules et débris cellulaires. L'extraction s'est poursuivie selon le protocole du fabricant. Les extraits d'ADN ainsi obtenus ont été élués dans un volume final de 100 µL de tampon d'élution.

2) Amplification métabarcoding, purification et séquençage

Les échantillons ont été analysés avec les trois couples d'amorces utilisés dans l'étude pilote (Elas01, Elas02 et Shark-miniCOI). Pour les échantillons reçus en novembre 2022, il a été décidé de ne pas utiliser le marqueur Shark-miniCOI car il ne donnait pas des résultats concluants (Chapitre 1, partie C de ce rapport). Des qPCR 'tests' ont été effectuées sur plusieurs ADN sélectionnés aléatoirement, afin de déterminer la dilution optimale des ADN et le nombre de cycles PCR à effectuer pour chaque couple d'amorces. La table 8 présente les résultats de ces tests.

Chaque ADN a ensuite été amplifié en huit réplicas avec chacune des amorces. Chaque réplica PCR a été identifié de manière unique par une combinaison de deux tags de huit bases accolées en 5' à chaque amorce de PCR. Ces tags servent à assigner les séquences au réplica correspondant pendant l'analyse bioinformatique. Après amplification, tous les échantillons ont été purifiés avec le kit de purification MinElute (Qiagen GmbH). La construction des librairies ainsi que le séquençage ont ensuite été effectués par la société FASTERIS (Genève, Suisse). Les librairies de séquençage ont été préparées suivant le protocole Metafast destiné à limiter les artéfacts de séquençage (https://www.fasteris.com/dna/?q=content/metafast-protocol-amplicon-metagenomic-analysis). Les librairies de séquençage ont ensuite été séquencée dans plusieurs runs Illumina MiSeq avec des lectures paired-end de 2x150bp ou 2x200bp selon les amorces (Table 8).

Table 8. Marqueurs étudiés et leurs caractéristiques.

	Shark-miniCOI (COI)	Elas01 (12S)	Elas02 (12S)
Références	Field et al. 2015, Bakker et al. 2017	Miya et al. 2015	Taberlet et al. 2018
Dilution des ADN	1/5	1/5	1/5
Nombre de cycles PCR	40 cycles	40 cycles	38 cycles
Amorce forward	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC / TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	GTTGGTAAATCTCGTGCCAGC	CATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG

Amorce Reverse	AAGATTACAAAAGCGTGGGC	CATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG	CATAGTAGGGTATCTAATCCTAGTTTG
Température d'hybridation	52°C	59°C	59°C
Longueur amplicon sans amorces	127 bp	170-185 bp	170-185 bp
	Médiane 127 bp	Médiane 182bp	Médiane 182bp
Type de run	MiseqV2 2*150	MiseqV2 2*200	MiseqV2 2*200

3) Contrôles qualité

Différents contrôles réalisés à chaque étape du protocole permettent de détecter les éventuelles contaminations pour une meilleure interprétation des résultats. Pour chaque réplica PCR, nous avons réalisé trois contrôles négatifs d'extraction, un contrôle négatif PCR, un contrôle positif et huit contrôles bioinformatiques. Le contrôle positif est un mélange des ADN des échantillons ARB025, ARB026, ARB028 et ARB035, dilués au 1/10ème, et correspondant aux espèces de requins *Sphyrna lewini, Carcharhinus leucas, Nebrius ferrugineus, Galeocerdo cuvier*. Il est à noter que ces ADN ont été sélectionnés avant d'obtenir l'information sur la correspondance des espèces. Le succès des amplifications et des purifications a été vérifié sur gel d'agarose à 2% (E-Gel Power Snap, Invitrogen®).

4) Amplifications qPCR

Les échantillons ont été sélectionnés selon trois critères pour tester la qPCR :

- échantillons pour lesquels au moins une espèce de raie ou de requin a été détectée dans les résultats de métabarcoding afin de comparer la sensibilité des deux méthodes ;
- échantillons pour lesquels au moins une espèce de requin ou de raie n'avait pas été détectée par métabarcoding mais qui proviennent d'un site sur lequel l'espèce a été observée (observation par plongée pendant le programme IRRAE ou MAEO) ;
- échantillons pour lesquels l'espèce n'avait pas été détectée par métabarcoding mais qui proviennent d'un site présentant un habitat favorable à l'espèce.

Chaque échantillon sélectionné a été amplifié en douze réplicas avec les amorces d'intérêt désignées (Table 7).

B.4. Analyses bioinformatiques

1) Analyse des séquences

Les données brutes issues du séquençage ont été analysées avec la suite de programmes OBITools (Boyer et al. 2016) spécialement dédiée au traitement de données de métabarcoding. Pour chaque marqueur, les séquences paired-end ont d'abord été assemblées avec le programme *illuminapairedend*, et seules les séquences avec un score d'alignement supérieur à 40 ont été conservées. Ce score correspond à un chevauchement exact de 10 bases. Les séquences alignées ont ensuite été assignées au réplica PCR correspondant à l'aide du programme *ngsfilter*, en autorisant deux mismatchs au plus par amorce PCR, et aucun

mismatch sur les tags. Les séquences ont été dérépliquées grâce à *obiuniq*, puis celles contenant des nucléotides indéterminés, celles dont la longueur n'appartenait pas à l'intervalle attendu ([127-127bp] pour Shark-MiniCOI, [170-187bp] pour Elas01 et [170-190bp] pour Elas02) et celles observées une seule fois dans le jeu de données ont été éliminées. Sur les séquences restantes, un clustering à 97% a été réalisé à l'aide du programme SumaClust (Mercier et al. 2013) afin d'obtenir des Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs). Les MOTUS sont des unités moléculaires taxonomiques qui correspondent à des séquences uniques dans le jeu de données. Ces séquences peuvent être regroupées en taxons lorsque deux séquences diffèrent de peu de nucléotides lors de l'assignation taxonomique, avec par exemple plusieurs haplotypes. Ainsi, le nombre de taxons peut être inférieur au nombre de MOTUs. Mais un taxon n'est pas forcément une espèce, ça peut être un genre ou même une famille selon le niveau de résolution du marqueur étudié.

La séquence la plus abondante au sein d'un cluster a été choisie comme représentante du cluster. Seuls les MOTUs observés au moins dix fois dans au moins un réplica PCR ont été conservés pour le reste des analyses.

Le programme *ecotag* de la suite de programmes OBITools a été utilisé pour procéder à l'assignation taxonomique des MOTUs. Ce programme compare chaque MOTU à une base de référence de séquences de metabarcodes complets construite à partir de la base de séquences publiques GenBank (version 249) grâce au programme *ecoPCR* (Ficetola et al. 2010). Plus spécifiquement, *ecoPCR* effectue une PCR *in silico* sur les séquences d'EMBL à l'aide des amorces associées au marqueur d'intérêt, et en autorisant au plus trois mismatchs par amorce. Les séquences obtenues ont ensuite été filtrées pour ne conserver que les séquences possédant une assignation à la famille, au genre et à l'espèce.

2) Filtration des données

Après assignation taxonomique, un filtrage supplémentaire des données a été conduit dans R (R Core Team 2020) avec le package *metabaR* (Zinger et al. 2021), afin d'éliminer les séquences artéfactuelles ou contaminantes fréquentes dans les jeux de données de métabarcoding, et qui peuvent biaiser les conclusions écologiques basées sur de telles données (Calderón-Sanou et al. 2020). Plus spécifiquement, nous avons exclu des trois jeux de données : (1) les MOTUs avec une faible identité de séquence maximale avec la base de référence (< 90%), car ce sont vraisemblablement des chimères de séquence ; (2) les MOTUs dont la fréquence est maximale dans au moins un réplica de PCR contrôle (méthode « max » de la fonction *contaslayer*), car ce sont des contaminants externes ; (3) au sein d'un réplica PCR, les MOTUs avec une fréquence relative <0.03% (fonction *tagjumslayer*), car ce sont vraisemblablement des artéfacts générés au moment de la fabrication de la librairie de séquençage (i.e. « tag jumps »). Les MOTUs observés dans le contrôle positif CPOS308 et assignés à *Carcharhinus leucas*, *Sphyrna lewini*, *Galeocerdo cuvier*, *Nebrius ferrugineus* n'ont pas subi ce dernier filtrage, et leur abondance a seulement été ramenée à zéro dans les réplicas PCR avec moins de 1000 séquences, pour tenir compte du fait que l'amplification de l'ADN de tissus dans les contrôles positifs a été plus efficace que dans le reste des échantillons environnementaux. Enfin, les réplicas PCR appartenant au même échantillon ont été agrégés en utilisant la fonction *aggregate_pcrs* et les MOTUs présents avec moins de 10 séquences dans un échantillon ont été supprimés.

C) Résultats et discussion

Cette étude nous a permis de dresser un premier bilan sur les espèces présentes au moment du prélèvement entre l'eau de surface ou de la colonne d'eau (en eau de mer la détectabilité se situe entre 0,9 à 6,7 jours - Thomsen et al. 2012).

C.1. Analyses métabarcoding

Pour chaque marqueur (Elas01, Elas02, Shark-miniCOI), un tableau est joint à ce rapport sous forme de tableau Excel. Ce tableau contient le nombre de séquences obtenues après filtration bioinformatique pour chaque taxon et chaque échantillon.

La table 9 résume le nombre de séquences avant et après filtrage et le nombre de MOTUs détectés par chaque marqueur pour les échantillons de chaque campagne (1 : mars-mai 2022 ; 2 : juin-août 2022 : 3 : septembre-novembre 2022).

Table 9. Caractéristiques globales des jeux de données par campagne d'échantillonnage.

CAMPAGNE	Nombre de séquences Shark-MiniCOI	Nombre de MOTUs Shark-MiniCOI	Nombre de séquences Elas01	Nombre de MOTUs Elas01	Nombre de séquences Elas02	Nombre de MOTUs Elas02
1	36730	1	144291	84	84062	39
2	3176	1	1494565	420	1711690	161
3	0	0	1310909	162	1227996	47

La table 10 ainsi que la table des données récapitulent le nombre de séquences après filtrage et le nombre de MOTUs identifiés pour chaque échantillon pour chaque marqueur de l'étude d'inventaire. Tout d'abord, nous constatons que seuls trois échantillons environnementaux ont donné des séquences exploitables avec le marqueur Shark-MiniCOI. De plus, ce marqueur est capable de détecter seulement une espèce (le requin bouledogue - *Carcharhinus leucas*) au sein des quatre espèces de requin représentées dans le contrôle positif CPOS, ce qui confirme qu'il est peu performant pour la détection des requins. Sept échantillons n'ont pas passé les filtres de qualité ni pour Elas01, ni pour Elas02. Six de ces échantillons correspondent à des bouteilles témoin d'après les données de terrain. Pour le reste des échantillons, Elas01 et Elas02 donnent des résultats prometteurs pour l'inventaire d'élasmobranches. D'une part, tous deux détectent les quatre espèces composant le contrôle positif de laboratoire. D'autre part, ils permettent la détection de plusieurs espèces d'élasmobranches dans les échantillons environnementaux, dont les espèces de requins *Carcharhinus leucas* (Requin bouledogue)*, Galeocerdo cuvier* (Requin tigre), *Carcharhinus albimarginatus* (Requin pointe blanche) et *Sphyrna lewini* (Requin marteau halicorne), et plusieurs espèces de raies dont *Taeniurops meyeni* (Raie pastenague à taches noires), *Torpedo sp.* (Raie torpille), *Rhynchobatus sp.* (Grande raie guitare), *Pateobatis fai* (Raie grise, Raie fouet, mais aussi parfois nommée Raie pastenague), *Aetobatus sp.* (Raie aigle) et *Dasyatis sp.* (Raie pastenague) par les deux marqueurs (Elas01 et Elas02). Il faut noter que l'espèce de requin *Loxodon macrorhinus* (Requin sagrin) et *Centroscymnus owstoni* (Requin dormeur) ainsi que des espèces de raie

telles que *Mobula thurstoni* (Petite manta), *Mobula sp.* (Raie diable) et *Rhinoptera* (Raie à museau) sont détectées par Elas02 mais pas par Elas01. L'étape de filtrage R a été légèrement modifiée afin d'accommoder la suramplification du contrôle positif (environ un million de séquences après filtrage pour les deux marqueurs), et de permettre des détections d'élasmobranches supplémentaires (par exemple, l'espèce *Mobula sp.* (Raie diable) dans l'échantillon ARBC018).

Table 10. Caractéristiques des échantillons pour chaque marqueur de la première session d'échantillons selon le nombre de séquences après filtrage et le nombre de MOTUs identifiés pour chaque échantillon et chaque marqueur.

ID ARBRE	IDARGALY	Nombre de séquences Shark-MiniCOI	Nombre de MOTUs Shark-MiniCOI	Nombre de séquences Elas01	Nombre de MOTUs Elas01	Nombre de séquences Elas02	Nombre de MOTUs Elas02
ARB-037	ARBB037	36730	1	86018	33	57946	20
ARB-038	ARBB038	-	-	46797	35	92615	21
ARB-039	ARBB039	-	-	4835	2	85158	4
ARB-040	ARBB040	-	-	34120	7	46621	2
ARB-041	ARBB041	-	-	87238	4	365743	4
ARB-042	ARBB042	15196	2	170509	5	96628	6
ARB-043	ARBB043	-	-	61136	33	19235	12
ARB-044	ARBB044	-	-	78986	37	88549	14
ARB-045	ARBB045	-	-	-	-	12461	4
ARB-046	ARBB046	-	-	15578	12	21620	3
ARB-047	ARBB047	-	-	15571	6	21030	4
ARB-048	ARBB048	-	-	88400	33	11529	9
ARB-049	ARBB049	38693	3	3854	10	74161	17
ARB-050	ARBB050	-	-	2487	2	1216	1
ARB-051	ARBB051	-	-	10965	9	1818	1
ARB-052	ARBB052	-	-	4890	3	24856	5
ARB-053	ARBB053	-	-	95074	9	34160	4
ARB-054	ARBB054	-	-	25709	16	-	-
ARB-T55	ARBB055	-	-	-	-	-	-
ARB-056	ARBB056	-	-	102485	32	40428	20
ARB-T56	ARBB057	-	-	-	-	1713	1
ARB-T57	ARBB058	-	-	1259	1	3604	1
ARB-057	ARBB059	-	-	58273	51	26116	19
ARB-058	ARBB065	-	-	98847	10	81253	4
ARB-059	ARBB066	-	-	85389	49	61505	22
ARB-060	ARBB067	-	-	2819	2	10538	3
ARB-061	ARBB068	-	-	39313	17	5512	4
ARB-062	ARBB069	-	-	75125	2	236943	3
ARB-063	ARBB070	-	-	31688	15	-	-

ARB-064	ARBB071	-	-	35801	15	14739	3
ARB-T65	ARBB072	-	-	-	-	-	-
ARB-065	ARBB073	-	-	105228	9	33822	3
ARB-T66	ARBB074	-	-	-	-	-	-
ARB-066	ARBB075	-	-	33394	15	1350	1
ARB-067	ARBB076	-	-	100631	29	13041	6
ARB-T68	ARBB077	-	-	-	-	-	-
ARB-068	ARBB078	-	-	136043	10	131328	8
ARB-069	ARBB079	-	-	26625	11	2252	2
ARB-070	ARBB080	-	-	111582	16	76679	10
ARB-071	ARBB081	-	-	67431	26	15884	7
ARB-072	ARBB082	3176	1	109981	27	110399	9
ARB-075	ARBB083	-	-	133725	41	54966	23
ARB-074	ARBB084	-	-	83271	43	22113	12
ARB-073	ARBB085	-	-	21140	5	14008	4
ARB-076	ARBB086	-	-	93794	33	55953	19
ARB-077	ARBB087	-	-	85929	30	2673	4
Témoin positif	CPOS01	27652	5	19137	8	80171	9
ARB-050	ARBC001	NA	NA	-	-	72248	2
ARB-78	ARBC002	NA	NA	9618	9	105315	2
ARB-79	ARBC003	NA	NA	5869	4	531971	8
ARB-80	ARBC004	NA	NA	1322	2	129446	4
ARB-81	ARBC005	NA	NA	617	1	273982	4
ARB-82	ARBC006	NA	NA	14241	11	264175	6
ARB-83	ARBC007	NA	NA	50917	17	23976	5
ARB-84	ARBC008	NA	NA	23515	3	214	1
ARB-85	ARBC009	NA	NA	1065	1	-	-
ARB-86	ARBC010	NA	NA	35767	5	1366	1
ARB-T86	ARBC011	NA	NA	726	1	-	-
ARB-87	ARBC012	NA	NA	30585	10	69502	1
ARB-88	ARBC013	NA	NA	718969	4	292640	4
ARB-89	ARBC014	NA	NA	307027	31	95980	17
ARB-T89	ARBC015	NA	NA	-	-	-	-
ARB-90	ARBC016	NA	NA	45366	27	12997	1
ARB-91	ARBC017	NA	NA	17114	15	-	-
ARB-92	ARBC018	NA	NA	16202	10	366	1
ARB-T92	ARBC019	NA	NA	-	-	-	-
ARB-93	ARBC020	NA	NA	5472	3	5878	1
ARB-94	ARBC021	NA	NA	-	-	-	-
ARB-95	ARBC022	NA	NA	135	1	4791	1
ARB-97	ARBC023	NA	NA	16172	2	113479	1
ARB-98	ARBC024	NA	NA	9788	2	-	-

ARB-99	ARBC025	NA	NA	489	2	-	-
ARB-100	ARBC026	NA	NA	2988	4	57787	2
ARB-101	ARBC027	NA	NA	500	1	-	-
ARB-102	ARBC028	NA	NA	10904	5	10863	1
ARB-103	ARBC029	NA	NA	2350	6	-	-
Témoin positif	CPOS308	NA	NA	983834	20	1039304	9

La figure ci-dessous (Figure 11) résume l'ensemble des espèces d'élasmobranches détectées par les amorces Elas01 et Elas02 comprenant 6 espèces de requin et 9 espèces de raies :

- Requin pointe blanche
- Requin bouledogue
- Requin dormeur
- Requin-tigre
- Requin sagrin
- Requin-marteau halicorne
- Raie aigle
- Raies pastenagues
- Raie pastenagues à taches noires
- Raie diable
- Petite manta
- Raie grise ou raie fouet
- Raie à museau
- Grande raie-guitare
- Raie torpille

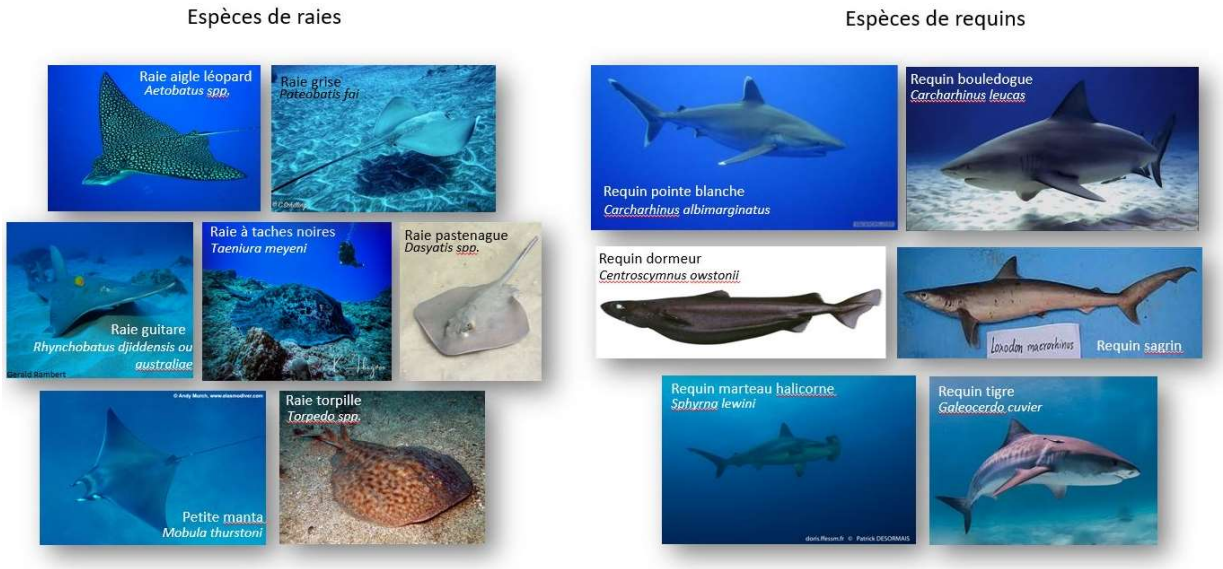


Figure 11. Espèces d'élasmobranches détectées par ADNe autour de La Réunion avec la méthode de métabarcoding en utilisant les amorces Elas01 et Elas02.

Les résultats sont présentés sous forme de cartographies dans le paragraphe ultérieur nommé « *C.5. Cartographie* ».

C.2. Analyses qPCR

La table 11 présente les résultats métabarcoding et qPCR pour les six espèces d'intérêt (raies et requins) pour les échantillons sélectionnés (voir Chapitre 1, Phase laboratoire). Nous observons une bonne cohérence générale entre les résultats de métabarcoding et qPCR pour la détection de ces six espèces d'intérêt, avec un nombre un peu plus élevé de détections positives avec la méthode de métabarcoding. Il faut noter que le nombre de réplicas positifs obtenus par métabarcoding est assez faible dans la plupart des cas, ce qui témoigne d'une présence rare de l'ADN de l'espèce au sein de l'extrait ADN. Le pipetage de cet ADN pour les PCR est donc aléatoire, d'où l'importance des réplicas. Contrairement à ce que nous pensions, la qPCR ne semble pas plus sensible que le métabarcoding pour la détection de ces espèces de raies et requins.

Table 11. Résultats de détection des espèces de raies et requins avec le nombre de réplicas positifs par amplification. Les '-' signifient qu'aucune séquence n'a été observée par métabarcoding. Les cases de couleur verte témoignent d'un résultat cohérant entre détection par qPCR et détection par métabarcoding, et inversement, les cases de couleur orange témoignent d'un résultat incohérent entre détection par qPCR et détection par métabarcoding.

		Elas01		Elas02		qPCR
Espèce	ID ARGALY	Nombre séquences	Nombre réplicas	Nombre séquences	Nombre réplicas	Nombre réplicas
Taeniurops meyeni (anciennement nommée Taeniura meyeni)	ARB016	78	1/8	-	-	ADN épuisé
	ARBB038	1352	2/8	-	-	3/12
	ARBB043	841	2/8	-	-	1/12
	ARBB059	1207	1/8	6986	1/8	0/12
	ARBB066	-	-	5302	1/8	1/12
	ARBB067	-	-	9053	1/8	0/12
	ARBB070	952	1/8	-	-	0/12
	ARBB078	437	1/8	5839	1/8	0/12
	ARBB083	2216	2/8	12043	2/8	3/12
	ARBB084	382	1/8	-	-	4/12
	ARBB054	-	-	-	-	0/12
	ARBC002	-	-	-	-	0/12
	ARBC017	-	-	-	-	0/12
	ARBB037	-	-	-	-	0/12
	ARBC018	-	-	-	-	0/12
	ARBC003	-	-	-	-	0/12
	ARBB065	-	-	3298	1/8	1/12

Rhynchobatus djiddensis ou *australiae* (identifié au genre)	ARBB082	22795	6/8	-	-	8/12
	ARBB050	-	-	-	-	0/12
	ARBC010	-	-	-	-	0/12
	ARBB069	-	-	-	-	0/12
	ARBB038	-	-	-	-	0/12
	ARBC004	-	-	-	-	0/12
	ARBC020	-	-	-	-	0/12
Galeocerdo cuvier	ARBB047	1887	2/8	12531	3/8	4/12
	ARBB078	431	1/8	1373	1/8	3/12
	ARBB061	16147	6/8	61228	7/8	10/12
	ARBB050	-	-	-	-	0/12
	ARBC010	-	-	-	-	0/12
	ARBB069	-	-	-	-	0/12
	ARBC009	-	-	-	-	0/12
	ARBC002	-	-	-	-	0/12
	ARBC017	-	-	-	-	0/12
Carcharhinus leucas	ARBB073	2143	1/8	3885	1/8	0/12
	ARBB037	-	-	10843	1/8	0/12
	ARBB071	-	-	7009	1/8	0/12
	ARBB082	5767	3/8	22804	4/8	0/12
	ARBC022	-	-	4791	2/8	0/12
	ARBB078	-	-	-	-	0/12
	ARBC009	-	-	-	-	0/12
	ARBB047	-	-	-	-	0/12
	ARBB053	-	-	-	-	0/12
	ARBB085	-	-	-	-	0/12
	ARBC027	-	-	-	-	0/12
	ARBC002	-	-	-	-	0/12
	ARBC017	-	-	-	-	0/12
Sphyrna lewini	ARBB042	6473	4/8	18457	2/8	9/12
	ARBB046	-	-	12406	1/8	3/12
	ARBB052	696	1/8	21233	3/8	5/12
	ARBB053	-	-	4864	1/8	0/12
	ARBB061	4950	3/8	8158	1/8	2/12
	ARBB050	-	-	-	-	0/12
	ARBC010	-	-	-	-	0/12
	ARBB069	-	-	-	-	0/12
	ARBB079	-	-	-	-	0/12
	ARBB080	-	-	-	-	0/12
	ARBB044	-	-	-	-	0/12
	ARBC007	-	-	-	-	0/12

	ARBC002	-	-	-	-	0/12
	ARBC017	-	-	-	-	0/12
Nebrius ferrugineus	ARBB049	-	-	-	-	0/12
	ARBB067	-	-	-	-	0/12
	ARBB068	-	-	-	-	0/12
	ARBC013	-	-	-	-	0/12
	ARBB047	-	-	-	-	0/12
	ARBB078	-	-	-	-	0/12
	ARBC009	-	-	-	-	0/12
	ARBC002	-	-	-	-	0/12
	ARBC017	-	-	-	-	0/12

Des analyses statistiques (métabarcoding versus qPCR) ont été effectuées pour comparer les méthodes. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre la méthode par qPCR et celle par metabarcoding.

Pour ces analyses, le nombre total de réplicas a été normalisé pour pouvoir comparer le nombre de réplicas positifs entre méthodes : 8 réplicas pour le métabarcoding et 12 pour les qPCR. Les résultats sont présentés au sein des figures 11 et 12. Leurs petites valeurs-p (dit aussi p-values, probabilité pour un modèle statistique donné sous l'hypothèse nulle d'obtenir une valeur au moins aussi extrême que celle observée) correspondent aux p-values associées aux tests de comparaison des moyennes. Il n'y a pas de différence significative en prenant toutes les espèces de raies et requins et en regardant espèce par espèce (Figures 11 et 12). Ainsi en regardant espèce par espèce, il n'y a pas de différence significative entre les moyennes du nombre de replicas positifs (Figure 11). La p-value est très légèrement en dessous du seuil classique de 0.05 seulement pour la première espèce mais ce n'est pas très franc. On ne peut donc pas démontrer statistiquement qu'une des deux méthodes marcherait mieux que l'autre. Néanmoins, il y a beaucoup de 0 dans les données, d'où la forme peu habituelle des boxplot. Ça aurait été plus lisible avec des logs, mais on supprimerait trop de valeurs (toujours à cause des 0). Néanmoins, si on regarde seulement les résultats du requin tigre avec un test statistique confrontant Elas02 avec qPCR, le test est significatif.

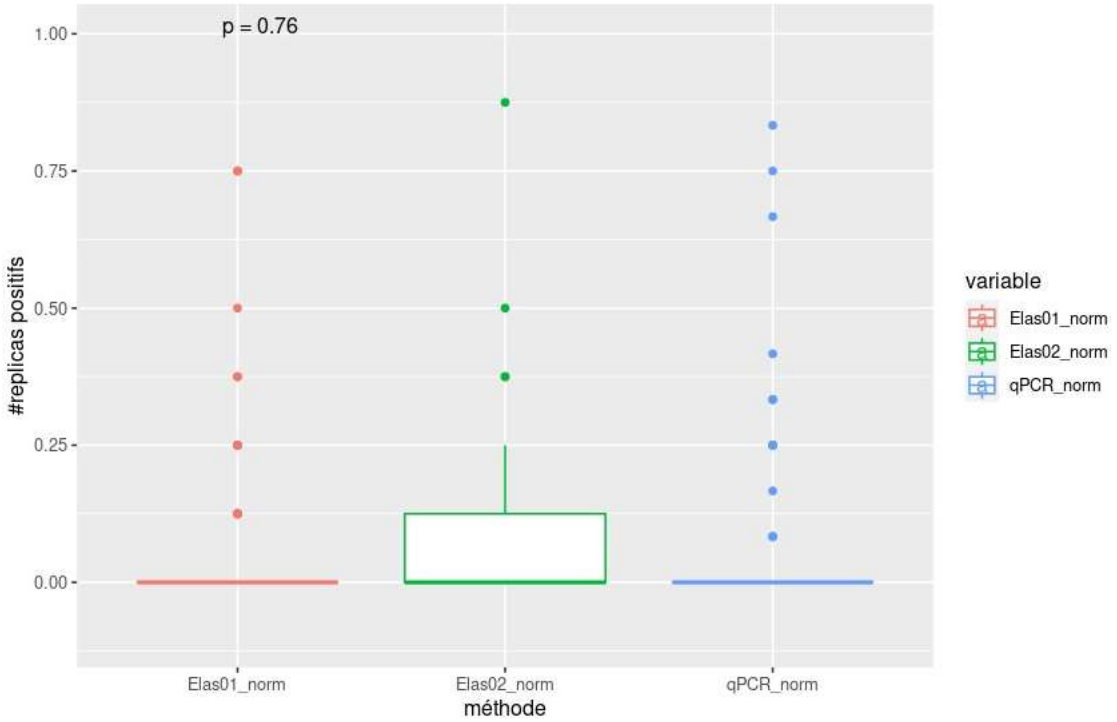


Figure 11. Comparaison des méthodes de détection par métabarcoding (Elas01 et Elas02) et qPCR sur les résultats des 6 espèces de requins et raies confondues (Requin bouledogue - *Carcharhinus leucas*, Requin nourrice fauve - *Nebrius ferrugineus*, Requin tigre - *Galeocerdo cuvier*, Requin marteau halicorne - *Sphyrna lewini*, Raie à tâches noires - *Taeniurops meyeni* nommée avant *Taeniura meyeni*, Grande raie guitare –*Rhynchobatus djiddensis*). Le nombre de réplicas positifs a été normalisé avec le nombre de réplicas total.

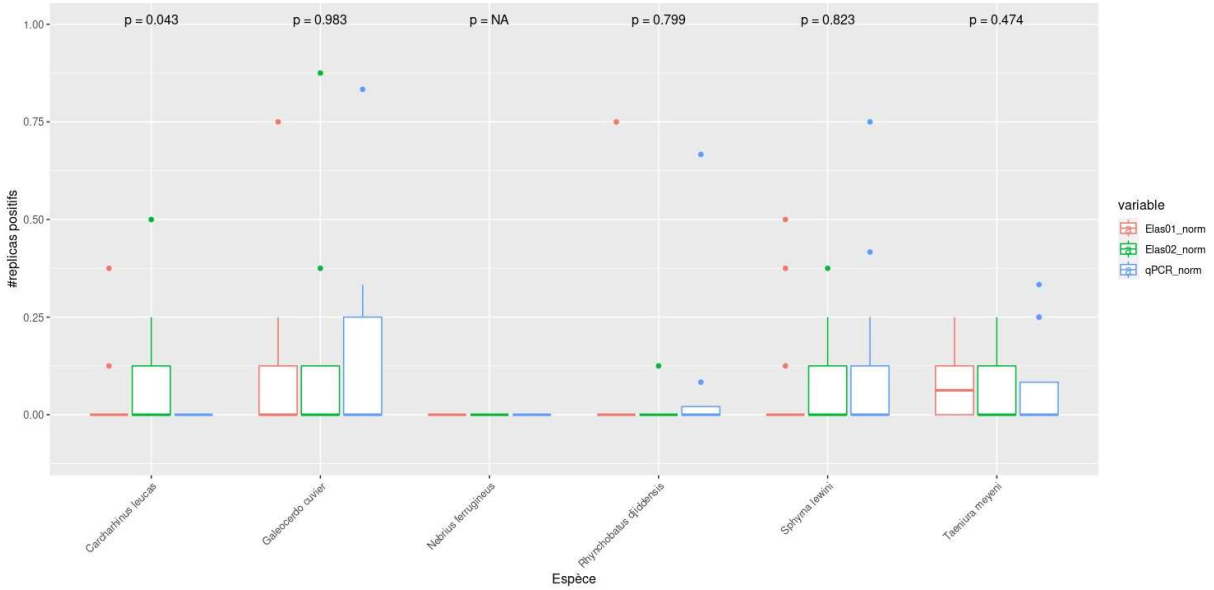


Figure 12. Comparaison des méthodes de détection par métabarcoding (Elas01 et Elas02) et qPCR selon les 6 espèces étudiées dont les amorces ont été développées (Requin bouledogue - *Carcharhinus leucas*, Requin nourrice fauve - *Nebrius ferrugineus*, Requin tigre - *Galeocerdo cuvier*, Requin marteau halicorne - *Sphyrna lewini*, Raie à tâches noires - *Taeniurops meyeni* nommée avant *Taeniura meyeni*, Grande raie guitare –*Rhynchobatus djiddensis*). Le nombre de réplicas positifs a été normalisé avec le nombre de réplicas total.

C.3. Complément d'information sur les alignements et phylogénies

1) Rhynchobatus

La figure 13 présente les résultats issus d'alignement de génome d'ADN mitochondiraux complets issus de la base internationale NCBI du genre Rhynchobatus suite à un alignement avec la méthode du maximum de vraisemblance et le modèle de Tamura-Nei (1993). L'arbre consensuel de bootstrap (Felsenstein 1985) a été déduit à partir de 1000 répétitions. Les branches correspondant à des partitions reproduites dans moins de 50 % des répliques bootstrap sont réduites. Le pourcentage d'arbres répliqués dans lesquels les taxons associés se sont regroupés dans le test bootstrap (1000 répliques) est indiqué à côté des branches. Les arbres initiaux pour la recherche heuristique ont été obtenus automatiquement en appliquant les algorithmes NJ et BioNJ à une matrice de distances par paire estimées à l'aide du modèle Tamura-Nei, puis en sélectionnant la topologie ayant une valeur de log vraisemblance supérieure. Cette analyse a porté sur 6 séquences nucléotidiques. Il y avait un total de 17256 positions dans le jeu de données final. Les analyses ont été réalisées avec MEGA11 (Tamura et al. 2021).

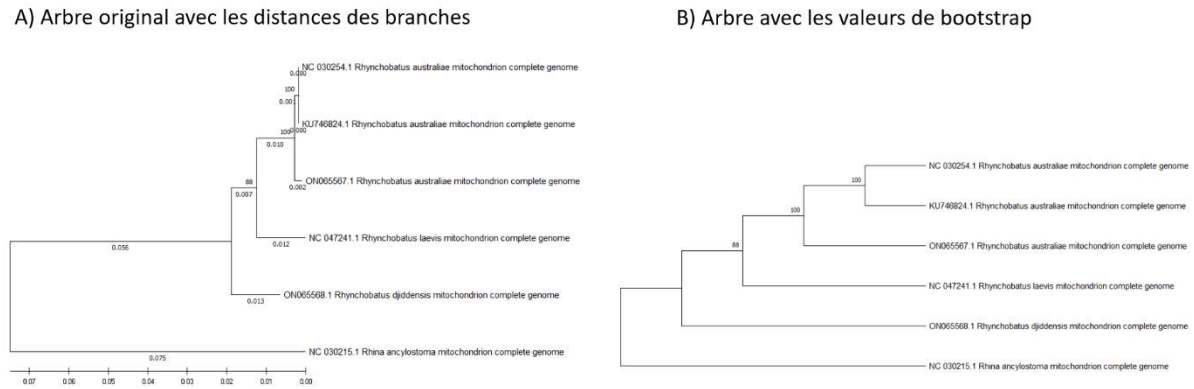
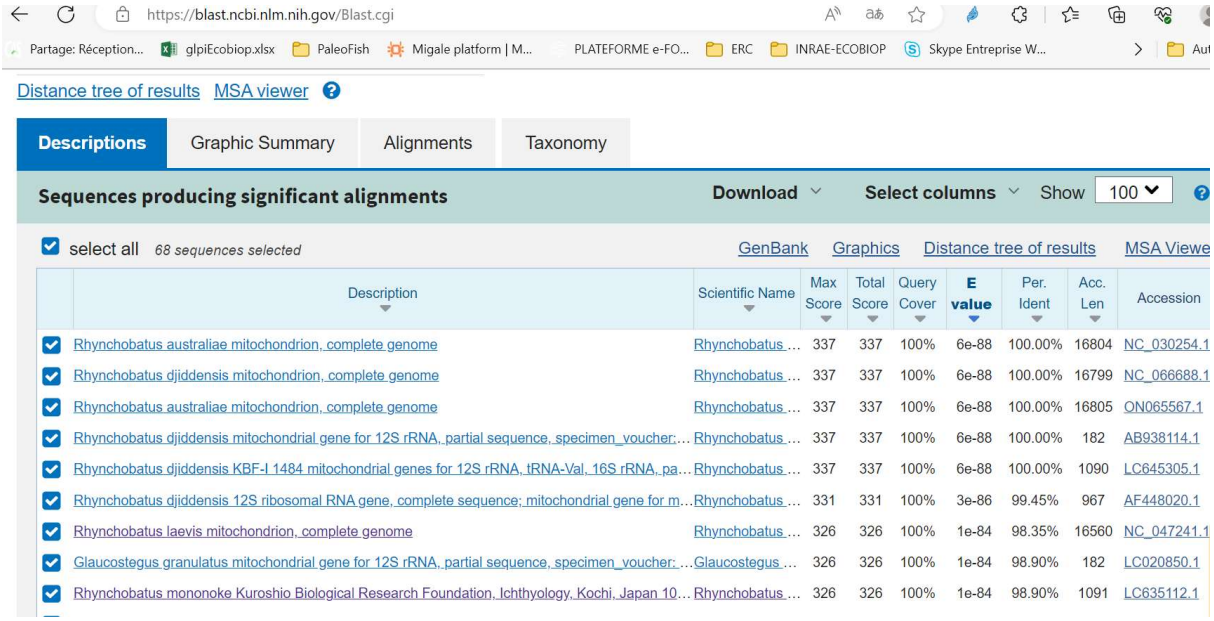


Figure 13. Arbre phylogénétique de l'ADN mitochondrial des raies du genre Rhynchobatus avec les deux raies potentiellement présentes à La Réunion (*Rhynchobatus australiae* et R. *djiddensis*) ainsi qu'un outgroup (*Rhina ancylostoma*).

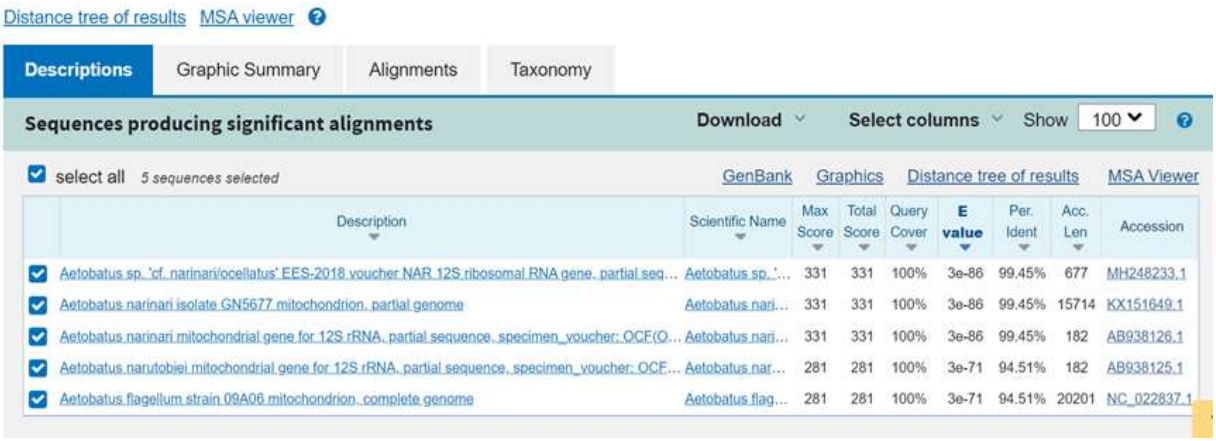
Les résultats montrent que les 2 espèces de raies *Rhynchobatus australiae* et *R. djiddensis* se distinguent génétiquement. La longueur de l'ADN mitochondrial de *Rhynchobatus djiddensis* est égal à 16799 nucléotides et *Rhynchobatus australiae* 16804 nucléotides. Ces deux espèces ont 16317 nucléotides en commun. Les nucléotides différents entre ces 2 espèces sont des transitions (447 transitions contre 33 transversions). Une transition est une substitution entre deux bases sans changement de famille (une purine en une autre purine, ou pyrimidine en une autre pyrimidine). Une transversion est un changement de famille (une purine qui se transforme en pyrimidine ou l'inverse). Malgré ces différences sur l'ADN mitochondrial, la séquence amplifiée de 12S par Elas01 et Elas02 est tout d'abord la même entre les deux types d'amorces (taille 337 paires de bases de nucléotides) et identique entre les 2 espèces de *Rhynchobatus.* Ce résultat entraine un alignement égal à 100% pour les deux espèces des ADNe détectés autour de La Réunion (exemple de résultat de blast avec NCBI ci-dessous) :



Selon la littérature et une revue qui doit sortir prochainement sur la liste des espèces de poissons marins à La Réunion (Wickel et al. personnal communication), les deux espèces auraient été observées. Il est donc primordial de développer une amorce spécifique pour distinguer cette espèce dans un prochain projet. Nous avons donc spécifié dans notre table de données et cartographie : « *Rhynchobatus australiae ou Rhynchobatus djiddensis* » comme nous ne sommes pas en capacité de les différencier génétiquement avec les amorces utilisées.

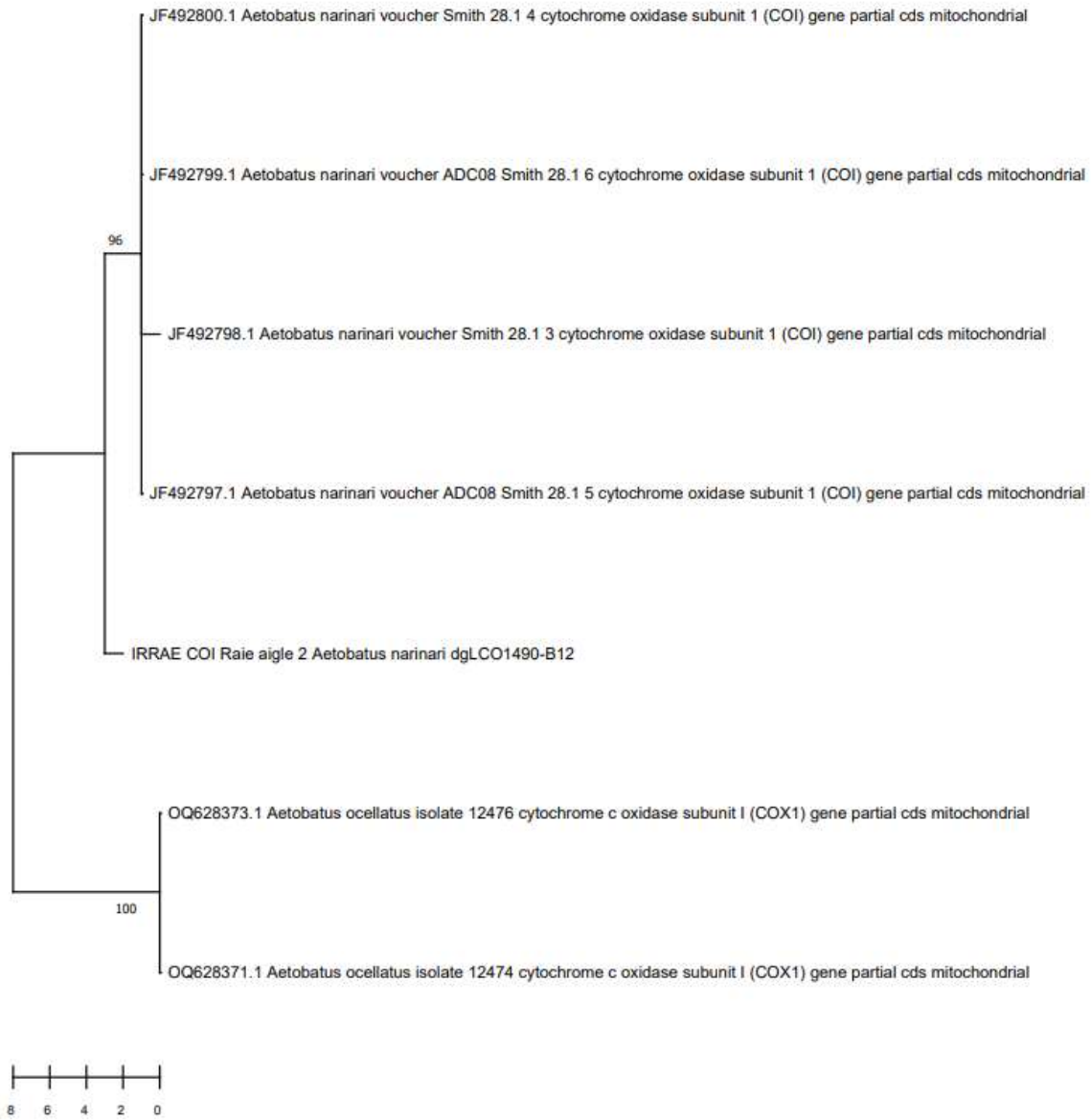
2) *Aetobatus*

Concernant la raie aigle, le seul génome de référence que nous avons au niveau du 12S sur NCBI est celui de *Aetobatus narinari*. Ce qui signifie que les séquences trouvées dans nos échantillons amplifiés à partir des amorces Elas01 et Elas02 s'affiliaient à 99.45% avec *Aetobatus narinari et Aetobatus sp,* ; voir l'exemple ci-dessous avec Elas01 :



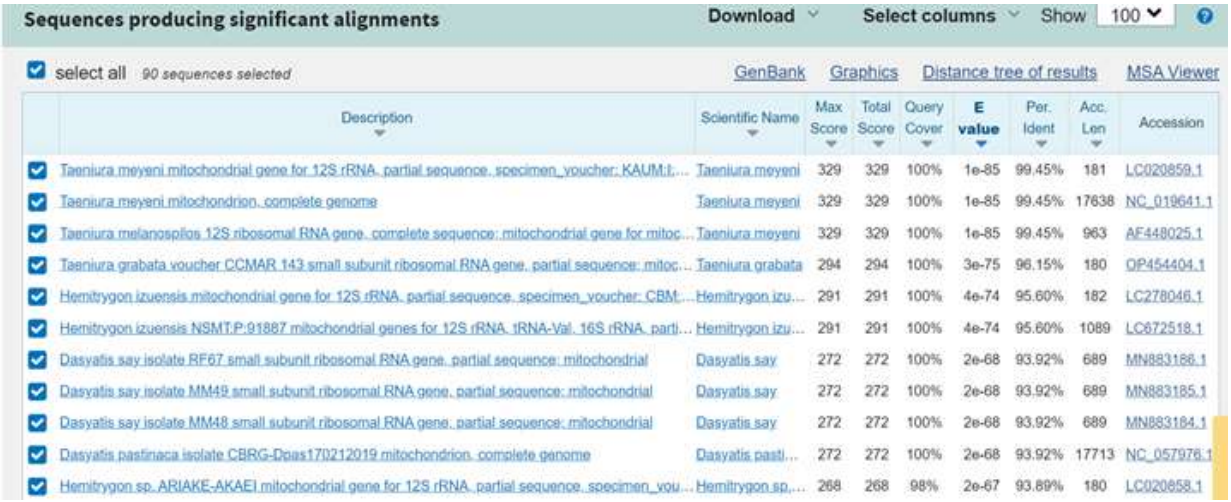
Par mesure de précaution, nous avons ainsi identifié à *Aetobatus sp*. dans nos données. Ces données étant bancarisées, des analyses futures pourront être effectuées lorsque les génomes de références des *Aetobatus* de l'océan Indien auront été publiés.

De notre côté, nous avons étudié les séquences mitochondriales permettant d'optimiser la différenciation taxonomique des *Aetobatus.* Nous avons ainsi prélevé un morceau de tissus d'une raie aigle morte provenant de Mayotte, extrait l'ADN et effectué l'amplification du COI puisque les génomes de référence des *Aetobatus* sont plus nombreux sur cette section (COI). L'arbre phylogénique (ci-dessous) montre une affiliation plus proche de *A. narinari* que de *A. ocellatus*. Néanmoins, la branche de l'arbre de notre échantillon n'est pas groupée avec le clade des *A. narinari* comme si notre échantillon était une nouvelle espèce.



3) *Taeniura*

Taeniura meyeni a changé de nom récemment pour *Teniurops meyeni.* Les résultats par blast sur NCBI sont cohérents avec les résultats d'alignement issus de la suite de programmes OBITools et les bases de données globales (NBCI, ARGALY, Bold) *:*



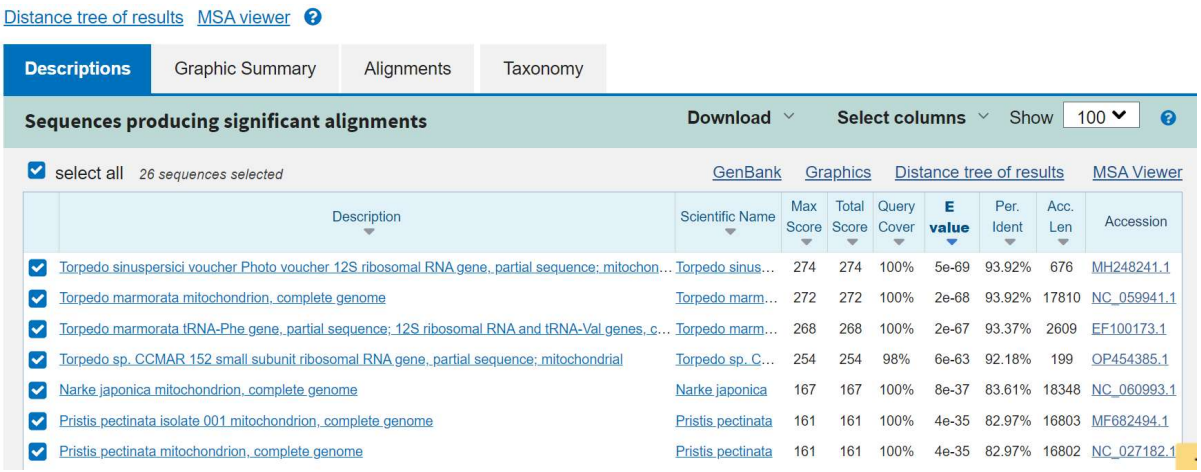
Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all *90 sequences selected* — GenBank — Graphics — Distance tree of results — MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Taeniura meyeni mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen_voucher: KAUM:I:...	Taeniura meyeni	329	329	100%	1e-85	99.45%	181	LC020859.1
Taeniura meyeni mitochondrion, complete genome	Taeniura meyeni	329	329	100%	1e-85	99.45%	17638	NC_019641.1
Taeniura melanospilos 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; mitochondrial gene for mitoc...	Taeniura meyeni	329	329	100%	1e-85	99.45%	963	AF448025.1
Taeniura grabata voucher CCMAR 143 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitoc...	Taeniura grabata	294	294	100%	3e-75	96.15%	180	OP454404.1
Hemitrygon izuensis mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen_voucher: CBM:...	Hemitrygon izu...	291	291	100%	4e-74	95.60%	182	LC278046.1
Hemitrygon izuensis NSMT:P:91887 mitochondrial genes for 12S rRNA, tRNA-Val, 16S rRNA, parti...	Hemitrygon izu...	291	291	100%	4e-74	95.60%	1089	LC672518.1
Dasyatis say isolate RF67 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	Dasyatis say	272	272	100%	2e-68	93.92%	689	MN883186.1
Dasyatis say isolate MM49 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	Dasyatis say	272	272	100%	2e-68	93.92%	689	MN883185.1
Dasyatis say isolate MM48 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	Dasyatis say	272	272	100%	2e-68	93.92%	689	MN883184.1
Dasyatis pastinaca isolate CBRG-Dpas170212019 mitochondrion, complete genome	Dasyatis pasti...	272	272	100%	2e-68	93.92%	17713	NC_057976.1
Hemitrygon sp. ARIAKE-AKAEI mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen_vou...	Hemitrygon sp....	268	268	98%	2e-67	93.89%	180	LC020858.1

4) *Torpedo*

Les amorces Elas01 et Elas02 s'alignent sur *Torpedo sinuspersici* (Torpille auréolée) (voir l'exemple avec l'alignement Elas01 sur NCBI). Cependant l'autre espèce également présente à La Réunion, *Torpedo fuscomaculata*, possède seulement le COI en génome de référence et pas le 12S. Il faudra donc soit utiliser des amorces du COI pour compléter celles du 12S ou améliorer la base de données en amplifiant le 12S de cette espèce. Ces résultats expliquent ainsi les raisons pour lesquelles nous avons mis dans la base de données de nos résultats taxonomiques *Topredo sp*.



Distance tree of results — MSA viewer

Descriptions — Graphic Summary — Alignments — Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all *26 sequences selected* — GenBank — Graphics — Distance tree of results — MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Torpedo sinuspersici voucher Photo voucher 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochon...	Torpedo sinus...	274	274	100%	5e-69	93.92%	676	MH248241.1
Torpedo marmorata mitochondrion, complete genome	Torpedo marm...	272	272	100%	2e-68	93.92%	17810	NC_059941.1
Torpedo marmorata tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA and tRNA-Val genes, c...	Torpedo marm...	268	268	100%	2e-67	93.37%	2609	EF100173.1
Torpedo sp. CCMAR 152 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	Torpedo sp. C...	254	254	98%	6e-63	92.18%	199	OP454385.1
Narke japonica mitochondrion, complete genome	Narke japonica	167	167	100%	8e-37	83.61%	18348	NC_060993.1
Pristis pectinata isolate 001 mitochondrion, complete genome	Pristis pectinata	161	161	100%	4e-35	82.97%	16803	MF682494.1
Pristis pectinata mitochondrion, complete genome	Pristis pectinata	161	161	100%	4e-35	82.97%	16802	NC_027182.1

C.5. Persistance de l'ADNe en milieu marin tropical

En ce qui concerne la préservation et la dispersion potentielle de l'ADNe dans les océans, des températures élevées augmentent la cinétique de nombreux processus responsables de la dégradation de l'ADN, notamment : la lyse des cellules et des organites, l'hydrolyse et l'oxydation des molécules d'ADN, et la dégradation par des enzymes extracellulaires (McCartin et al. 2022). L'ADNe peut persister à des concentrations quantifiables pendant plus de 2 semaines à basse température (≤ 10 °C) et une semaine (ou moins) à ≥ 20 °C (McCartin et al. 2022). Dans notre étude les eaux marines tropicales étaient toujours supérieures à 20 °C avec une moyenne à 25,7 °C. Selon McCartin et al. (2022), la dégradation de 99,9 % de l'ADNe dans l'eau de mer à des températures supérieures à 25 °C est très élevée, et elle entraine une persistance de l'ADNe faible allant de quelques heures à 3 jours maximum. Il pourrait être intéressant de faire des simulations de dérive des particules sur cette échelle temporelle (quelques heures à 3 jours) pour fournir des cartographies de la zone d'origine des ADNe collectées. Néanmoins ces résultats bibliographiques vont dans le sens de l'hypothèse de détection de l'ADNe provenant d'individu qui sont passés dans le milieu quelques heures avant. Cette hypothèse pourrait expliquer la non détection de certaines espèces, comme le requin cuivre (*Carcharhinus brachyurus*), observé ou capturé dans certaines zones et périodes. L'ADNe dans les eaux chaudes et tropicales serait plus une méthode « one-shot », c'est-à-dire une détection sur une courte période temporelle évitant les reliquats ancestraux.

C.6. Cartographie

Cette section présente l'ensemble des résultats de détection par ADNe à partir de la méthode de métabarcoding en utilisant les amorces Elas01 et Elas02. Les noms vernaculaires se retrouvent dans cette section et les mêmes cartes avec les noms latin en annexes. Dans le chapitre précédent (page 23), nous avons vu les différences entre Elas01 et Elas02. Des cartographies en annexes présentent également les résultats avec les amorces séparément. Dans cette section, nous présentons les résultats des deux amorces combinées proportionnellement au nombre de séquences détectées sur le site et une autre carte en fonction des occurrences (présence ou absence de l'espèce, donc selon les OTU).

1) *Bilan des groupes détectés :*

Les figures 14 et 15 montrent qu'un grand nombre d'espèces est détecté par les amorces utilisées, dont les contaminations par l'homme (ex. baigneurs, plongeurs, et préleveurs). Cependant les résultats n'ont pas été impactés. Parmi les cétacés détectés, il y a la baleine à bosse (*Megaptera novaeangliae*), le grand dauphin de l'océan Indien (*Tursiops aduncus*), et *le grand dauphin* (*Tursiops truncatus*). Concernant les tortues, il s'agit de la tortue verte (*Chelonia mydas*). Néanmoins les amorces utilisées ne sont pas dessinées pour détecter avec optimisation ces groupes et nous déconseillons de les utiliser. Les animaux terrestres détectés sont les chats, les souris, les rats et les cochons. L'ADN de cochon a par exemple été détecté sur les sites de Sainte Marie, le Sec Saint Paul, la baie de Saint Paul, Saint Denis, Roches Noires, et étang du Gol. Néanmoins, nous ne sommes pas à l'abri d'erreurs puisqu'un témoin négatif (T86) contenait du cochon signifiant que l'ADN a été ramené par un des préleveurs sur le bateau (ex. repas avant la campagne scientifique d'un cari pied de porc). Nous avons donc mentionné uniquement les sites pour lesquels le témoin négatif était négatif. Les

cartographies de cette section représentent les résultats de l'ensemble des données (3 campagnes en mer).

L'amorce Elas01 étant l'équivalent du MiFish, les résultats ont une bonne détectabilité des poissons (voir en détail les résultats dans la section suivante).

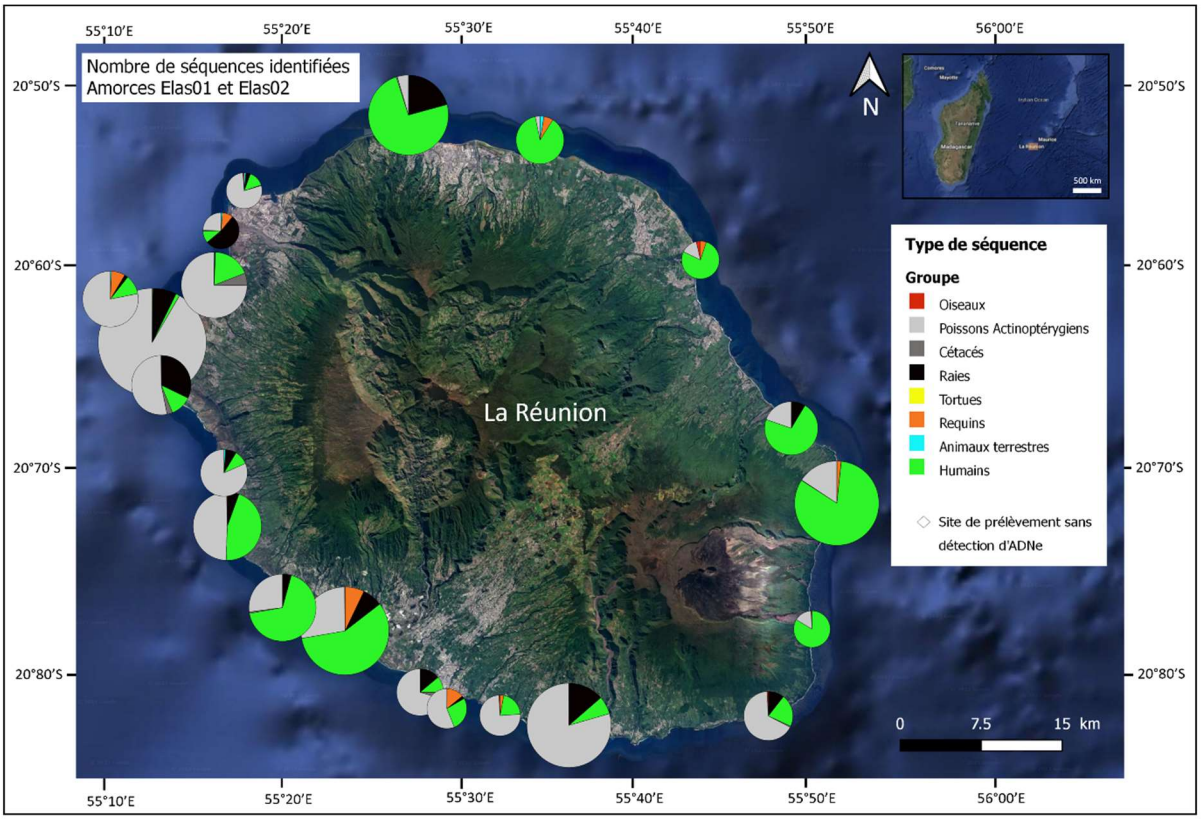


Figure 14. Espèces détectées par groupe autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de séquences.

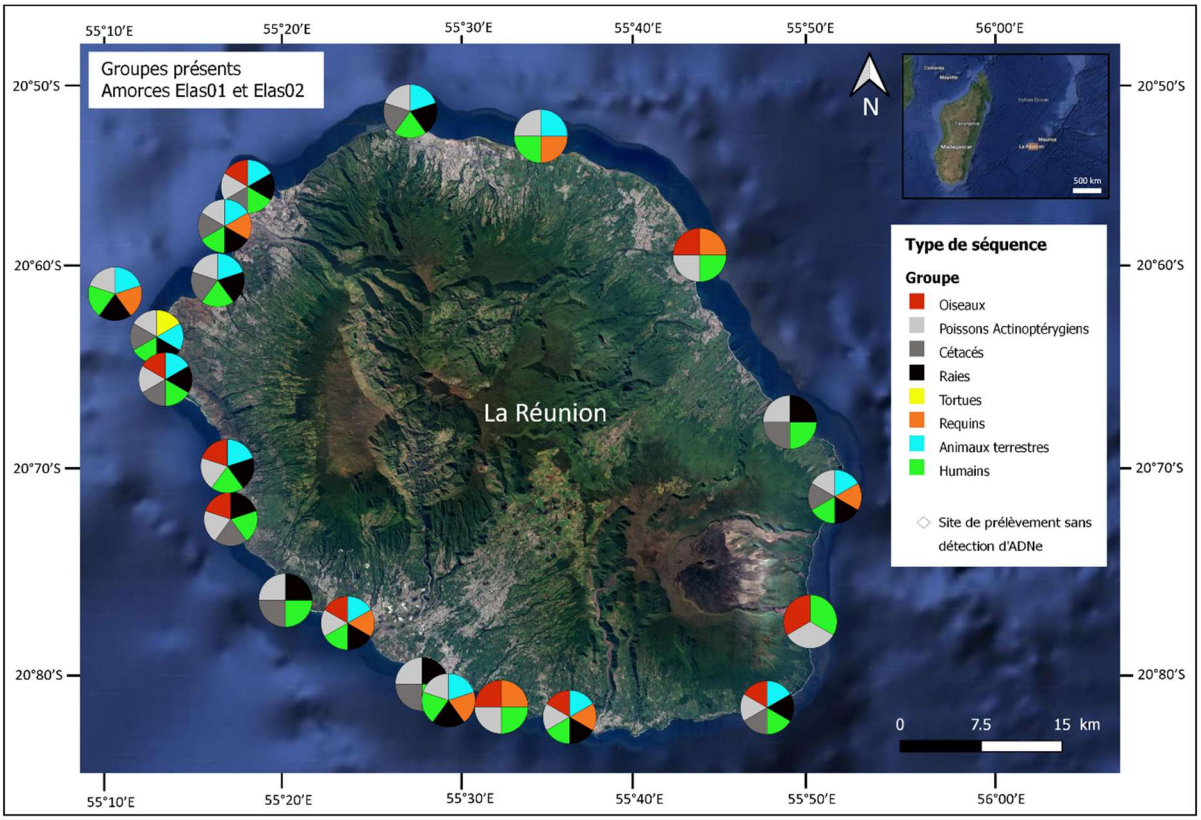


Figure 15. Espèces détectées par groupe autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces.

2) Poissons osseux détectés :

La famille des Labridae représente les poissons dont le nombre de séquences sont les plus nombreux particulièrement dans l'Ouest et le Nord-Ouest (Figure 16). La famille des Molidae a été détectée seulement dans le Nord de l'île. Des analyses plus poussées ont été effectuées dans le « Chapitre IV - Approche écosystémique » (Figure 17). Les familles dont les OTUs étaient les plus nombreux (minimum 4 OTUs) étaient : Acanthuridae, Balistidae, Labridae, Lutjanidae, Monacanthidae, Mugilidae, Mullidae, Muraenidae, Myctophidae, Pomacanthidae, Tetraodontidae. Les cartographies de cette section représentent les résultats de l'ensemble des données (3 campagnes en mer). Elas01 a pu détecter 32 familles de poisson contre 22 familles pour Elas01 (Annexe 2).

En annexe 2 sont présentés les résultats avec les amorces Elas01 et Elas02 séparément.

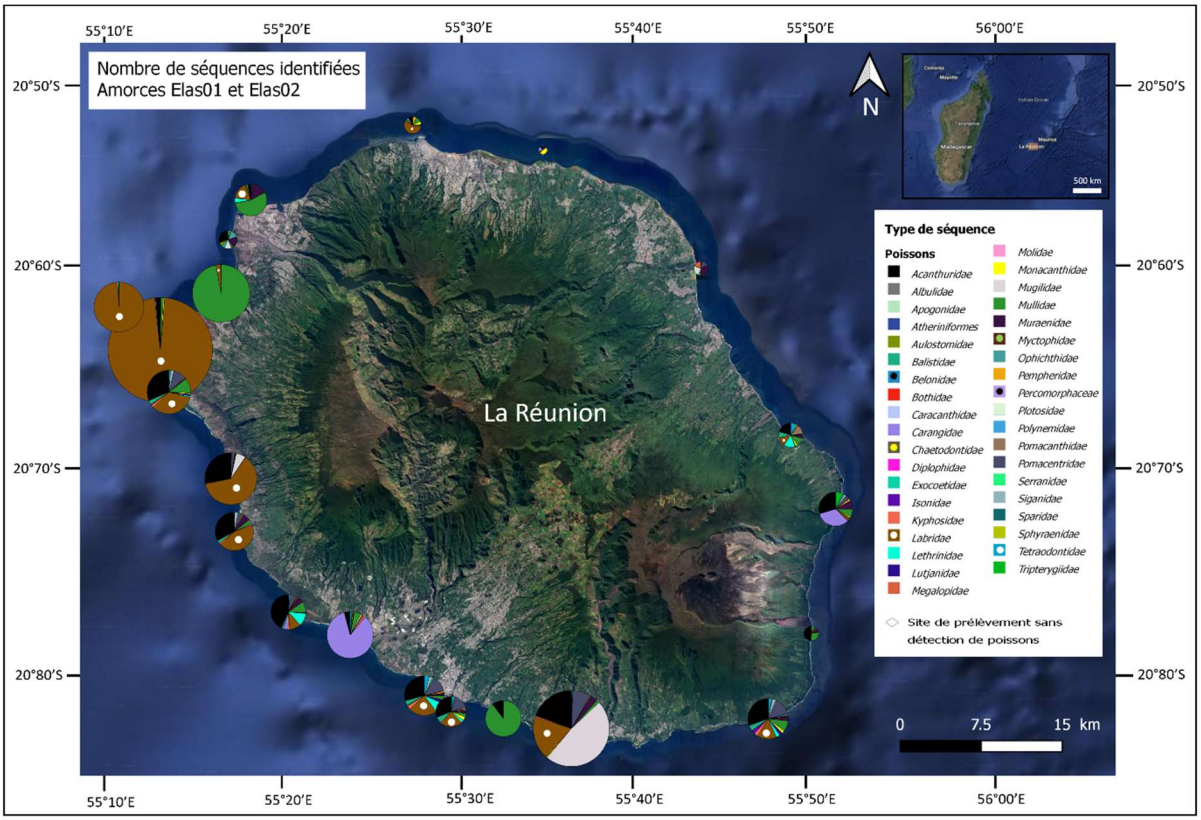


Figure 16. Famille des poissons détectées autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces.

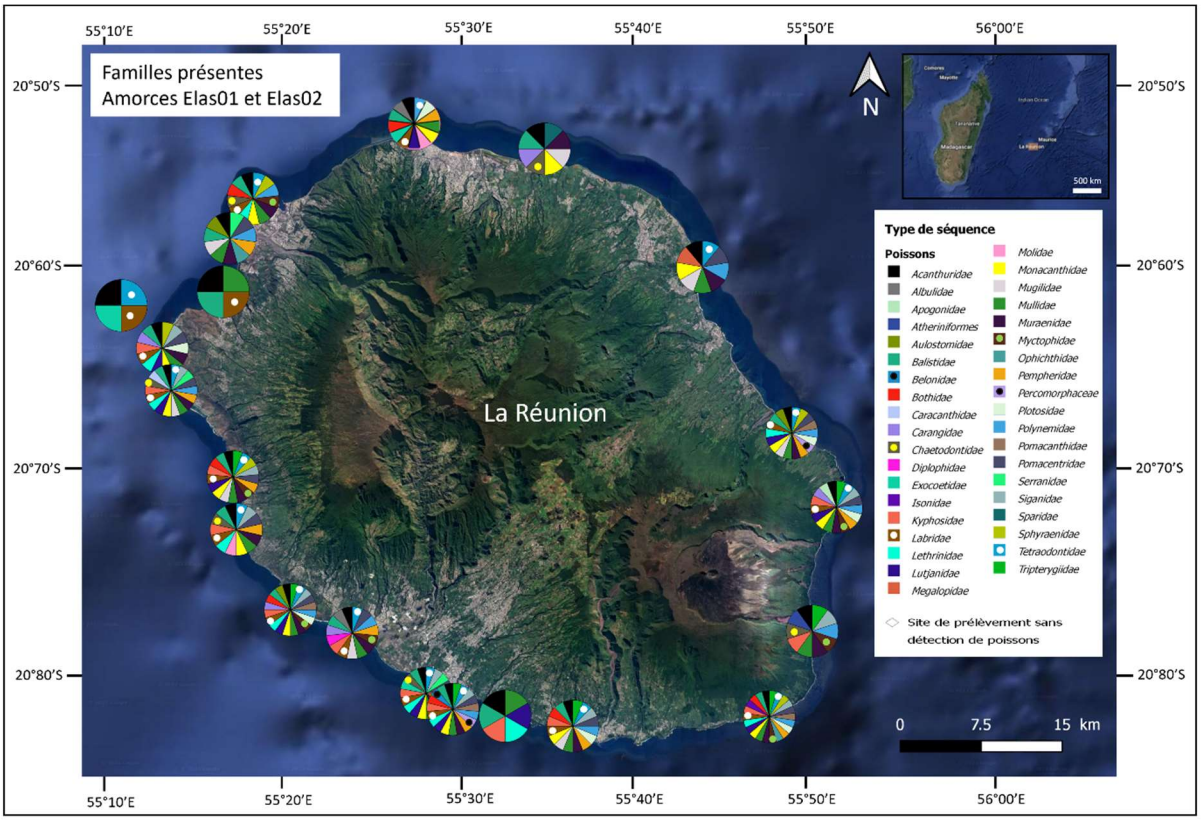


Figure 17. Famille des poissons détectées autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces.

3) Elasmobranches :

Les cartographies de cette section représentent les résultats de l'ensemble des données (3 campagnes en mer). L'annexe 3 reprend la cartographie des élasmobranches par campagne. Nous pouvons clairement identifier des différences laissant suggérer des modifications temporelles dans la présence des espèces autour de l'île.

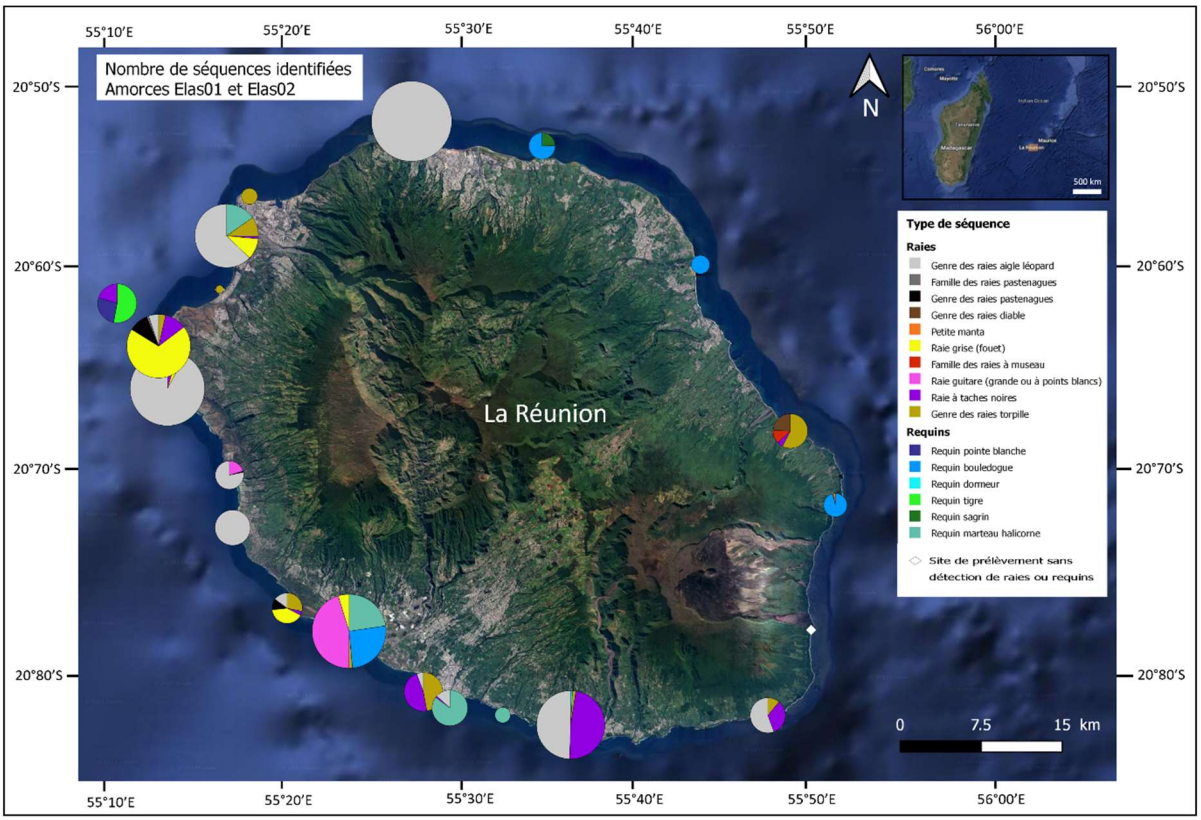


Figure 18. Elasmobranches détectés autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces. Les points blancs représentent la non détection des espèces malgré des prélèvements et analyses en ADNe.

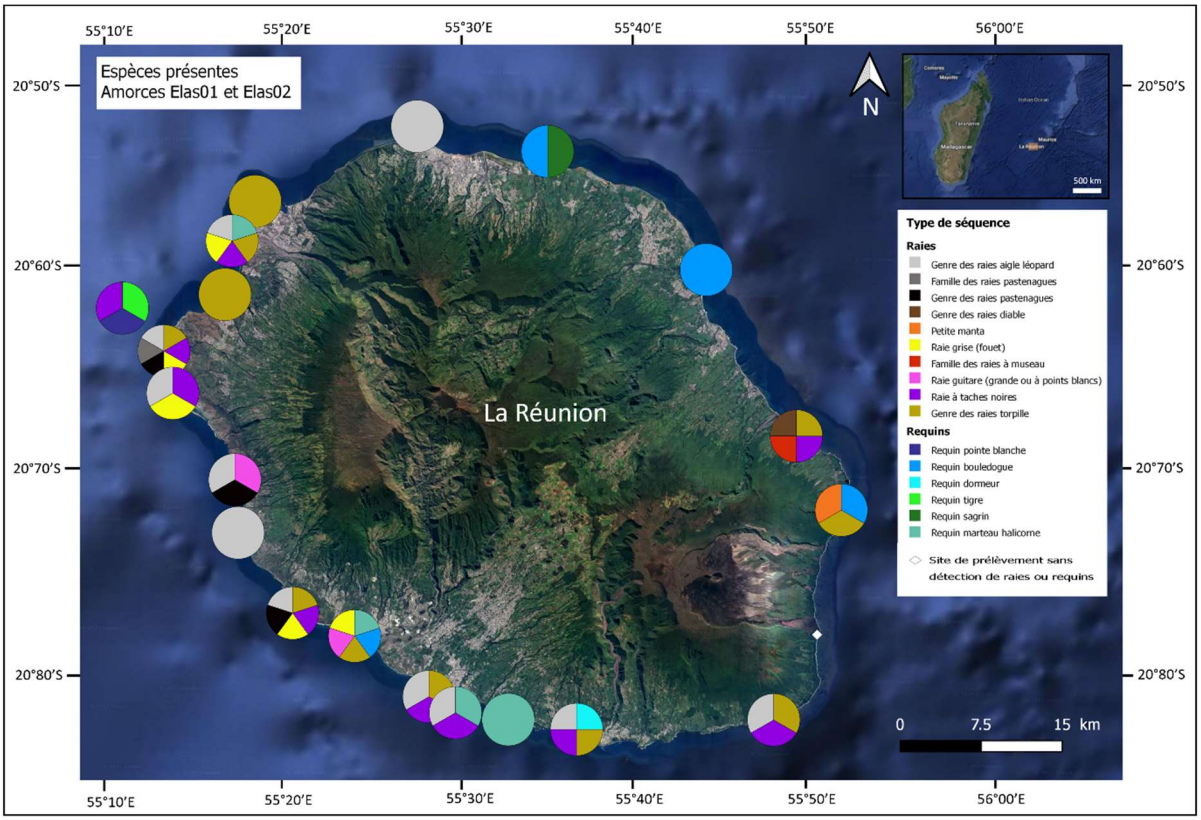


Figure 19. Elasmobranches détectés autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces. Les points blancs représentent la non détection des espèces malgré des prélèvements et analyses en ADNe.

4) Requins :

<u>Résultats sur les 3 campagnes</u> :

Les cartographies de cette section représentent les résultats de l'ensemble des données (3 campagnes en mer). Selon les observations autour de l'île de La réunion, le requin tigre (*Galeocerdo cuvier)* se retrouvent dans les zones pélagiques et côtières comme la pointe des châteaux à St-Leu et Le Sec de Saint-Paul mais nous ne l'avons pas détecté par ADNe probablement car il n'avait pas passé ces milieux dans les heures précédents nos prélèvements. Concernant le requin marteau halicorne (*Sphyrna lewini)*, il a été détecté dans de nombreux endroits dans le Sud-Ouest de l'île ainsi que vers Saint-Paul. Le requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*) est plus détecté par l'amorce Elas02. Il a été détecté sur 5 sites géographiques par ordre du nombre de séquences le plus élevé au moins élevé sur les sites : Etang salé, Anse des Cascades, Rivière des Galets, Sainte Marie, et Saint Benoit. Au regard des cartographies (Figures 20 et 22), il semble bien réparti dans l'Est de La Réunion. Le requin pointe blanche (*Carcharhinus albimarginatus*) a été détecté seulement vers le large de Saint-Gilles. D'autres requins comme le requin sagrin (Nord de l'île) et dormeur (Sud de l'île) ont également été détectés par les amorces Elas01 et Elas02. Le requin nourrice fauve (*Nebrius ferrugineus*) n'a pas été détecté avec les amorces Elas01 et Elas02 dans nos échantillons autour de La Réunion. Les cartes représentant les espèces de requins selon le type d'amorce, en noms latins et vernaculaires, se trouvent en Annexe 4.

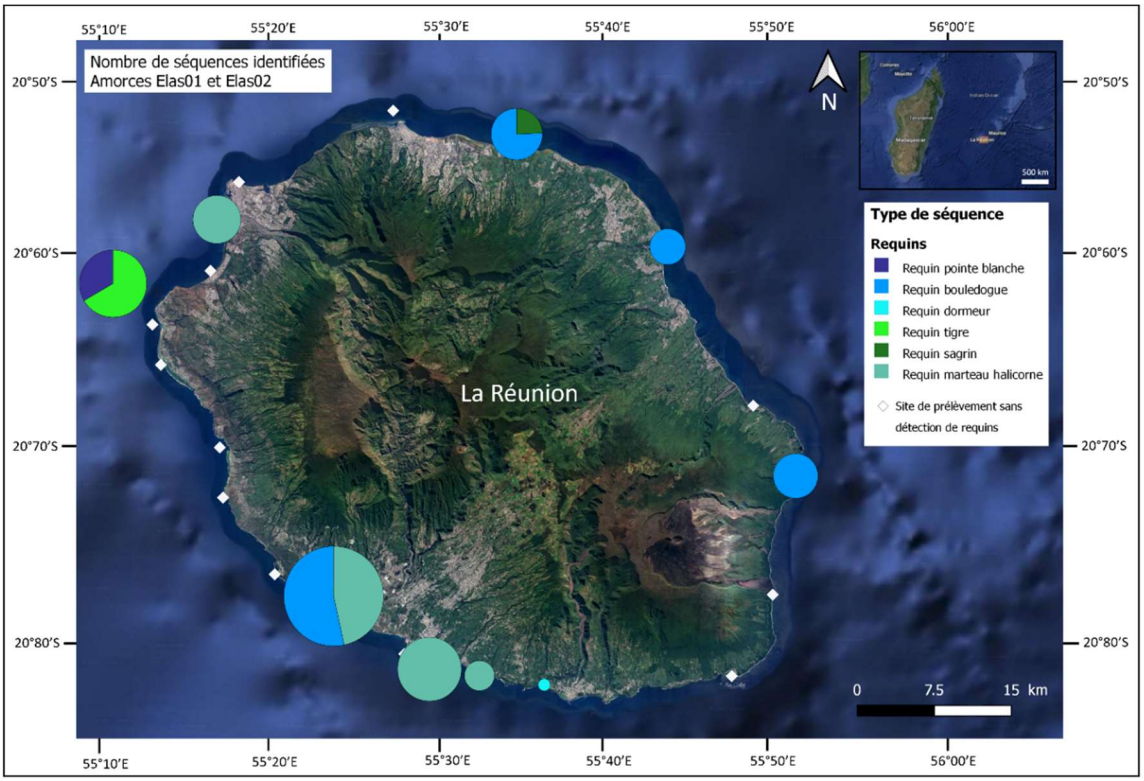


Figure 20. Requins détectés autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces. Les points blancs représentent la non détection des espèces malgré des prélèvements et analyses en ADNe.

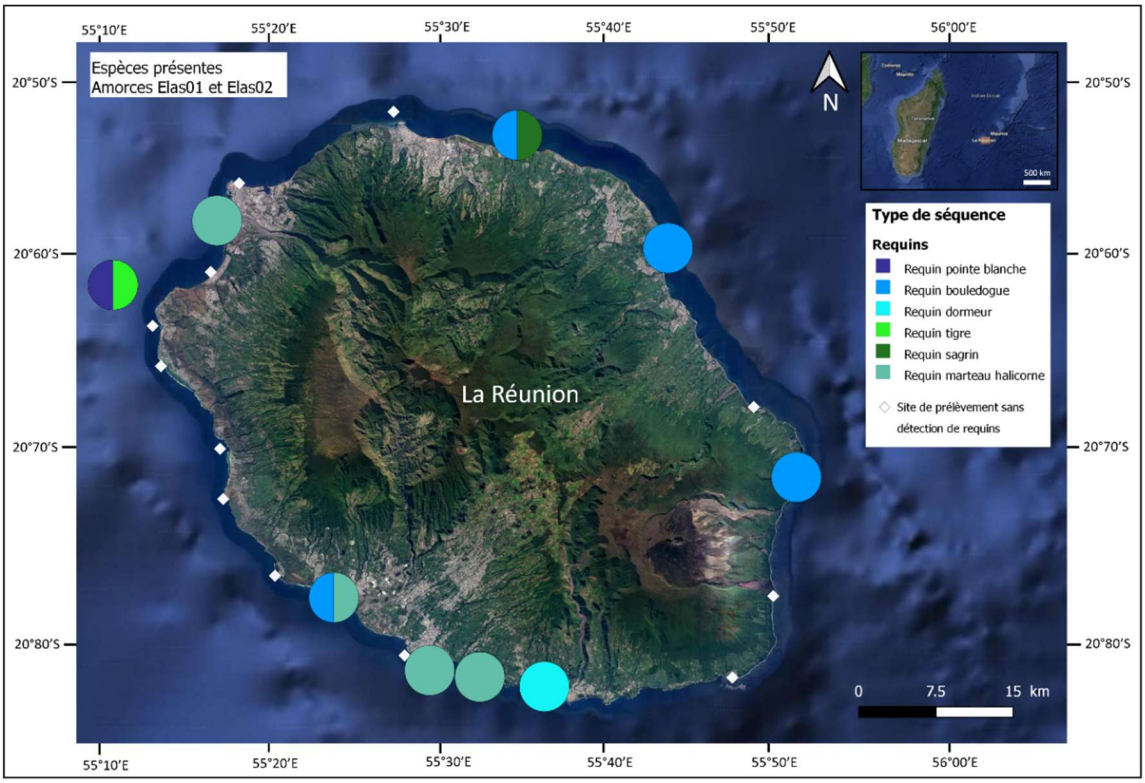


Figure 21. Requins détectés autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces. Les points blancs représentent la non détection des espèces malgré des prélèvements et analyses en ADNe.

Résultats par campagne :

Les cartographies de cette section représentent les résultats par campagnes en mer (au nombre de 3).

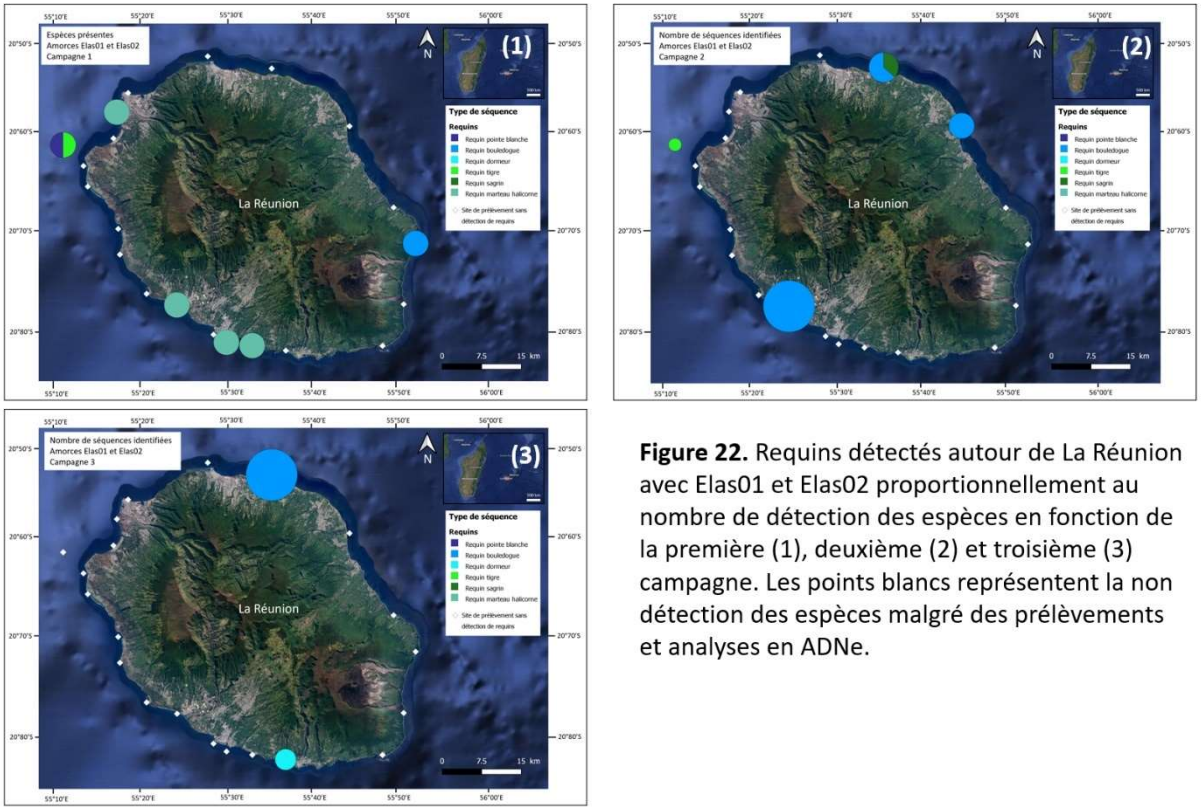


Figure 22. Requins détectés autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces en fonction de la première (1), deuxième (2) et troisième (3) campagne. Les points blancs représentent la non détection des espèces malgré des prélèvements et analyses en ADNe.

5) Raies :

On retrouve bien la raie guitare géante (*Rhynchobatus djiddensis)* en système côtier et récifal. La raie pastenague tachetée (*Taeniurops meyeni*) se retrouve comme attendu dans les systèmes récifaux et fonds sableux. Au regard du nombre de séquences trouvées dans le milieu, la raie aigle semblerait être l'espèce la plus abondante dans l'Ouest, suivie de la raie pastenague à taches noires, la raie fouet (dite aussi raie grise), et la raie guitare (Figure 23). Dans l'Est, les raies du genre torpille seraient les plus nombreuses (Figure 23). Certaines espèces détectées dans l'Est n'ont pas été détectées dans l'Ouest telles que les raies de la famille des raies à museau (*Rhinoptera sp.*), le genre des raies diable (*Modula sp.*) et la petite manta (*Modula thurstoni*).

Les cartes représentant les espèces de raies en noms latins se trouvent en Annexe 5.

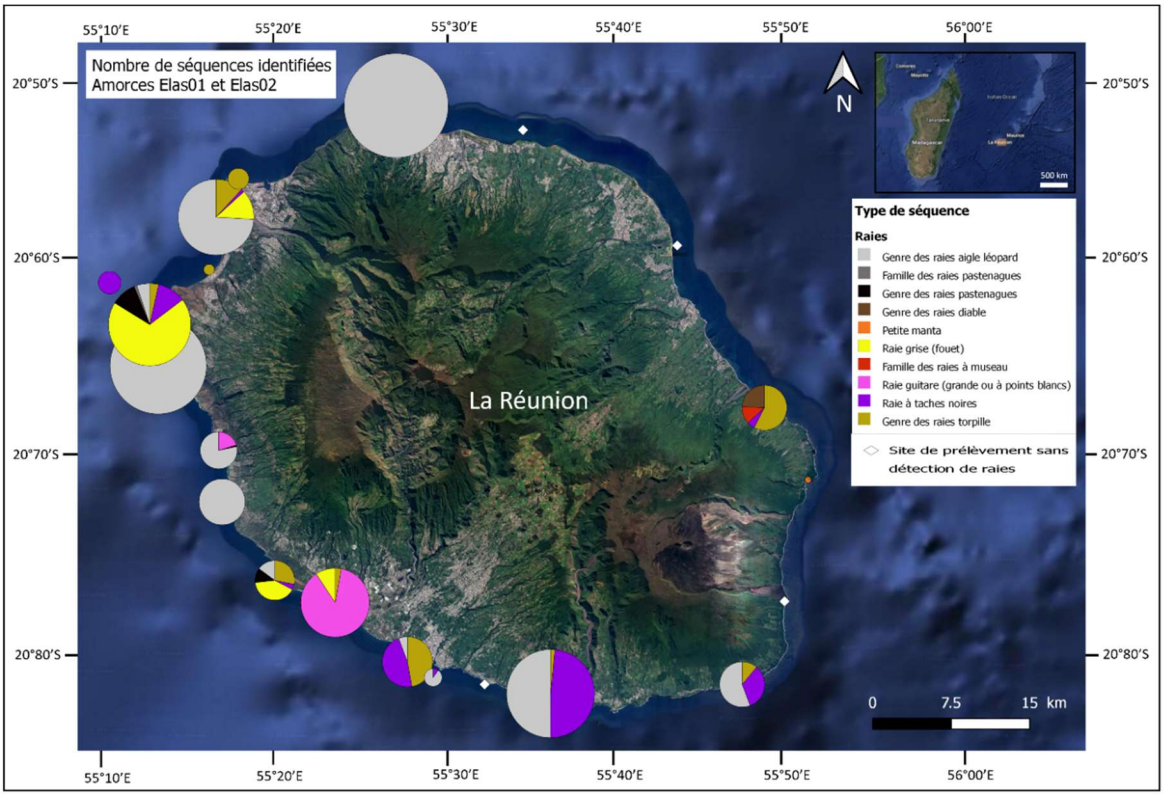


Figure 23. Raies détectées autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces. Les points blancs représentent la non détection des espèces malgré des prélèvements et analyses en ADNe.

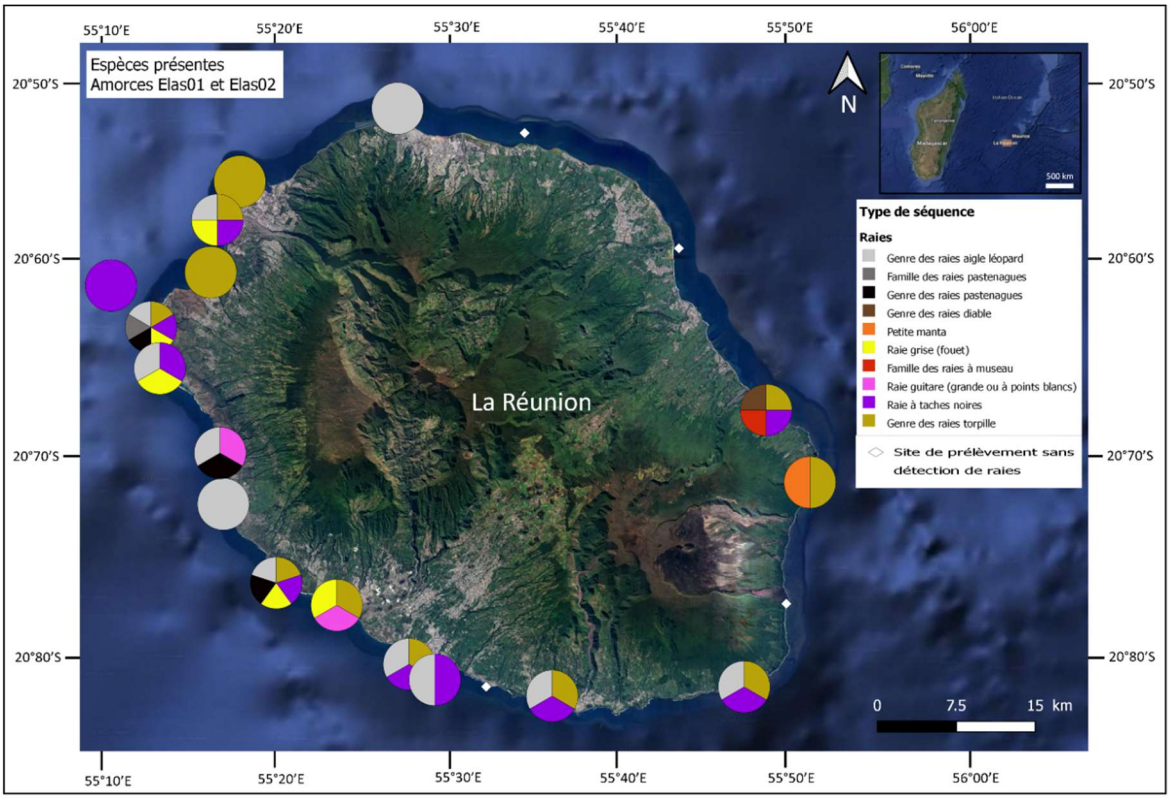


Figure 24. Raies détectées autour de La Réunion avec Elas01 et Elas02 proportionnellement au nombre de détection des espèces. Les points blancs représentent la non détection des espèces malgré des prélèvements et analyses en ADNe.

IV. APPROCHE ÉCOSYSTÉMIQUE

Les amorces Elas01 et Elas02 ont également amplifié des poissons osseux qui nous ont permis de mettre en avant la proportion des reads (séquences d'ADN amplifiées représentatives d'une espèce) par échantillon de chaque famille de poisson, ce qui permet très vite de voir quelles sont les familles de poissons principalement détectées lors de nos échantillonnages autour de l'île de La Réunion (Figure 25). Nous avons normalisé et ensuite cumulé les nombres de reads de chaque famille des deux marqueurs afin d'obtenir un jeu de données unique.

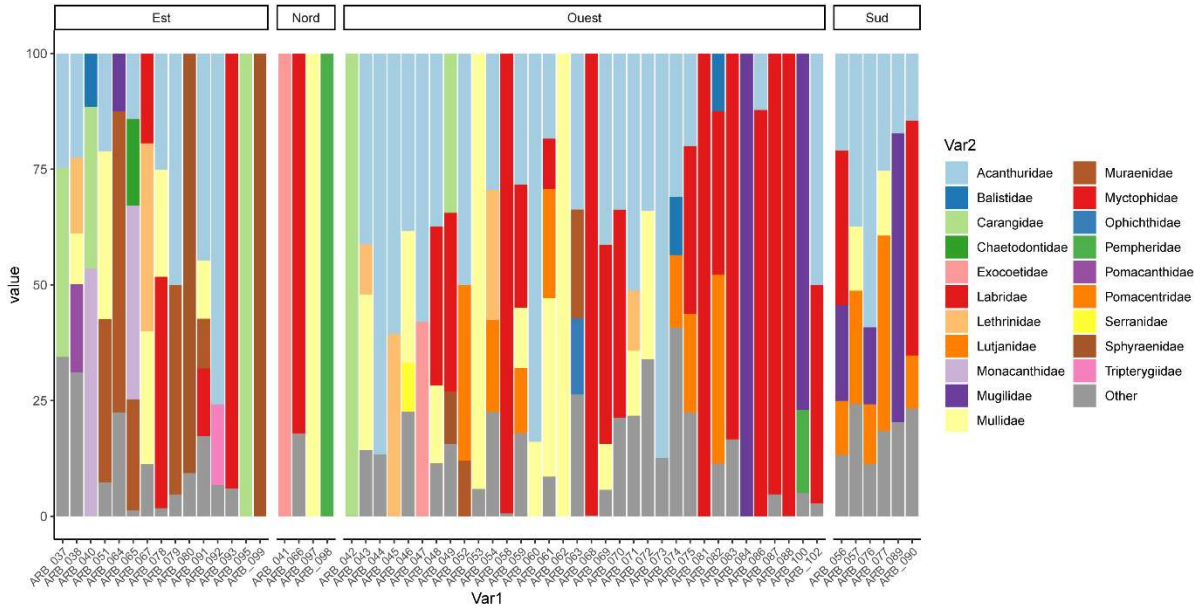


Figure 25. Abondance relative des reads (séquences d'ADN amplifiées représentatives d'une espèce) de chaque famille de poisson par échantillon autour de l'île de La Réunion. Seules les familles qui représentent au minimum 10% du nombre de reads total ont été notifiées, les autres familles sont regroupées dans « Autre » (afin d'éviter une inflation de couleurs).

La majorité des détections concernent les Acanthuridae, Myctophidae, Serranidae et Mullidae. Une importante différence est observable entre les points d'échantillonnage. Notons par exemple la singularité des points du Nord qui sont caractérisés par une faible diversité de familles par point (3 des 4 points ont une seule famille détectée). Afin de caractériser ces différences, nous avons réalisé deux analyses de betadiversité (NMDS - *non-metric multidimensional scaling* -), l'une basée sur des données d'occurrences (donc qualitative avec l'indice de Jaccard) et l'autre sur le nombre de reads par famille (donc quantitative avec l'indice de Bray-Curtis).

Ces analyses de betadiversité confirment la grande disparité d'assemblages de poissons entre les points d'échantillonnages (Figure 26). En terme qualitatif, la figure de gauche fait ressortir les espèces de rares occurrences, comme les Exocoetidae, Sphyraneidae, Pempheridae, Aulostomidae et Carangidae. L'analyse souligne donc indirectement la singularité de certains points due à la présence de ces espèces rares qui vont se retrouver à la périphérie de la distribution (ex. ARB_041, 68, 84, 95, 97, 98, 99). En terme quantitatif, la figure de droite fait ressortir les familles (rares ou fréquentes) dont l'abondance relative varie de manière

importante entre les points. L'analyse converge en partie avec l'analyse qualitative (ex. importance des Exocoetidae, Sphyraneidae, Pempheridae, Caranguidae), ce qui veut dire que ces familles de rares occurrences présentent de fortes abondances relatives lorsqu'elles sont présentes car elles sont souvent en bancs (ex. ARB_041, Arb_099). En outre, une partie des différences s'explique aussi par des différences d'abondances de familles communes (ex. Mugillidae, Mullidae, Sparidae, Labridae). Par exemple les Mugillidae et Labridae ont une abondance relative plus importante dans les points de l'Ouest et du Sud.

L'orientation (Est, Ouest, Nord, Sud) explique ~10% de la variance dans les deux analyses. Ce qui veut dire que les différences entre les points s'expliquent en partie par leur orientation que ce soit en terme qualitatif (espèces présentes) et quantitatif (abondance relative des espèces). Citons les familles Pomacentridae, Apogonidae, Pempheridae que l'on retrouve majoritairement à l'Ouest ; et citons les familles des Exocaetidae, Sphyraenidae, et Carangidae que l'on retrouve surtout à l'Est. **Ces deux groupes de familles révèlent clairement des différences d'ordre fonctionnel avec des familles plutôt associées au milieu récifal à l'Ouest et des familles davantage pélagiques à l'Est. Cette différence témoigne vraisemblablement d'une différence de biotope.** Notons que les assemblages dans le Sud se rapproche de ceux de l'Ouest, les stations du Nord semblent très singulières par rapport aux autre zones caractérisées par une très faible diversité.

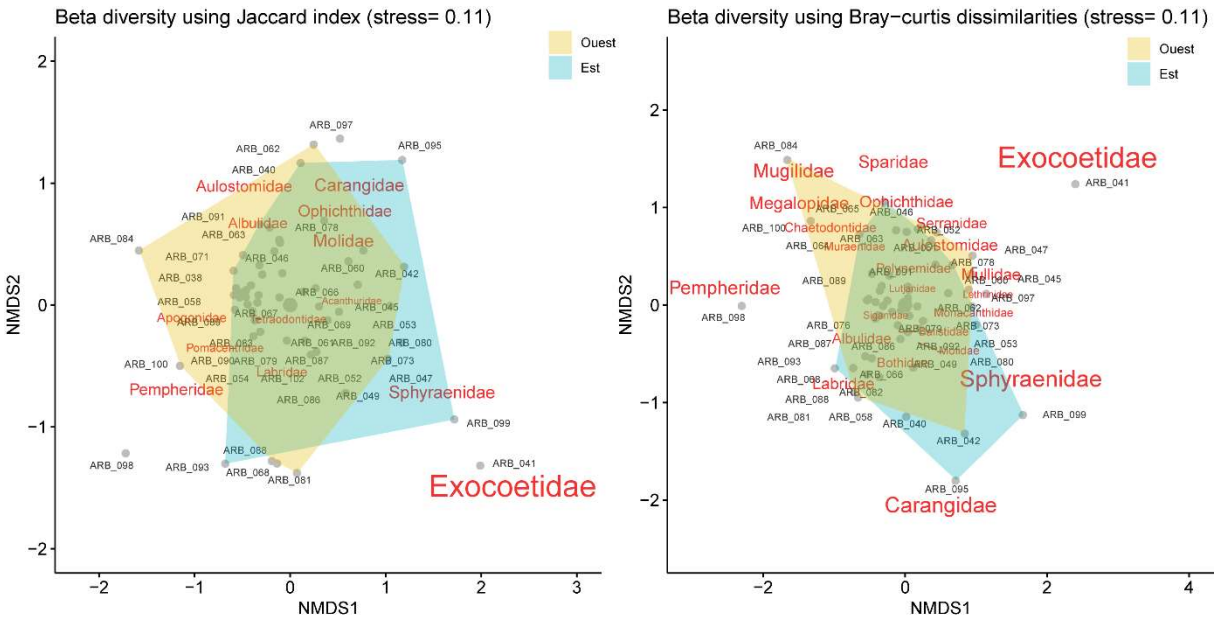


Figure 26. Betadiversité basées sur de l'occurrence (indice de Jaccard) (gauche) et sur le nombre de read par famille basée sur la distance de Bray-Curtis (droite). Seules les familles ayant un effet significatif sur la distribution des points sont figurées en rouge.

V. COMPARAISON RÉSULTATS - IRRAE et MAEO

Le projet MAEO (Observatoire des Elasmobranches de l'Archipel des Mascareignes) est un projet porté par ARBRE en collaboration avec l'Université de Maurice, cofinancé par le programme INTERREG IV et la Région Réunion. L'objectif est de dresser un inventaire des espèces de raies et requins autour de La Réunion, Maurice et Rodrigues. Afin d'acquérir des données, il s'appuie sur des campagnes de terrain en mer avec poses de caméras sous-marines et plongées d'observation, ainsi que sur un réseau écoparticipatif composé d'usagers de la mer (plongeurs, apnéistes, chasseurs sous-marins, pêcheurs, organismes d'excursions en mer, surfeurs, vigies requins). Débuté en 2021, il a permis de réaliser 70 sorties de terrain à La Réunion, ce qui représente 149 plongées réalisées entre 20 et 30 m de profondeur et plus de 280 h de vidéo. Grâce à cet effort de prospection, 34 observations d'élasmobranches ont été réalisées entre août 2021 et avril 2023. Au total, les observations des campagnes de terrain et du réseau écoparticipatif ont permis de répertorier 648 observations d'élasmobranches à La Réunion, entre janvier 2021 à août 2023. Une comparaison entre les résultats issus du projet MAEO et ceux du projet IRRAE est intéressante, car elle permet de mettre en évidence les éventuelles similitudes et différences d'espèces détectées et de zones où elles sont détectées avec ces deux méthodes (Table 12).

Les espèces détectées dans le cadre de ces deux projets ne sont pas toutes identiques. En effet, sur les 58 espèces présentes dans les Mascareignes selon l'UICN, 12 espèces de raies et 9 de requins ont été observées à La Réunion dans le cadre du projet MAEO, contre 9 espèces de raies et 6 de requins dans le cadre du projet IRRAE. Les espèces détectées sont majoritairement les mêmes, bien que plusieurs différences apparaissent : Les raies pastenagues du genre *Dasyatis* (*Dasyatis* spp.) et la petite manta (*Mobula thurstoni*) n'ont pas été observées avec certitude alors qu'elles sont détectées par l'ADNe. A l'inverse, la raie manta géante (*Mobula birostris*) et la mante chilienne (*Mobula tarapacana*) ont été occasionnellement observées en mer, mais n'ont pas été détectées par l'ADNe. Concernant les requins, le requin dormeur (*Centroscymnus owstoni*) et le requin sagrin (*Loxodon macrorhinus*) n'ont jamais été observés dans le cadre du programme MAEO, mais sont détectés par l'ADNe. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces espèces ont un habitat très profond, la probabilité d'observation par les plongeurs est donc réduite. A l'inverse, le requin soyeux (*Carcharhinus falciformis*), longimane (*Carcharhinus longimanus*), gris (*Carcharhinus plumbeus*), mako (*Isurus oxyrhinchus*), nourrice fauve (*Negaprion ferrugineus*), baleine (*Rhincodon typus*), corail (*Triaenodon obesus*), grand requin marteau (*Sphyrna mokarran*) et marteau commun (*Sphyrna zygaena*), n'ont pas été détectés par l'ADNe. Cela pourrait être expliqué par le fait que (1) certaines de ces espèces sont majoritairement pélagiques et observées au large des côtes (en particulier par les pêcheurs au niveau des DCP), alors que les prélèvements d'ADNe ont été effectués plus près des côtes ; (2) certaines de ces espèces étaient présentes à La Réunion le long du littoral et observées régulièrement en plongée ou PMT dans les années 1980/1990 (notamment *C. albimarginatus*, *T. obesus*, *C. amblyrhinchos*, *N. ferrugineus*) et ont vraisemblablement été impactées par les activités humaines (petite pêche artisanale professionnelle et de loisir, chasse sous-marine, dégradation de l'habitat, etc).

La majorité des observations répertoriées par MAEO se concentrent dans l'Ouest de l'île, ce qui peut s'expliquer par une activité humaine plus importante sur cette côte (plongée, pêche, excursions en mer, surf), ce qui augmente la probabilité de rencontre avec des élasmobranches (Figure 27). Les côtes Sud, et surtout Nord et Est, ont été moins prospectées par les campagnes MAEO car les conditions météorologiques rendent les poses de caméras et la réalisation des plongées difficiles. Les usagers de la mer sont également moins présents sur ces côtes.

Dans l'Est de La Réunion, les seules espèces répertoriées par MAEO sont le requin bouledogue, le requin marteau commun, la raie aigle ocellée (*Aetobatus ocellatus*), la raie pastenague à taches noires (*Taeniurops meyeni*) et la raie guitare à points blancs (*Rhynchobatus australiae*). La présence de requins bouledogues et de raies pastenague à taches noires a également été mise en évidence dans l'Est par l'ADNe, tout comme celle d'autres raies non observées : raie torpille (*Torpedo* spp.) et raies *Mobula* spp.

Dans le Nord de l'île, le requin marteau commun est la seule espèce ayant été observée (par un survol en ULM), alors que l'ADNe a permis de mettre en évidence la présence de raie aigle ocellée, requin bouledogue et requin sagrin.

Dans le Sud, les observations MAEO font état de la présence de raies aigles communes (*Myliobatis aquila*) et ocellées (*Aetobatus ocellatus*), et de requins marteaux. Ces espèces sont également détectées par l'ADNe, en plus de la raie pastenague à taches noires, de la raie torpille et du requin dormeur.

A l'Ouest de La Réunion, les espèces les plus fréquemment observées dans le cadre de MAEO sont les raies aigles, fouets (aussi appelées raie grise), torpilles, pastenagues à taches noires et requin tigre (en particulier dans le cadre des campagnes de pêches menées par le Centre Sécurité Requin), avec une diversité d'espèces plus importante entre la baie de Saint-Paul et la Pointe au Sel. Les résultats de l'ADNe confirment cette grande diversité d'espèces d'élasmobranches dans l'Ouest jusqu'à Saint-Pierre. Les espèces de raies observées dans le cadre de MAEO sont également détectées par l'ADNe à l'exception de la raie pastenague *Dasyatis* sp. qui a été identifiée uniquement par ADNe. Concernant les requins, les observations de requins baleine, corail, bouledogue et marteau sont fréquentes dans l'Ouest (notamment sur les sites de plongées profonds, sur le sec de Saint-Paul et à la Pointe au Sel). Néanmoins, seules les espèces de requin marteau halicorne (Rivière des Galets, Etang du Gol et Saint-Pierre), requin bouledogue (Etang du Gol) et requin pointe blanche de récif (Sec Saint-Paul) ont pu être identifiées par ADNe.

Les résultats de l'ADNe permettent par ailleurs de remettre en question les espèces observées *in situ,* notamment entre espèces de même genre. En effet, les raies torpilles observées dans le cadre de MAEO ont été identifiées sur images comme étant des raies torpille tachetées (*Torpedo fuscomaculata*), alors que les analyses ADNe ne montrent pas de certitude de l'espèce (*T. fuscomaculata ou T. sinuspercisi)*. De même pour les raies guitare, l'espèce observée dans le cadre de MAEO semble être la raie guitare à points blancs (*Rhynchobatus australiae*) (facilement identifiable par ses trois points blancs de chaque côté de la tête), alors que les résultats ADNe montrent que la grande raie guitare (*R. djiddensis*) semble également être présente dans la zone. Enfin, les analyses ADNe détectent la raie aigle (*Aetobatus*

narinari), alors que les données MAEO font seulement état de la présence de la raie aigle ocellée (*A. ocellatus*). Néanmoins la page 31 sur les analyses phylogénétiques montre que l'échantillon est proche de *A. narinari* (99,45%) mais n'est pas groupé avec le clade des *A. narinari*, comme s'il s'agissait d'une espèce dont la séquence n'est pas dans les génomes de référence pour ce genre. Il serait ainsi intéressant de faire une étude plus approfondie.

La réalisation simultanée de filtrations d'eau pour analyse ADNe et de pose de caméras et plongées d'observations MAEO sur certains sites permet de comparer le succès des deux méthodes dans la détection des élasmobranches. Des raies pastenague à taches noires ont été observées au port de Sainte-Rose, à la Ravine blanche et à la passe de l'Ermitage les mêmes jours que des prélèvements d'eau pour analyses ADNe. La raie pastenague à taches noires a bien été détectée dans ces échantillons. Cependant, un requin marteau halicorne observé en surface près de la passe de l'Ermitage n'a pas été détecté dans les prélèvements d'eau effectués les mêmes jours à quelques centaines de mètres. A l'inverse, de nombreuses raies et requins ont été détectés tout autour de l'île par la méthode d'ADNe, alors qu'aucun individu n'avait été observé le même jour et sur les mêmes sites par les caméras ou les plongeurs.

Ainsi, sur les espèces communes telles que les raies aigles, pastenagues à taches noires et fouet (aussi appelée raie grise), les méthodes d'observation directe et d'ADNe apportent des résultats similaires. Sur les autres espèces, moins fréquentes dans les eaux réunionnaises, elles sont complémentaires l'une de l'autre. La comparaison des résultats permet de mettre en évidence le fait que certaines espèces sont plus facilement détectées par observation directe (requins du large notamment), alors que d'autres sont plutôt détectées par l'ADNe (requins profonds par exemple, mais plus généralement toutes les espèces). La méthode d'ADNe semble avoir une surface de détection plus étendue que le permet la visibilité des plongeurs et des caméras (quelques dizaines de mètres maximum), et elle permet également d'apporter plus de données dans des zones où la plongée et la pose de caméras sont complexes à cause des conditions météorologiques défavorables ou de la turbidité importante de l'eau, en particulier à l'Est de La Réunion et les embouchures de ravines. En outre, ces zones semblent riches en diversité d'élasmobranches, comme le mettent en évidence les résultats de ce programme. Enfin, l'observation directe des individus et la prise de photos ou vidéos permet d'identifier avec certitude les espèces, alors qu'il n'est parfois pas possible d'aller au-delà de la famille ou du genre si les bases de données génétiques ne sont pas à jour ou si le génome de référence est manquant. Ces deux méthodes sont complémentaires et se valident mutuellement, aussi bien concernant les zones prospectées que les espèces détectées.

Table 12. Espèces d'élasmobranches détectées par les projets IRRAE et MAEO (gris).

Nom scientifique	Nom commun	Détectée par IRRAE	Détectée par MAEO
Aetobatus spp.	Raies aigle		
Aetobatus ocellatus	Raie aigle ocellée		
Dasyatis spp.	Raies pastenagues		
Mobula birostris	Manta géante		
Mobula tarapacana	Mante chilienne		
Mobula thurstoni	Petite manta		

Mobula spp.	Raies diable		
Myliobatis aquila	Rae aigle commune		
Pateobatis fai	Raie grise (dit aussi raie fouet)		
Rhinoptera	Famille des raies à museau		
Rhynchobatus djiddensis ou R.australiae	Raie guitare géante ou à points blancs		
Taeniura meyeni (aussi nommée Taeniurops meyeni)	Raie pastenague à taches noires		
Torpedo spp.	Raies torpille		
Carcharhinus albimarginatus	Requin pointe blanche		
Carcharhinus leucas	Requin bouledogue		
Carcharhinus longimanus	Requin longimane		
Carcharhinus plumbeus	Requin gris		
Centroscymnus owstoni	Requin dormeur		
Galeocerdo cuvier	Requin tigre		
Isurus oxyrinchus	Requin mako		
Loxodon macrorhinus	Requin sagrin		
Nebrius ferrugineus	Requin nourrice fauve		
Rhincodon typus	Requin baleine		
Sphyrna lewini	Requin marteau halicorne		
Sphyrna mokarran	Grand requin marteau		
Sphyrna zygaena	Requin marteau commun		
Triaenodon obesus	Requin corail		

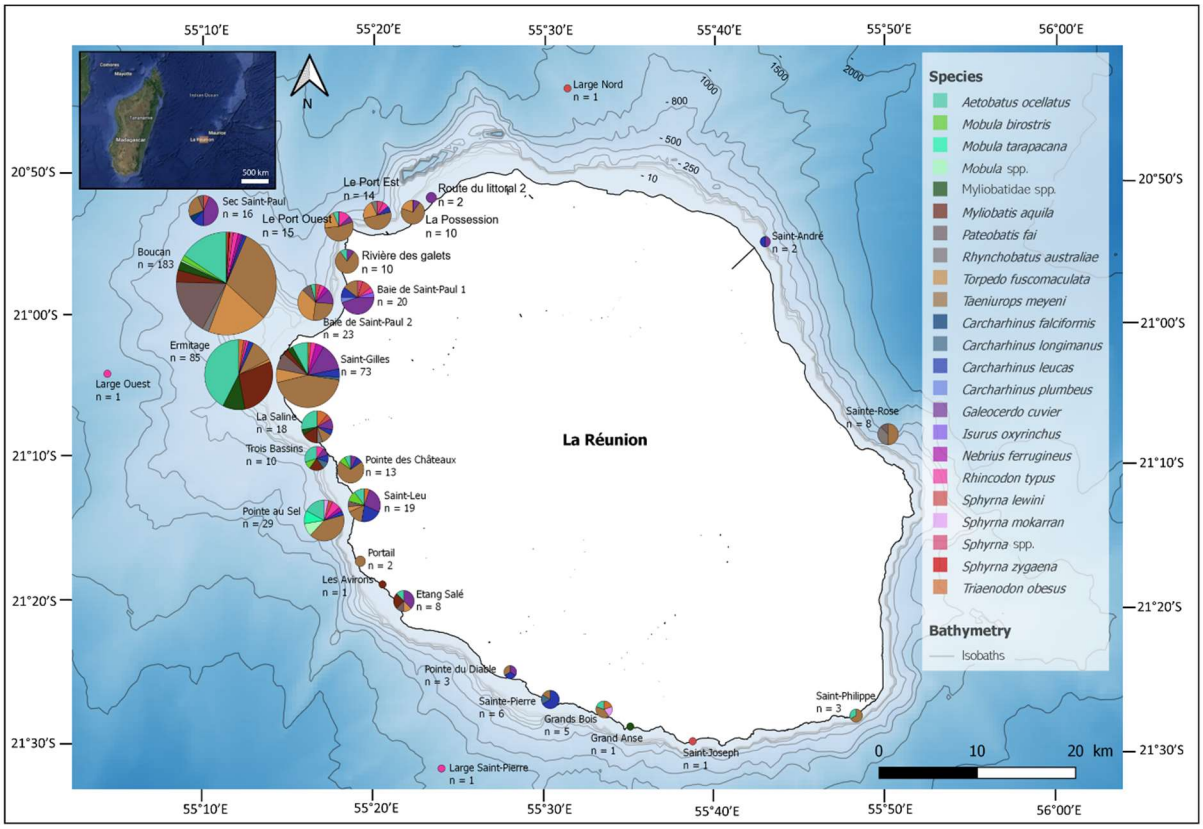


Figure 28. Observations d'élasmobranches autour de La Réunion réalisées dans le cadre du programme MAEO.

VI. COMPARAISON RÉSULTATS - IRRAE et CSR

Depuis janvier 2014, le CSR a pu attester de la présence de 26 espèces de raies et requins, en utilisant deux méthodes : la mise en place de BRUVs (caméras appâtées) et les actions de pêche préventive ciblant les requins tigre (*Gaelocerdo cuvier*) et bouledogue (*Carcharhinus leucas),* lors desquelles des prises accessoires sont parfois capturées.

Une grande partie des espèces observées/capturées par le CSR ont également été détectées par l'ADNe lors du projet IRRAE. Des espèces diffèrent néanmoins, certaines ont été observées/capturées par le CSR et non par l'ADNe. C'est le cas du requin gris de récif (*Carcharhinus amblyrynchos*), requin cuivre (*Carcharhinus brachyurus*), requin gris (*Carcharhinus plumbeus*), grand requin blanc (*Carcharodon carcharias*), requin mako (*Isurus oxyrinchus*), émissole d'Arabie (*Mustelus mosis*), requin nourrice fauve (*Nebrius ferrugineus*), requin marteau commun (*Sphyrna zygaena*), requin corail (*Triaenodon obsesus*), raie pastenague bleue sudafricaine (*Dasyatis chrysonota*), raie à queue épineuse (*Dasyatis thetidis*), raie manta géante (*Mobula birostris),* et raie aigle commune (*Myliobatis aquila*).
A l'inverse, le requin dormeur (*Centroscumnus owstonii*) et la petite manta (*Mobula thurstoni*) ont été détectées que par l'ADNe.

Table 13. Liste des espèces détectées (x) par le CSR et le projet IRRAE, et les deux projets en vert.

Espèces détectées	CSR	IRRAE
Aetobatus ocellatus	X	X
Bathytoshia lata	X	
Carcharhinus albimarginatus	X	X
Carcharhinus amblyrhynchos	X	
Carcharhinus brachyurus	X	
Carcharhinus leucas	X	X
Carcharhinus plumbeus	X	
Carcharodon carcharias	X	
Centroscymnus owstonii		X
Dasyatis chrysonota	X	
Dasyatis spp.	X	X
Dasyatis thetidis	X	
Galeocerdo cuvier	X	X
Isurus oxyrinchus	X	
Loxodon macrorhinus	X	X
Mobula spp.	X	
Mobula birostris	X	
Mobula thurstoni		X
Mustelus mosis	X	
Myliobatis aquila	X	
Nebrius ferrugineus	X	
Pateobatis fai	X	X
Rhynchobatus australiae	X	X
Sphyrna lewini	X	X
Sphyrna zygaena	X	
Taeniurops meyeni	X	X
Torpedo fuscomaculata	X	X
Triaenodon obesus	X	

Les résultats obtenus par IRRAE et le CSR montrent une majorité de raies dans l'Ouest de l'île, bien que la présence de plusieurs espèces ait également été rapportée dans d'autres zones. Les espèces les plus fréquemment détectées sont similaires, en particulier les raies aigles, fouets et pastenagues à taches noires. La répartition des détections de requins est plus homogène dans le Nord, l'Est et le Sud. Les données concernant l'Est sont nettement moins importantes par le CSR puisqu'il se concentre sur Sainte-Rose. Les requins marteaux halicorne et bouledogues sont les espèces les plus détectés par analyses ADNe suivies par les requins tigre qui sont principalement détectés dans la zone de Saint-Paul. Le CSR détecte également un nombre important de requins marteaux halicorne, et une majorité de requins tigre dont la présence est répartie entre Saint-Paul et Saint-Pierre.

En termes de saisonnalité, pour les données IRRAE comme pour celles du CSR, les raies fouet sont plus détectées au début de l'année entre janvier et mars, et les raies guitares sont détectées tout au long de l'année avec une présence plus importante en hiver austral.

Concernant les requins, le tigre et le bouledogue sont détectés tout au long de l'année par le CSR. Les données du CSR et d'IRRAE mettent en évidence une présence plus importante de requins marteaux halicorne pendant l'été austral.

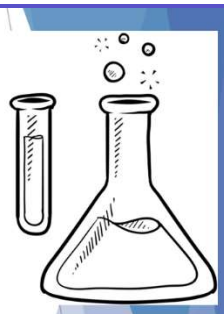
Le requin cuivre (*Carcharhinus brachyurus*) a été capturé à 26 reprises par le CSR. Ces captures ont toutes eu lieu entre les mois de juillet et septembre (excepté une en mars 2023). Cette espèce est donc présente à La Réunion au cours de certaines périodes, en particulier l'hiver austral. Comme l'ADN mitochondrial de cette espèce est totalement séquencé, il aurait été amplifié par l'une des amorces utilisées dans le cadre d'IRRAE, en cas de présence dans les zones de collecte. Ce résultat suggère que cette espèce n'était pas présente lors de l'échantillonnage IRRAE. Il serait intéressant de comprendre pourquoi un nombre important d'individus est présent dans la zone de manière très ponctuelle. Le requin cuivre occupant généralement des eaux tempérées, la piste de températures plus froides et la présence de certaines proies (poisson-chats, céphalopodes, etc.) doit être approfondie. Nous pouvons conclure que les données du CSR et d'IRRAE se complètent.

VII. LIVRABLES ET CONCLUSIONS

1) Fiche de synthèse des résultats sur le protocole :

Optimiser et standardiser le protocole d'identification des élasmobranches.

- Détermination du volume à filtrer : 100 litres.
- Détermination du type et zone à filtrer (surface, colonne d'eau et/ou sédiment) : 50 litres en surface et 50 litres dans la colonne d'eau.
- Détermination du nombre d'amorce à utiliser : minimum 2 paires (Elas01 et Elas02).
- Détermination de la technique moléculaire à utiliser (métabarcoding ou barcoding): Approche écosystémique métabarcoding et ciblée barcoding avec nos design d'amorce.



2) Démarches techniques accessibles :
Résultats dans le chapitre II ainsi que le protocole technique en Annexe 1.

3) Comparaison des amorces génétiques pour analyser leurs pouvoirs taxonomiques discriminants :
Les résultats sont détaillés dans le chapitre II et les annexes. La méthode de qPCR et de métabarcoding sont équivalentes concernant la détection d'espèces cibles. La méthode de métabarcoding procure des résultats différents selon le type d'amorce utilisé :

➢ Shark-miniCOI détecte très peu d'espèces.

➢ Elas01 permet d'apprécier la diversité ichtyologique (détection de 38 familles de poissons et 114 espèces) ainsi que de 6 espèces de raies et 4 espèces de requins.

➢ Elas02 détecte également un grand nombre de familles de poissons osseux (21 familles avec 64 espèces) ainsi qu'un total de 15 espèces d'élasmobranches (9 espèces de raies et 6 espèces de requins).

Au regard de l'ensemble des résultats, nous montrons qu'Elas01 et Elas02 sont complémentaires.

4) Cartographie et données de l'identification des espèces d'élasmobranches et des poissons osseux autour de La Réunion par l'ADNe :
Résultats dans le chapitre III, Annexe 3 et 4, ainsi que la table Excel des données et saisie dans la base de données Borbonica.

5) Vulgarisation pour le grand public :
Poster au format PDF et en ligne sur le site international ResearchGate sous le DOI DOI: 10.13140/RG.2.2.12743.27046 ainsi que le site internet de l'association www.arb-reunion.fr

6) Comparer les résultats de détection des espèces avec les résultats déjà obtenus dans le cadre du programme MAEO et MesoMay :
Résultats dans le chapitre IV et V.

Prochainement : une publication scientifique de rang A avec une soumission pour fin 2023.

VIII. REMERCIEMENTS

Nous remercions l'ensemble des bénévoles et stagiaires de l'association ARBRE pour leur implication dans la collecte des échantillons, que ce soit sur le bateau ou en plongées : Lilou Audineau, Bourhis, Florian Campagnari, Sylvain Corbel, Maureen Darchy, Clément Delamare, Patrick Durville, Romain Gonzalvez, Lauriane Guillermou, Aurélie Kerbiquet, Ladislas Letourneur, Marius Molinet, David Ory, Gabriella Paulet, Flora Plouzeau, Romain Wlodarczyk, Nicolas Wulles.

Nous remercions les pilotes des bateaux de l'entreprise TSMOI (Travaux Sous-Marins Océan Indien) afin d'aider au bon déroulement des prélèvements lors des sorties en mer : Samuel Adam, Geoffrey Bertrand, Hervé Dulac, Patrick Gauthier, Michel Guillemard et Guillaume Mazier.

Nous remercions Patrick Plantard pour ses conseils dans le design des tubes de prélèvements d'eau.

Nous remercions les membres du bureau : Pauline Henry, ancienne secrétaire, pour son investissement dans le bureau ainsi qu'Alexandra Drouhet pour le suivi de la trésorerie.

Nous remercions Sébastien Jacquemet (Université de la Réunion), l'équipe de Luis Gustavo Cardoso (IO – FURG), Eric Clua (EPHE), Serge Planes (CNRS) ainsi que Sandra Bray (CNRS) pour l'envoi des échantillons de tissus de raies et requins afin de produire des témoins positifs en génétique.

Nous remercions Jean Gadenne pour les échanges au cours de ce projet ainsi que le CSR (Centre de Sécurité Requin) pour avoir partagé des données de leur programme.

Enfin, nous remercions Florian Rognard de la DEAL-Réunion pour le suivi de ce projet.

IX. RÉFÉRENCES

Bakker J, Wangensteen OS, Chapman DD, Boussarie G, Buddo D, Guttridge TL, ... & Mariani S. (2017). Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.

Boussarie G et al. 2018. Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks. Ecology, Science Advances. 4:eaap9661

Boyer F, Mercier C, Bonin A, et al. (2016) OBITools: a Unix-inspired software package for DNA métabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16, 176–182.

Budd AM et al. 2021. First detection of critically endangered scalloped hammerhead sharks (Sphyrna lewini) in Guam, Micronesia, in five decades using environmental DNA. Ecological indicators. 127:107649.

Calderón-Sanou I, Münkemüller T, Boyer F, Zinger L, Thuiller W (2020) From environmental DNA sequences to ecological conclusions: How strong is the influence of methodological choices*? Journal of Biogeography*, 47, 193–206.

Dell'Anno A, Corinaldesi C. 2004. Degradation and turnover of extracellular DNA in marine sediments: ecological and methodological considerations. Appl Environ Microbiol 70: 4384–4386.

Drymon JM et al. 2020. Swimming against the flow—Environmental DNA can detect bull sharks (Carcharhinus leucas) across a dynamic deltaic interface. Nature Notes. DOI: 10.1002/ece3.7101

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

Ficetola GF, Coissac E, Zundel S, et al. (2010) An *in silico* approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11, 434.

Fields AT, Abercrombie DL, Eng R, Feldheim K, Chapman DD. (2015). A novel mini-DNA barcoding assay to identify processed fins from internationally protected shark species. *PloS one*, 10(2), e0114844.

Foote AD et al. 2012. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. PLoS ONE 7, e41781.

McCartin, L.J., et al. 2022. Temperature Controls eDNA Persistence across Physicochemical Conditions in Seawater. Environ Sci Technol.

Mercier C, Boyer F, Kopylova E, Taberlet P, Bonin A, Coissac E (2013) SUMATRA and SUMACLUST: Fast and exact comparison and clustering of sequences. Programs and Abstracts of the SeqBio 2013 Workshop, 27-29.

Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki, H, Kondoh H, Iwasaki W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for métabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. Royal Society open science. 2: 150088.

Nielsen EE, et al. 2017. Extracting DNA from 'jaws': high yield and quality from archived tiger shark (Galeocerdo cuvier) skeletal material. Molecular Ecology Ressources. 17:431-442.

R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.

Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. (2018). Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press.

Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution10:512-526.

Tamura K., Stecher G., and Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution https://doi.org/10.1093/molbev/msab120.

Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Moller PR, Rasmussen M, Willerslev E. 2012 Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS ONE 7, e41732.

Valentini A, Miquel C, Nawaz MA, Bellemain E, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Cruaud C, Nascetti G, Wincker P, Swenson JE, Taberlet P. 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trn L approach. Mol. Ecol. Resour. 9 :51-60.

Van Canneyt O, Ghislain D, Sophie L, Manouci L., Vincent R, Watramez P. 2010. Distribution et abondance de la megafaune marine dans le sud-ouest de l'Ocean Indien tropical. REMMOA-Ocean Indien. Rapport final

Wickel J., Fricke R., Durville P., Chabanet P., Dumestre M., Gadenne J., Guyomard D., Jaquemet S., Mulochau T., Pinault M., Tessier E. (2020). Updated checklist of the fish species of Reunion Island, 1-28. Version sept 2020. Personnal communication.

Zinger L, Lionnet C, Benoiston AS, Donald J, Mercier C, Boyer F (2021) metabaR: an R package for the evaluation and improvement of DNA métabarcoding data quality. *Methods in Ecology and Evolution*, 12, 586–592.

X. ANNEXES

Annexe 1. Protocole technique de prélèvement d'ADNe en milieu aquatique marin.

Équipement nécessaire pour les prélèvements en surface :
• Une perche télescopique.
• Une pompe (ex. ARGALY), 1 batterie (durée d'utilisation environ 12heures), 1 tuyau silicone d'environ 1 m fixé à la sortie de la pompe, 1 tuyau silicone de 20 cm à la sortie de la pompe.
• Un raccord silicone.
• Un tuyau rigide stérile dans une pochette d'une longueur de 2 m pour relier la pompe au raccord et au filtre.
• Un seau gradué de 30 Litres.
• Tampon de conservation dans une bouteille plastique (1L) : exemple une solution longmire dans un tube falcon de 50 ml.
• Un marqueur + scotch ou étiquettes (pour identifier les échantillons).
• Pochette plastique stérile à zip.
• Une paire de gants pour chaque prélèvement.
• Une capsule de filtration avec 2 bouchons bleus pour chaque prélèvement.

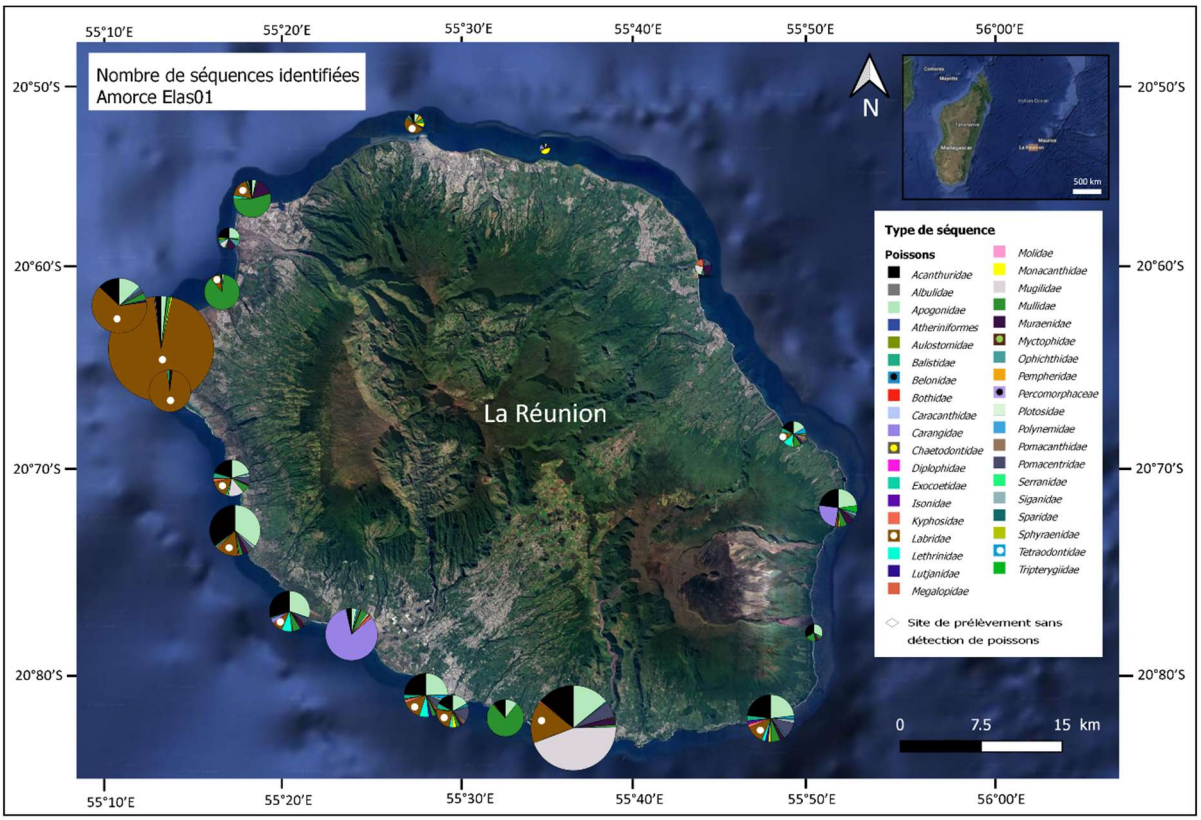
Équipement nécessaire pour les prélèvements en profondeur :
• Même équipement qu'au-dessus et rajouter des tubes adaptés pour prélever l'eau dans la colonne d'eau.

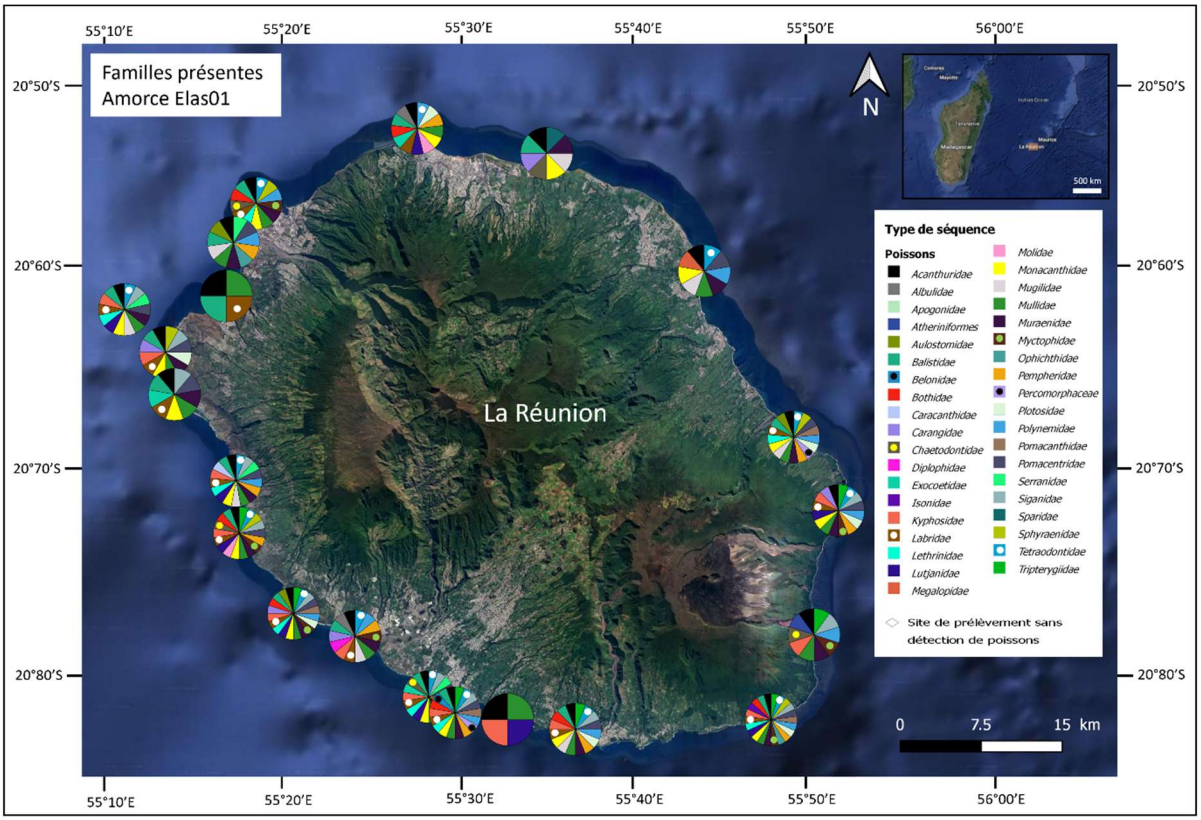
Déroulement de la manipulation :

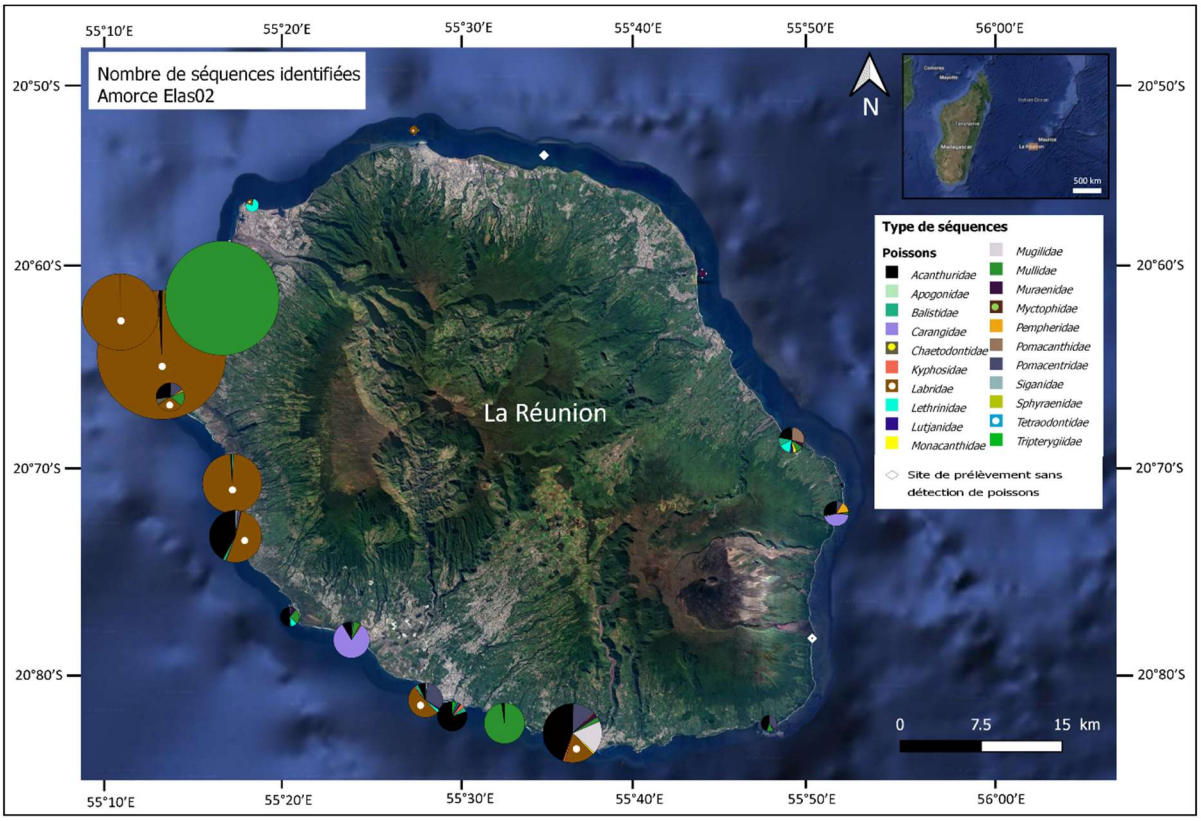
1. Placer l'extrémité du tuyau de sortie d'eau de la pompe dans le contenant gradué afin de mesurer le volume d'eau filtré.
2. Mettre des gants.
3. Fixer le tuyau rigide au niveau de la perche pour les prélèvements en surface et laisser le dépasser d'environ 50 cm au bout de la perche, puis fixer l'autre extrémité du tuyau à l'entrée de la pompe. Pour le prélèvement dans les tubes provenant de la colonne d'eau, il suffit juste de mettre le tuyau au niveau de l'entrée de la pompe.
4. Sortir la capsule de filtration de son sachet et insérer le tuyau rigide de façon à ce que la flèche du 'flow' soit vers le haut pour que le filtre absorbe l'eau.
5. Mettre le filtre dans l'eau à filtrer.
6. Allumer la pompe et filtrer jusqu'au volume voulu. Compter environ 20-25 min pour filtrer 30 L si l'eau n'est pas trop chargée en matières organiques.
7. Sortir la capsule de l'eau et la retourner sans arrêter la pompe, afin d'aspirer de l'air pour vider l'eau restant dans la capsule.
8. Arrêter la pompe, placer la capsule dans son emballage plastique et retirer le tuyau. Eviter de toucher la capsule avec les mains nues.
9. Placer un bouchon bleu en sortie de capsule.
10. Verser 50mL de la solution de conservation dans le filtre au niveau de l'entrée.
11. Placer le deuxième bouchon.
12. Agiter vigoureusement pendant 30 secondes.

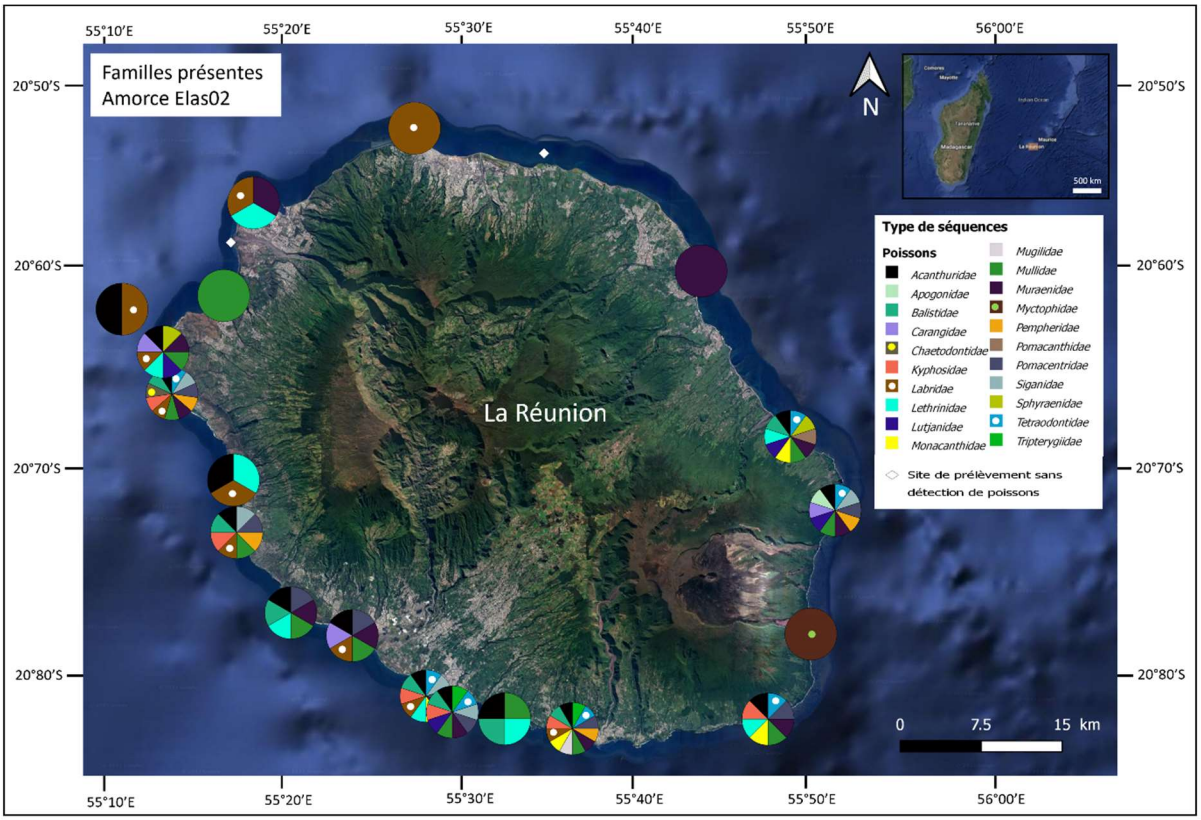
13. Noter le numéro d'échantillon sur la capsule à l'aide d'un marqueur indélébile (puis recouvrir l'écriture de scotch) ou d'une étiquette autocollante.
14. Mettre le filtre dans la pochette plastique zip et écrire le numéro d'échantillon, la date et le lien.
15. Mettre les filtres à l'abri de la lumière et dans une glacière au froid avant de la stocker au congélateur quand vous êtes dans un milieu tropical ou des températures supérieures à 20°C car l'ADN se dégrade autrement.

Annexe 2. Cartographie de la détection des poissons osseux à partir des amorces Elas01 et Elas02 avec les camemberts proportionnels aux nombres de séquences ou simplement au nombre de détection (présence/absence) – Voir le titre pour les détails en haut à gauche. Les noms d'espèces sur les cartes sont en latins.



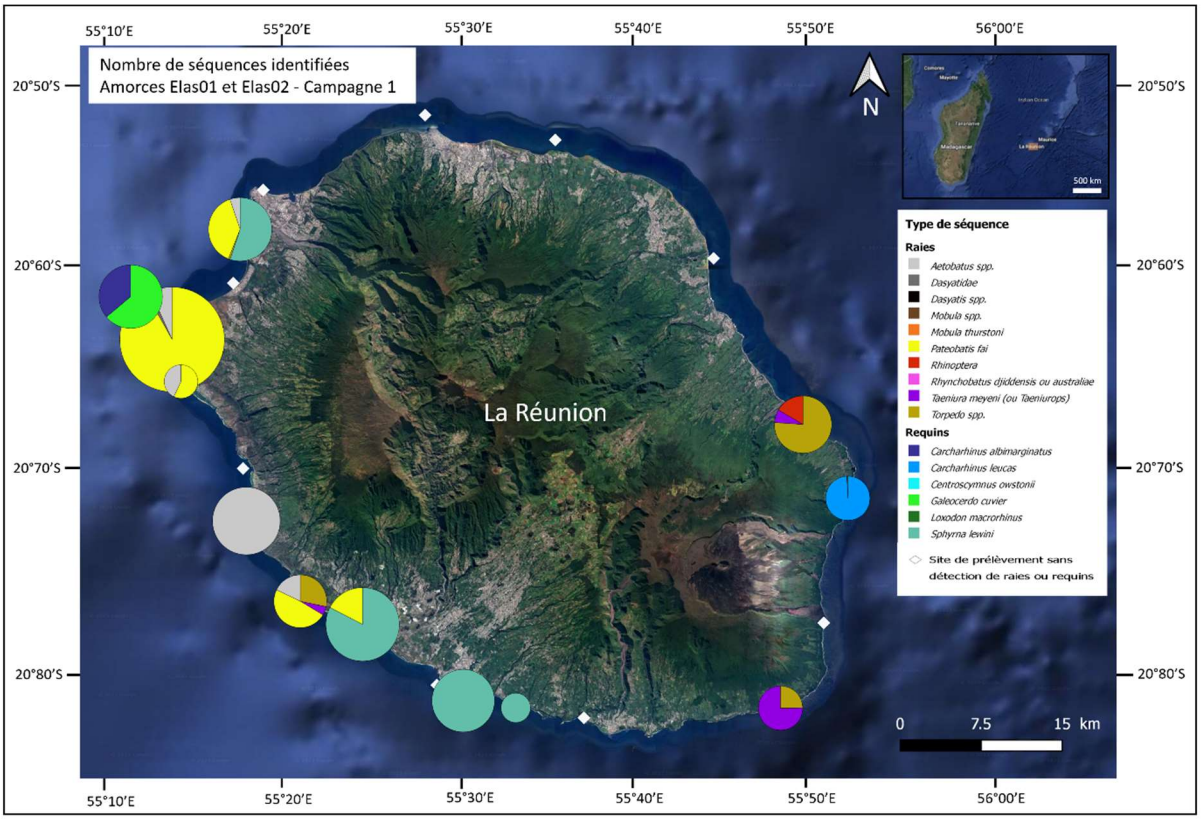


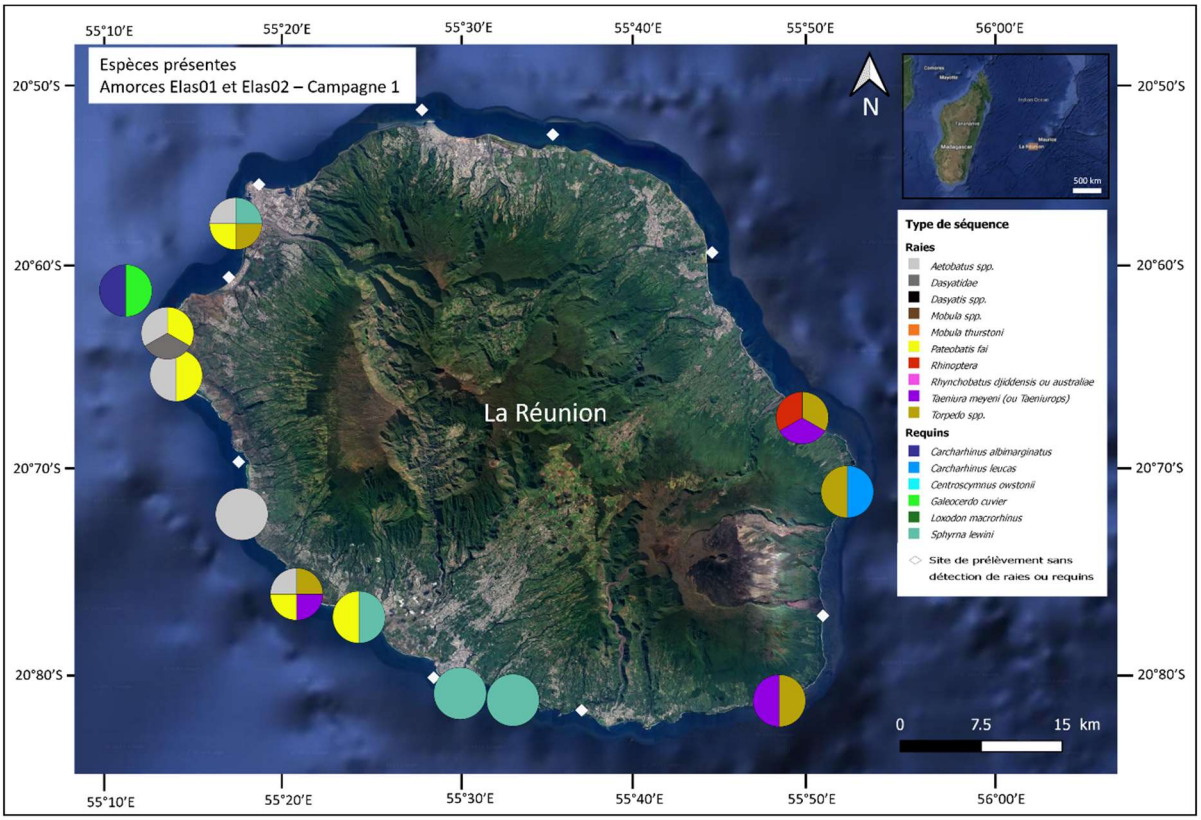

Nombre de séquences identifiées
Amorce Elas02
La Réunion
N
500 km
Type de séquences
Poissons
Acanthuridae
Apogonidae
Balistidae
Carangidae
Chaetodontidae
Kyphosidae
Labridae
Lethrinidae
Lutjanidae
Monacanthidae
Mugilidae
Mullidae
Muraenidae
Myctophidae
Pempheridae
Pomacanthidae
Pomacentridae
Siganidae
Sphyraenidae
Tetraodontidae
Tripterygiidae
Site de prélèvement sans détection de poissons
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

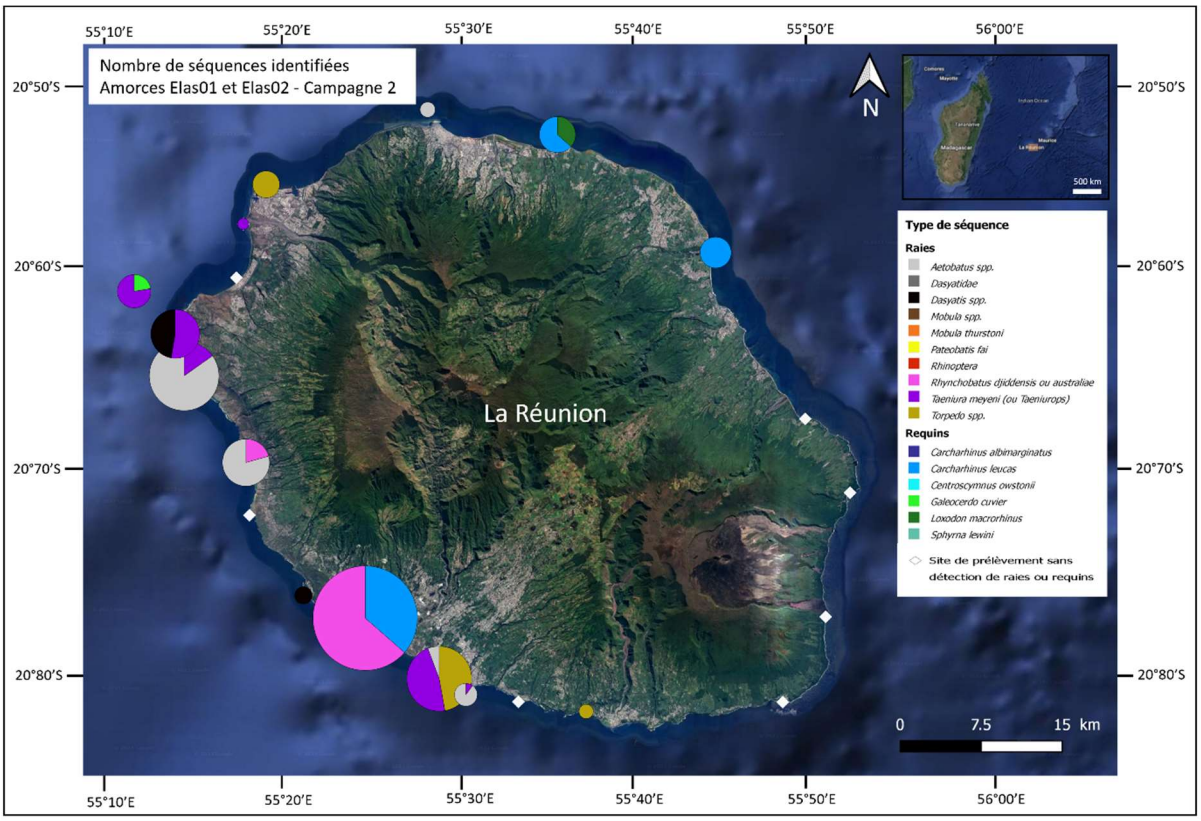

Familles présentes
Amorce Elas02
La Réunion
N
500 km
Type de séquences
Poissons
Acanthuridae
Apogonidae
Balistidae
Carangidae
Chaetodontidae
Kyphosidae
Labridae
Lethrinidae
Lutjanidae
Monacanthidae
Mugilidae
Mullidae
Muraenidae
Myctophidae
Pempheridae
Pomacanthidae
Pomacentridae
Siganidae
Sphyraenidae
Tetraodontidae
Tripterygiidae
Site de prélèvement sans détection de poissons
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

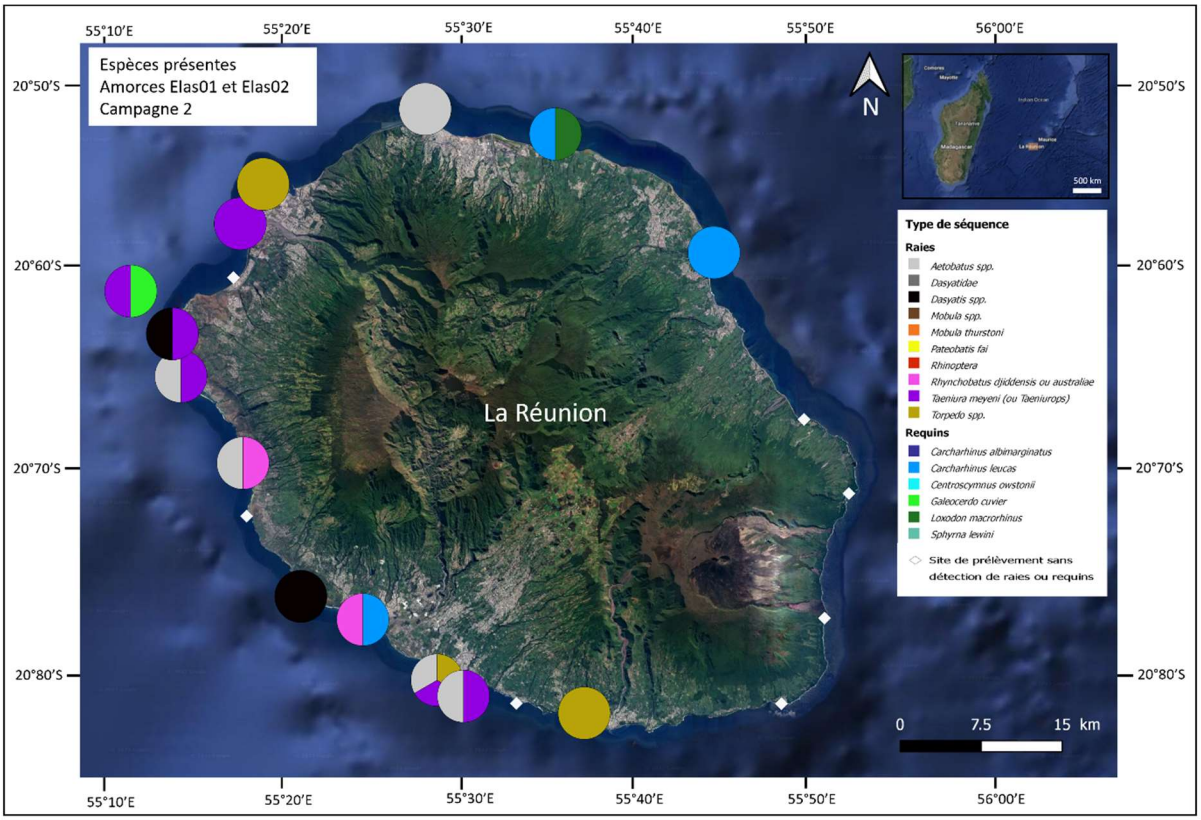
Annexe 3. Cartographie de la détection des élasmobranches par campagne (Campagne 1, 2, et 3) d'échantillonnage à partir des amorces Elas01 et Elas02 avec les camemberts proportionnels aux nombres de séquences ou simplement au nombre de détection (présence/absence) – Voir le titre pour les détails en haut à gauche. Les noms d'espèces sur les cartes sont en noms latins et vernaculaires.

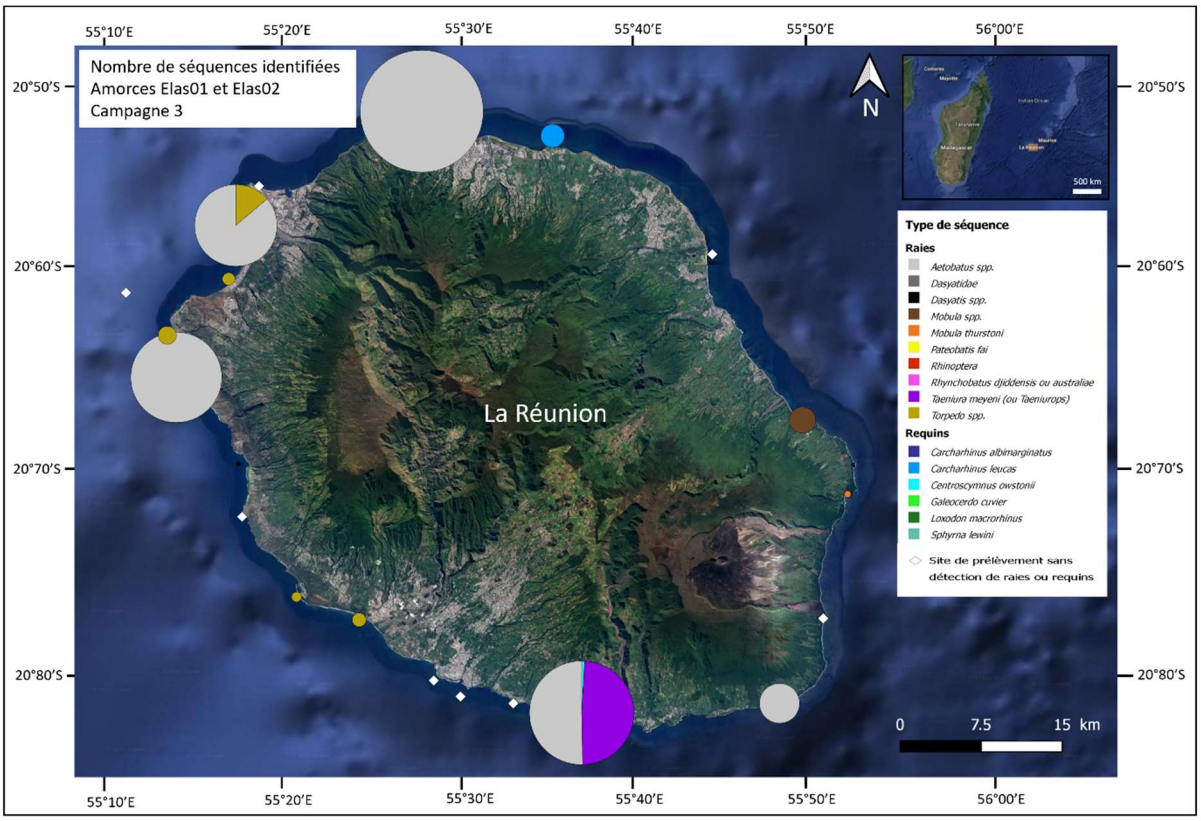
Nom latin :

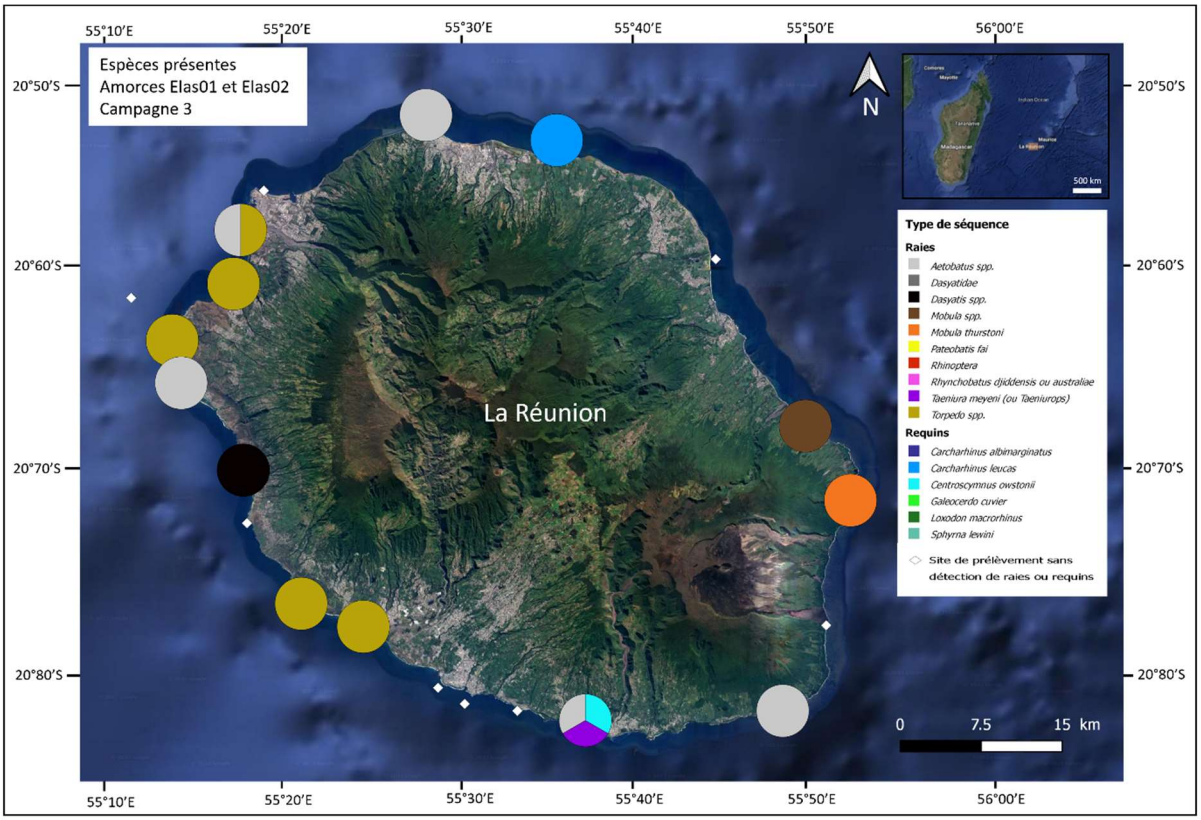



Espèces présentes
Amorces Elas01 et Elas02 – Campagne 1
La Réunion
N
Type de séquence
Raies
Aetobatus spp.
Dasyatidae
Dasyatis spp.
Mobula spp.
Mobula thurstoni
Pateobatis fai
Rhinoptera
Rhynchobatus djiddensis ou australiae
Taeniura meyeni (ou Taeniurops)
Torpedo spp.
Requins
Carcharhinus albimarginatus
Carcharhinus leucas
Centroscymnus owstonii
Galeocerdo cuvier
Loxodon macrorhinus
Sphyrna lewini
Site de prélèvement sans détection de raies ou requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

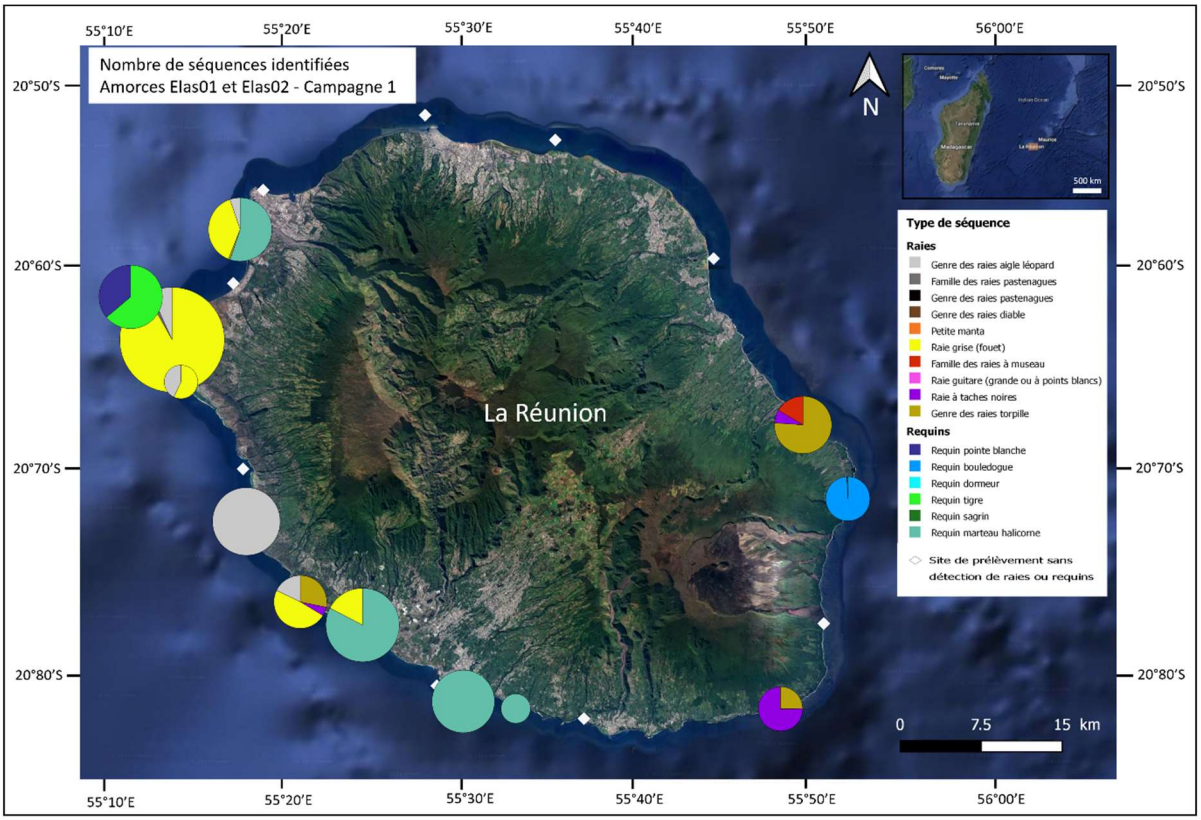

Nombre de séquences identifiées
Amorces Elas01 et Elas02 - Campagne 2
La Réunion
N
Type de séquence
Raies
Aetobatus spp.
Dasyatidae
Dasyatis spp.
Mobula spp.
Mobula thurstoni
Pateobatis fai
Rhinoptera
Rhynchobatus djiddensis ou australiae
Taeniura meyeni (ou Taeniurops)
Torpedo spp.
Requins
Carcharhinus albimarginatus
Carcharhinus leucas
Centroscymnus owstonii
Galeocerdo cuvier
Loxodon macrorhinus
Sphyrna lewini
Site de prélèvement sans détection de raies ou requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

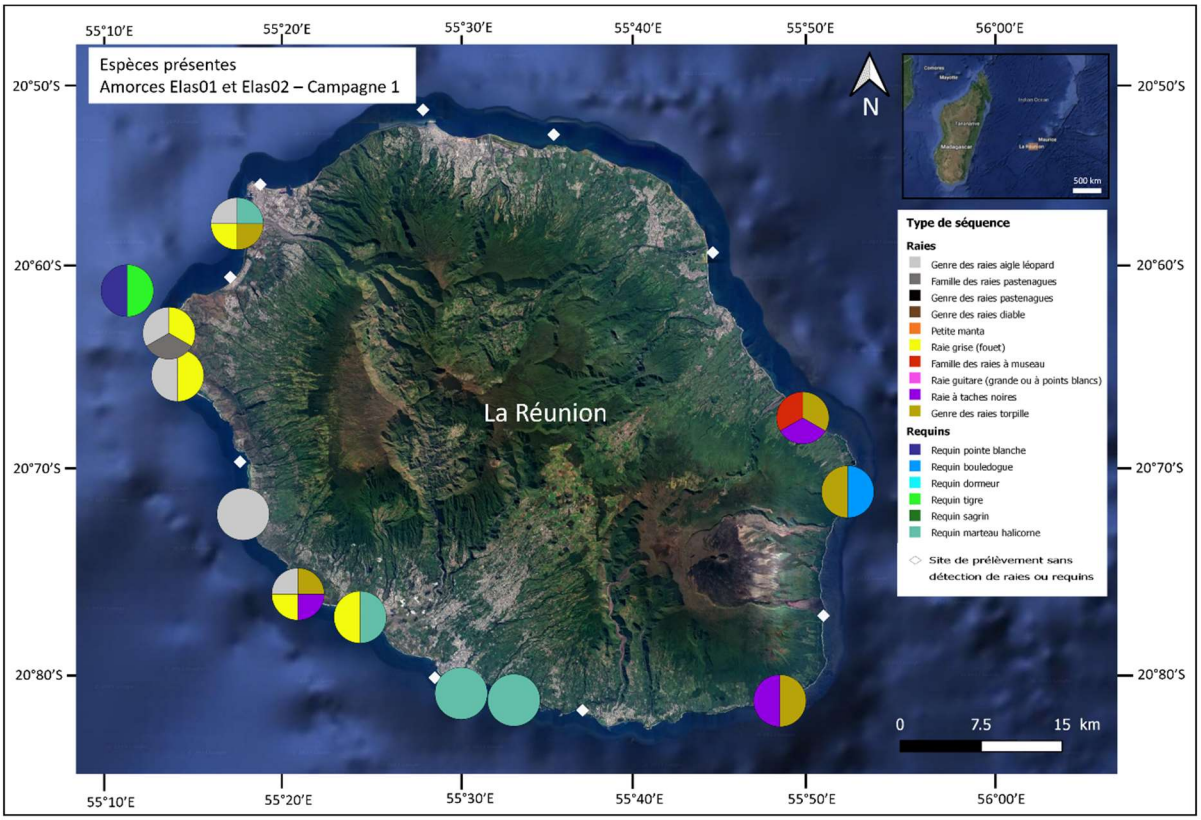

Espèces présentes
Amorces Elas01 et Elas02
Campagne 2
La Réunion
N
Type de séquence
Raies
Aetobatus spp.
Dasyatidae
Dasyatis spp.
Mobula spp.
Mobula thurstoni
Pateobatis fai
Rhinoptera
Rhynchobatus djiddensis ou australiae
Taeniura meyeni (ou Taeniurops)
Torpedo spp.
Requins
Carcharhinus albimarginatus
Carcharhinus leucas
Centroscymnus owstonii
Galeocerdo cuvier
Loxodon macrorhinus
Sphyrna lewini
Site de prélèvement sans détection de raies ou requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

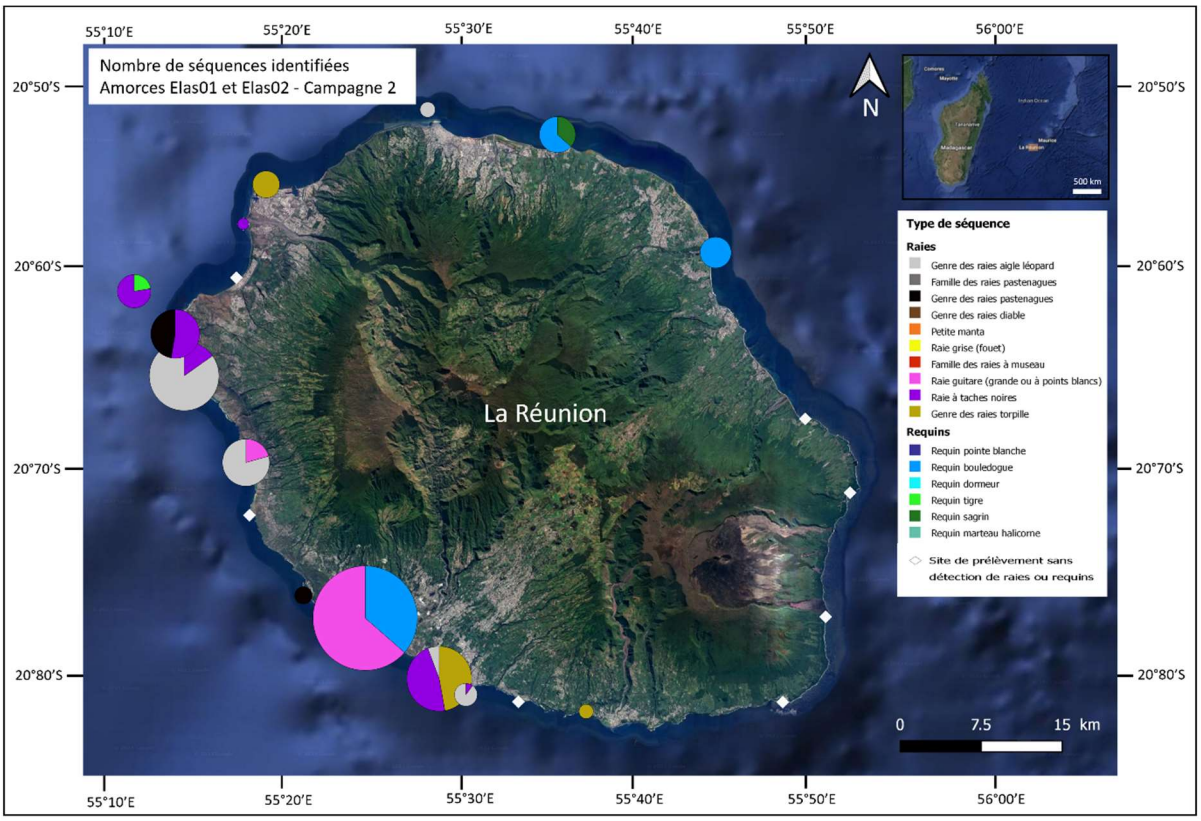

Nombre de séquences identifiées
Amorces Elas01 et Elas02
Campagne 3
La Réunion
N
Type de séquence
Raies
Aetobatus spp.
Dasyatidae
Dasyatis spp.
Mobula spp.
Mobula thurstoni
Pateobatis fai
Rhinoptera
Rhynchobatus djiddensis ou australiae
Taeniura meyeni (ou Taeniurops)
Torpedo spp.
Requins
Carcharhinus albimarginatus
Carcharhinus leucas
Centroscymnus owstonii
Galeocerdo cuvier
Loxodon macrorhinus
Sphyrna lewini
Site de prélèvement sans détection de raies ou requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

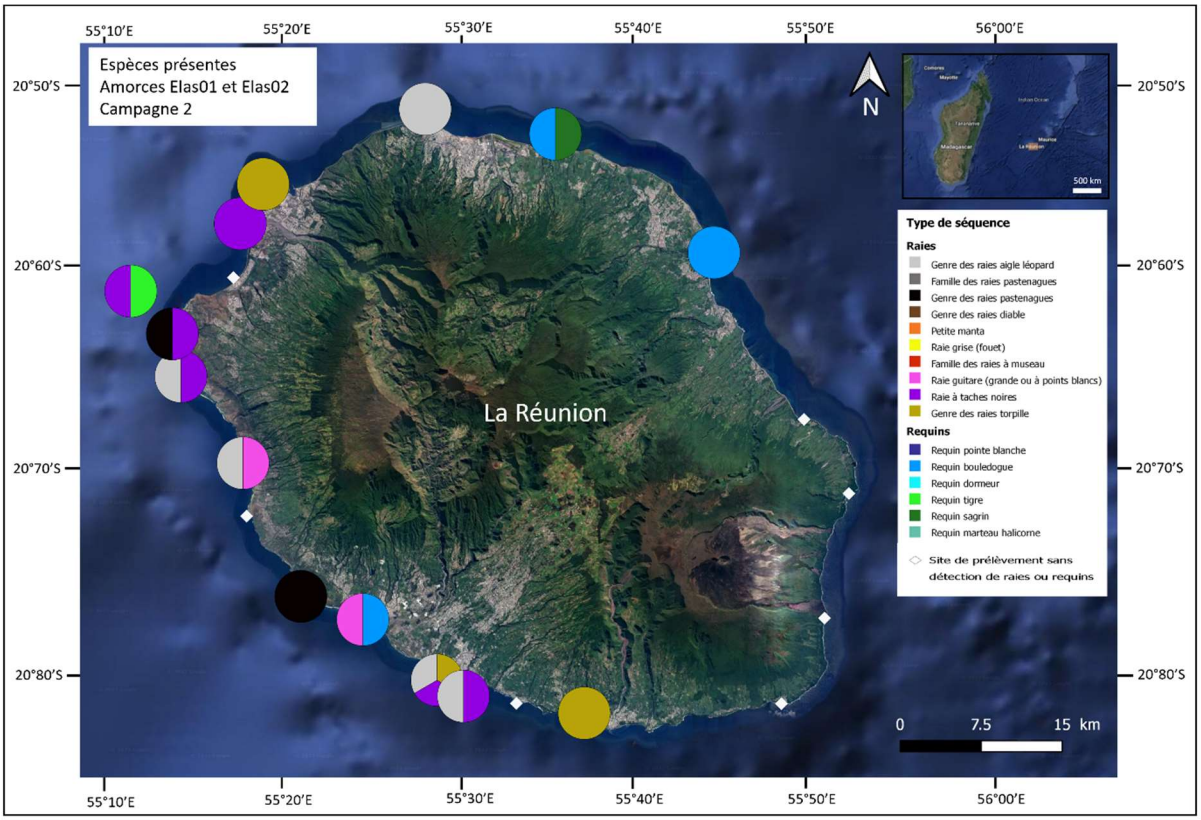


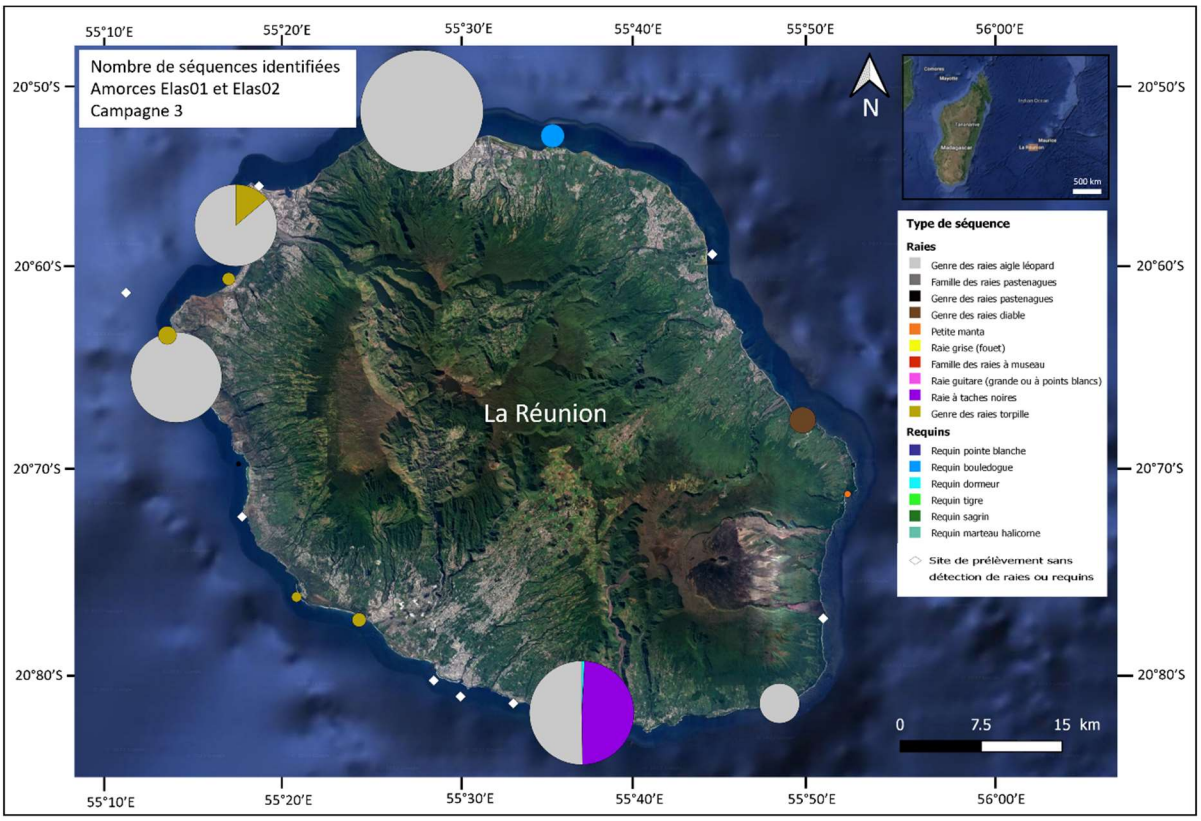
Nom vernaculaire :

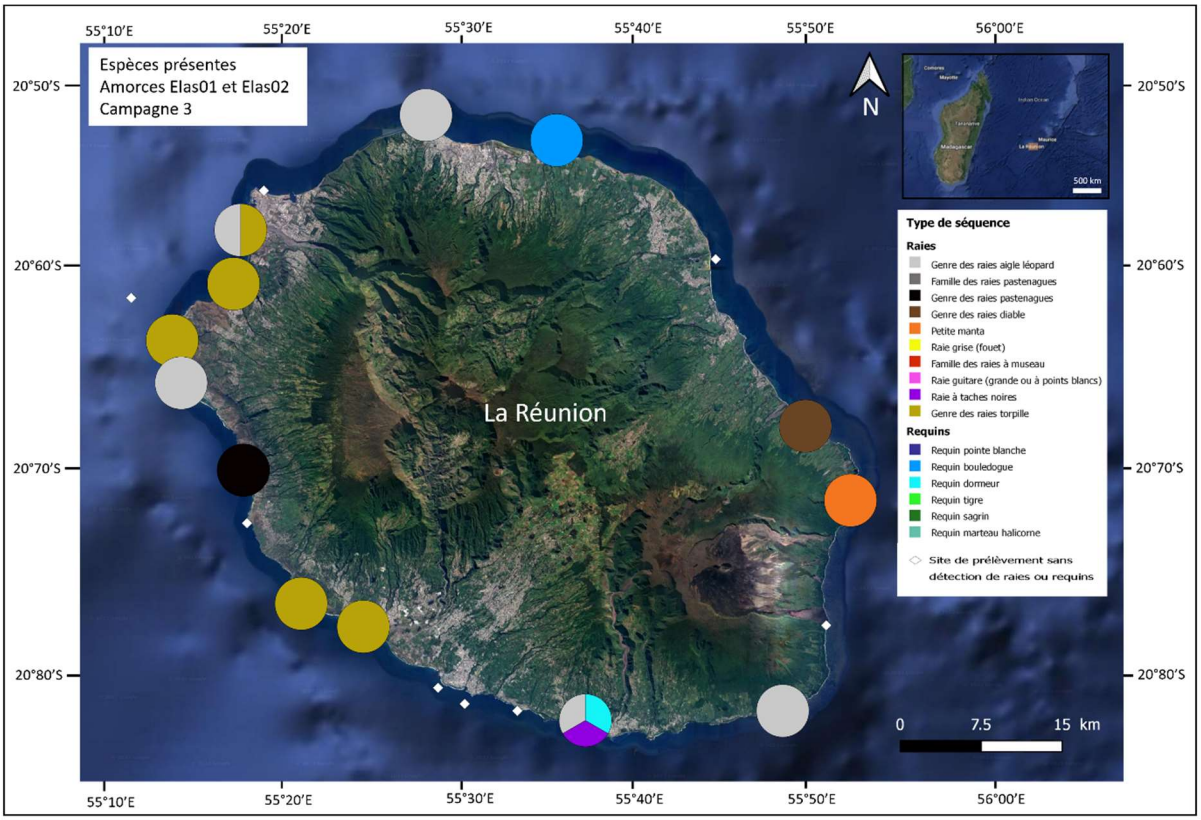



Espèces présentes
Amorces Elas01 et Elas02 – Campagne 1
La Réunion
N
Type de séquence
Raies
Genre des raies aigle léopard
Famille des raies pastenagues
Genre des raies pastenagues
Genre des raies diable
Petite manta
Raie grise (fouet)
Famille des raies à museau
Raie guitare (grande ou à points blancs)
Raie à taches noires
Genre des raies torpille
Requins
Requin pointe blanche
Requin bouledogue
Requin dormeur
Requin tigre
Requin sagrin
Requin marteau halicorne
Site de prélèvement sans détection de raies ou requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

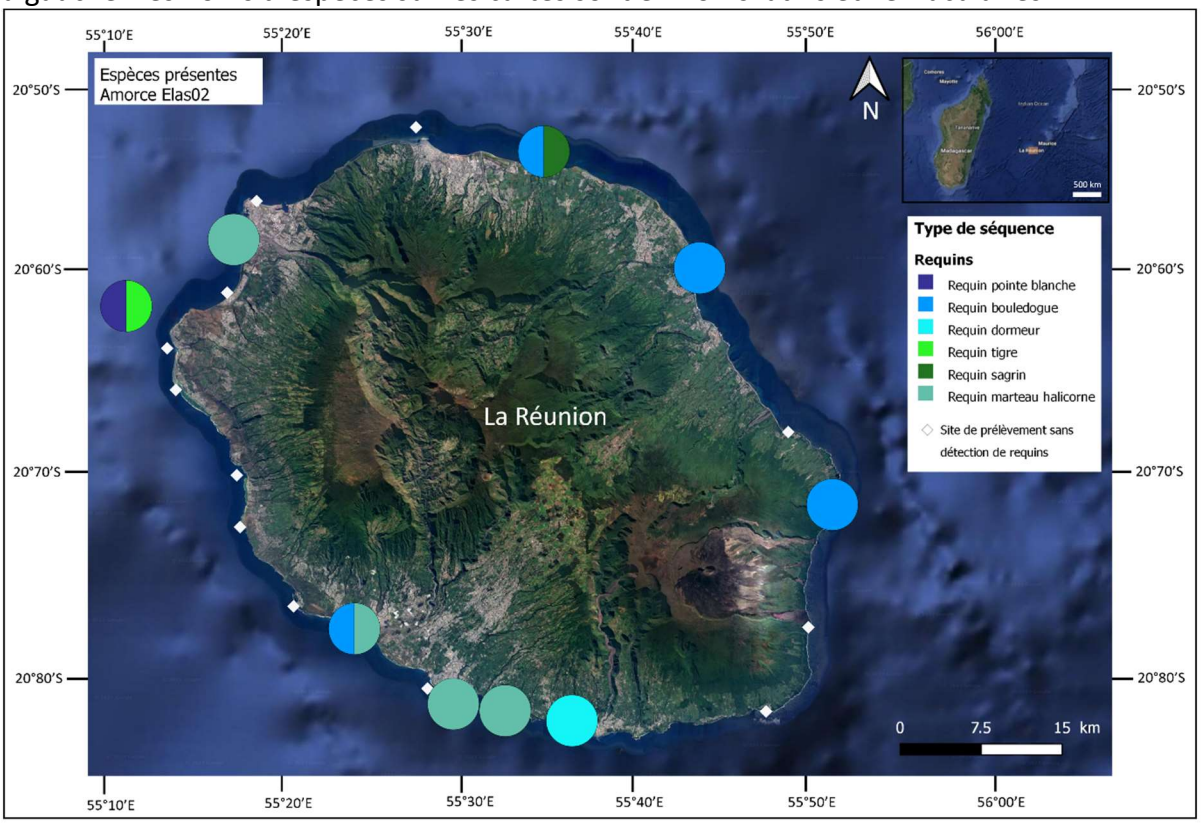

Nombre de séquences identifiées
Amorces Elas01 et Elas02 - Campagne 2
La Réunion
N
Type de séquence
Raies
Genre des raies aigle léopard
Famille des raies pastenagues
Genre des raies pastenagues
Genre des raies diable
Petite manta
Raie grise (fouet)
Famille des raies à museau
Raie guitare (grande ou à points blancs)
Raie à taches noires
Genre des raies torpille
Requins
Requin pointe blanche
Requin bouledogue
Requin dormeur
Requin tigre
Requin sagrin
Requin marteau halicorne
Site de prélèvement sans détection de raies ou requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

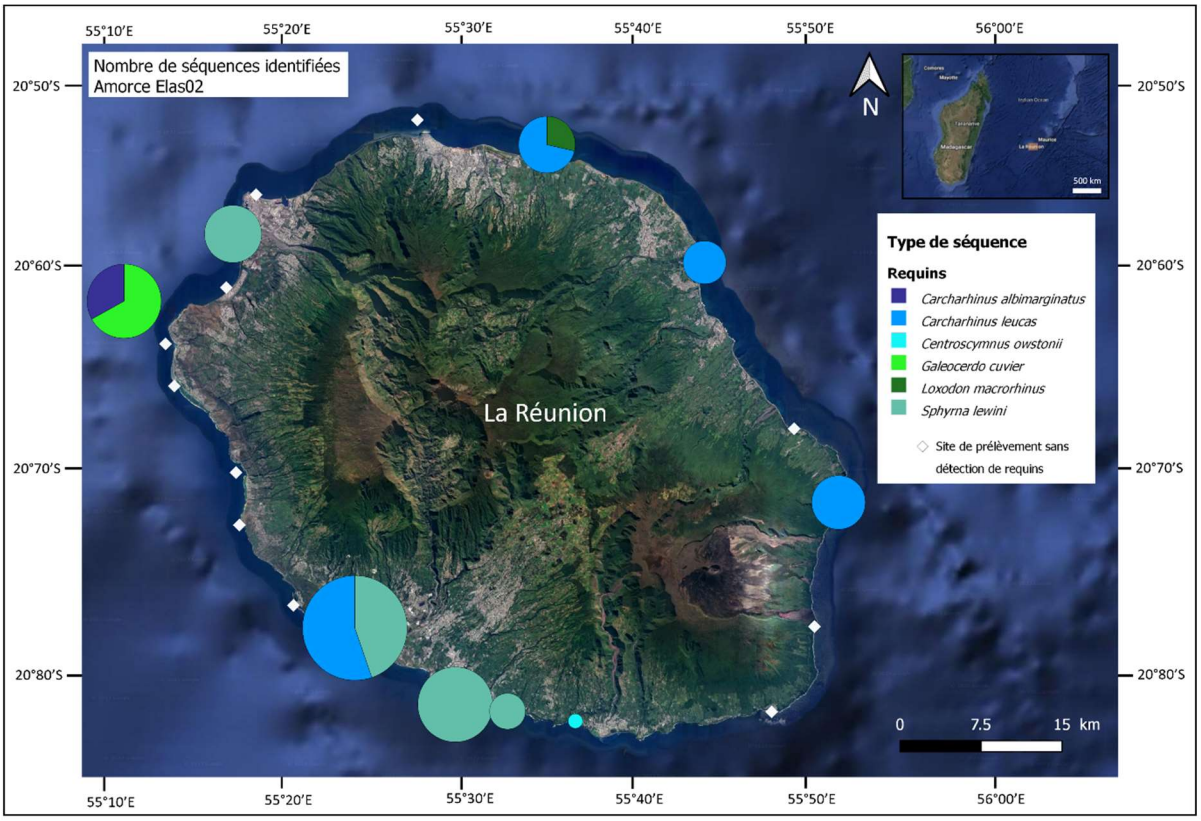

Espèces présentes
Amorces Elas01 et Elas02
Campagne 2
La Réunion
N
Type de séquence
Raies
Genre des raies aigle léopard
Famille des raies pastenagues
Genre des raies pastenagues
Genre des raies diable
Petite manta
Raie grise (fouet)
Famille des raies à museau
Raie guitare (grande ou à points blancs)
Raie à taches noires
Genre des raies torpille
Requins
Requin pointe blanche
Requin bouledogue
Requin dormeur
Requin tigre
Requin sagrin
Requin marteau halicorne
Site de prélèvement sans détection de raies ou requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

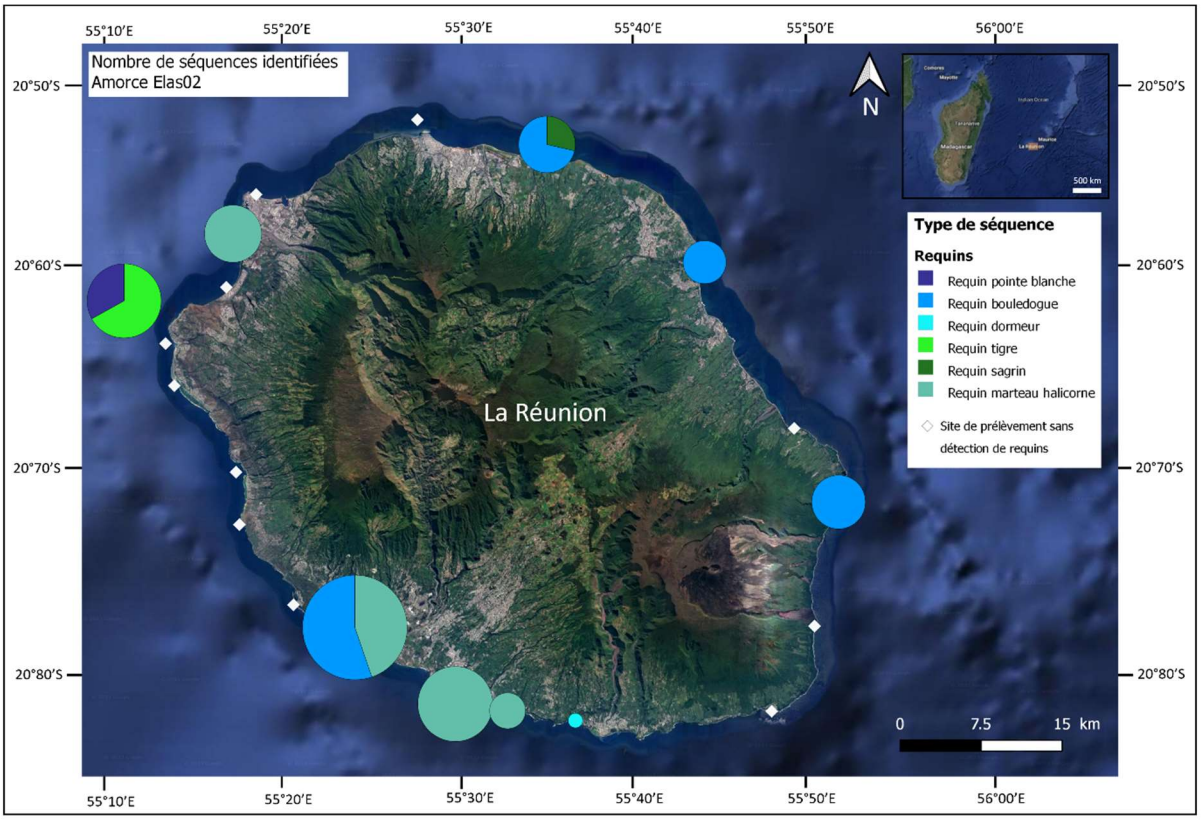

Nombre de séquences identifiées
Amorces Elas01 et Elas02
Campagne 3
La Réunion
N
Type de séquence
Raies
Genre des raies aigle léopard
Famille des raies pastenagues
Genre des raies pastenagues
Genre des raies diable
Petite manta
Raie grise (fouet)
Famille des raies à museau
Raie guitare (grande ou à points blancs)
Raie à taches noires
Genre des raies torpille
Requins
Requin pointe blanche
Requin bouledogue
Requin dormeur
Requin tigre
Requin sagrin
Requin marteau halicorne
Site de prélèvement sans détection de raies ou requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

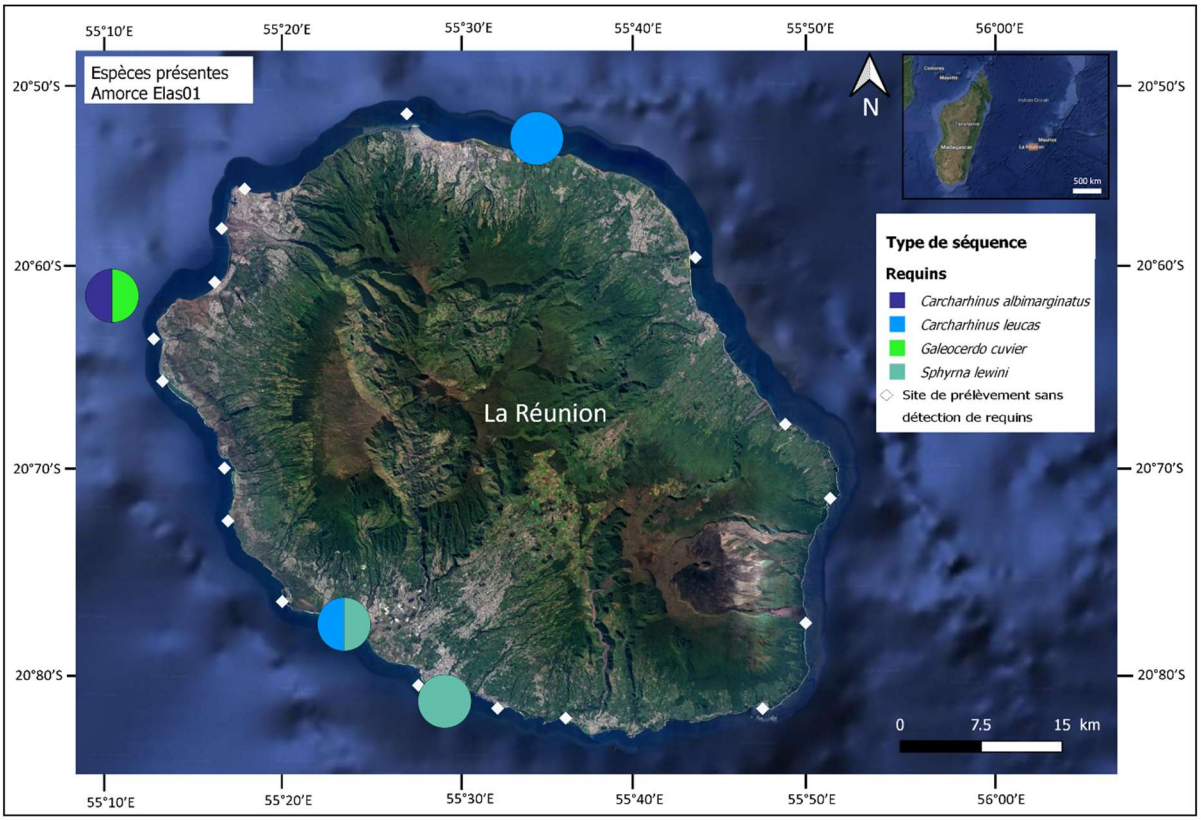

Espèces présentes
Amorces Elas01 et Elas02
Campagne 3
La Réunion
N
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S
0
7.5
15 km
500 km
Type de séquence
Raies
Genre des raies aigle léopard
Famille des raies pastenagues
Genre des raies pastenagues
Genre des raies diable
Petite manta
Raie grise (fouet)
Famille des raies à museau
Raie guitare (grande ou à points blancs)
Raie à taches noires
Genre des raies torpille
Requins
Requin pointe blanche
Requin bouledogue
Requin dormeur
Requin tigre
Requin sagrin
Requin marteau halicorne
Site de prélèvement sans détection de raies ou requins

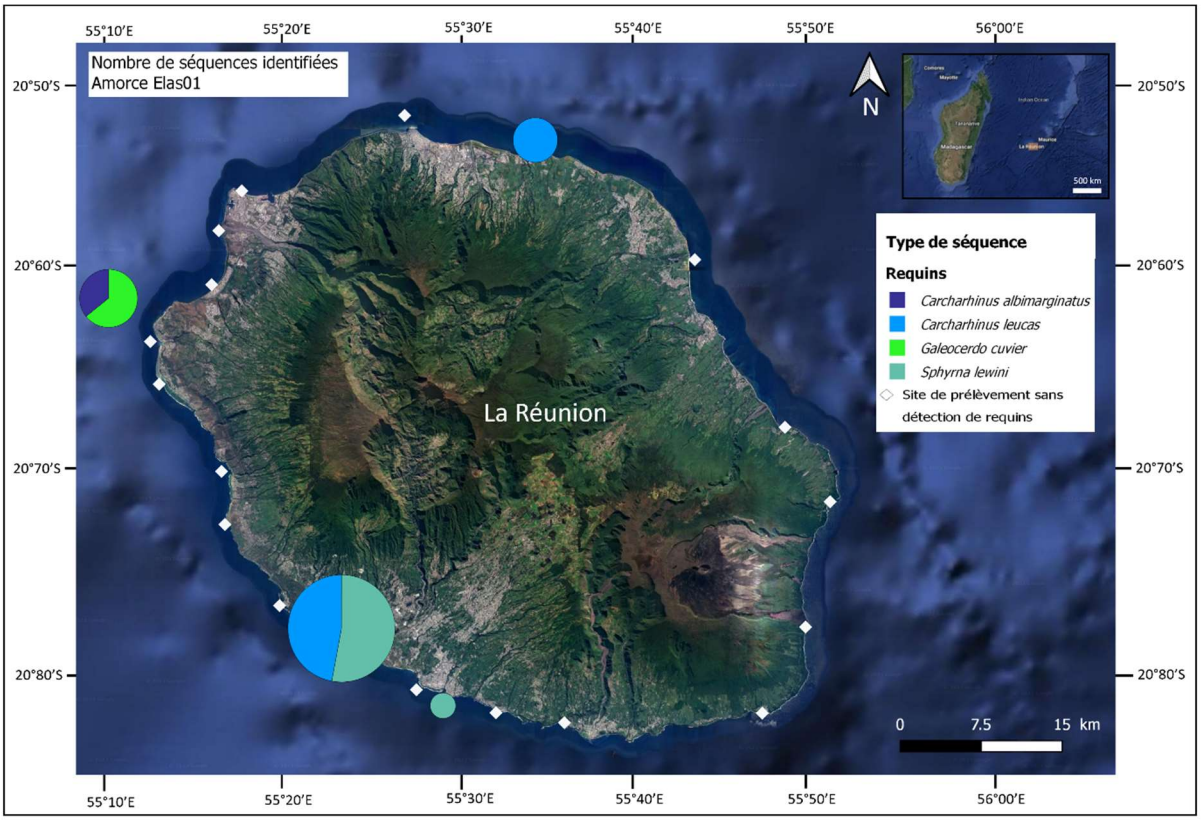
Annexe 4. Cartographie de la détection des requins autour de La Réunion à partir des amorces Elas01 et Elas02 avec les camemberts proportionnels aux nombres de séquences ou simplement au nombre de détection (présence/absence) – Voir le titre pour les détails en haut à gauche. Les noms d'espèces sur les cartes sont en noms latins et vernaculaires.

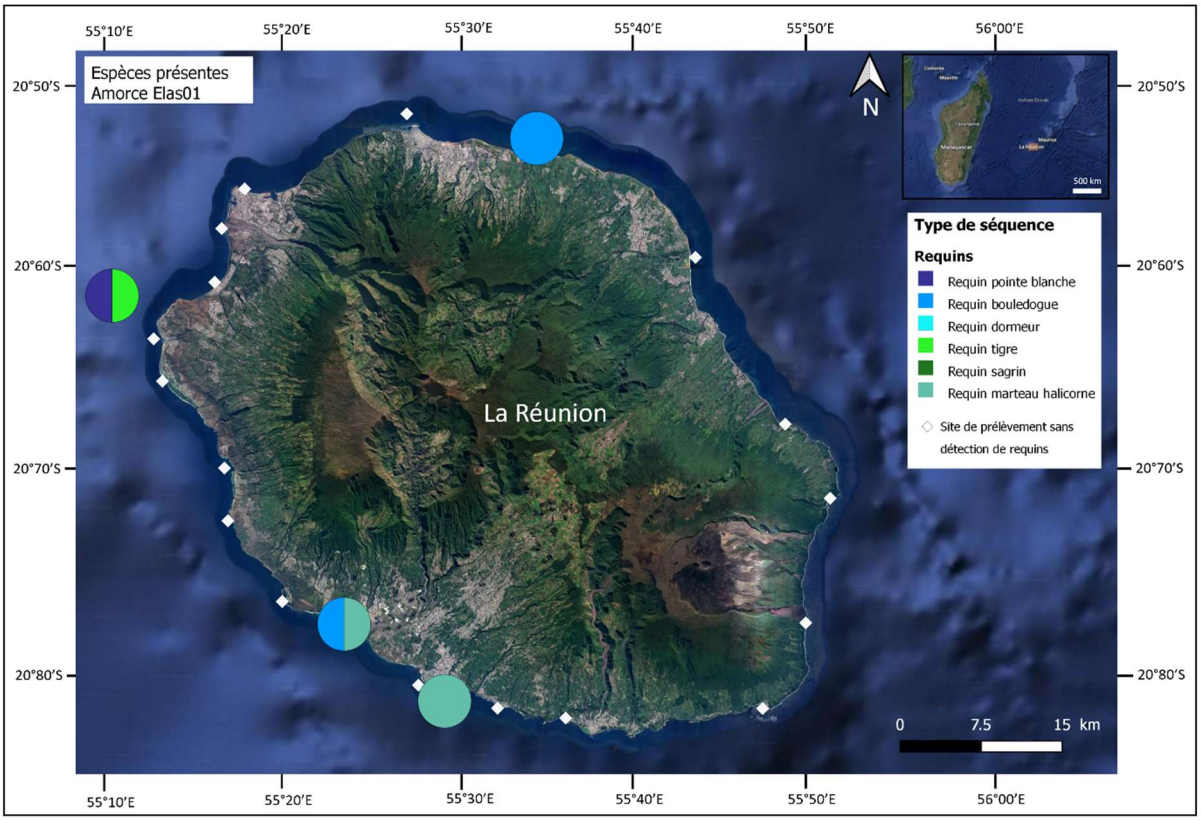


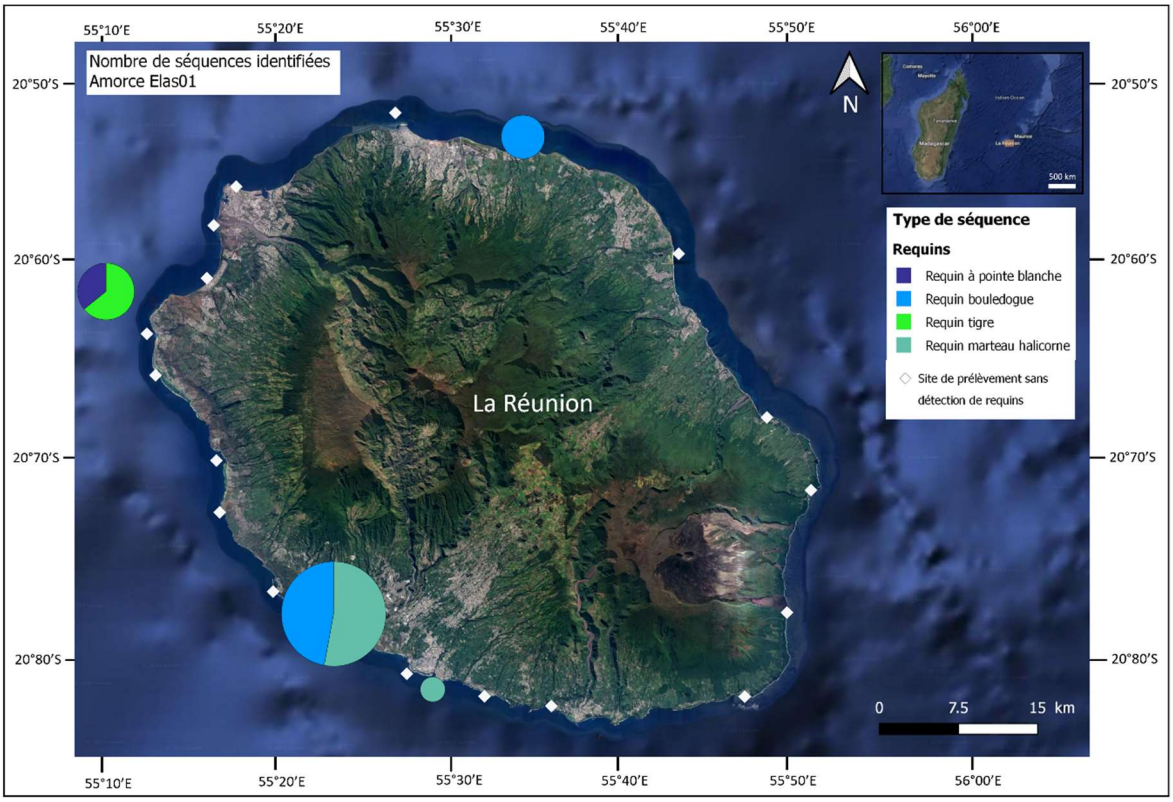


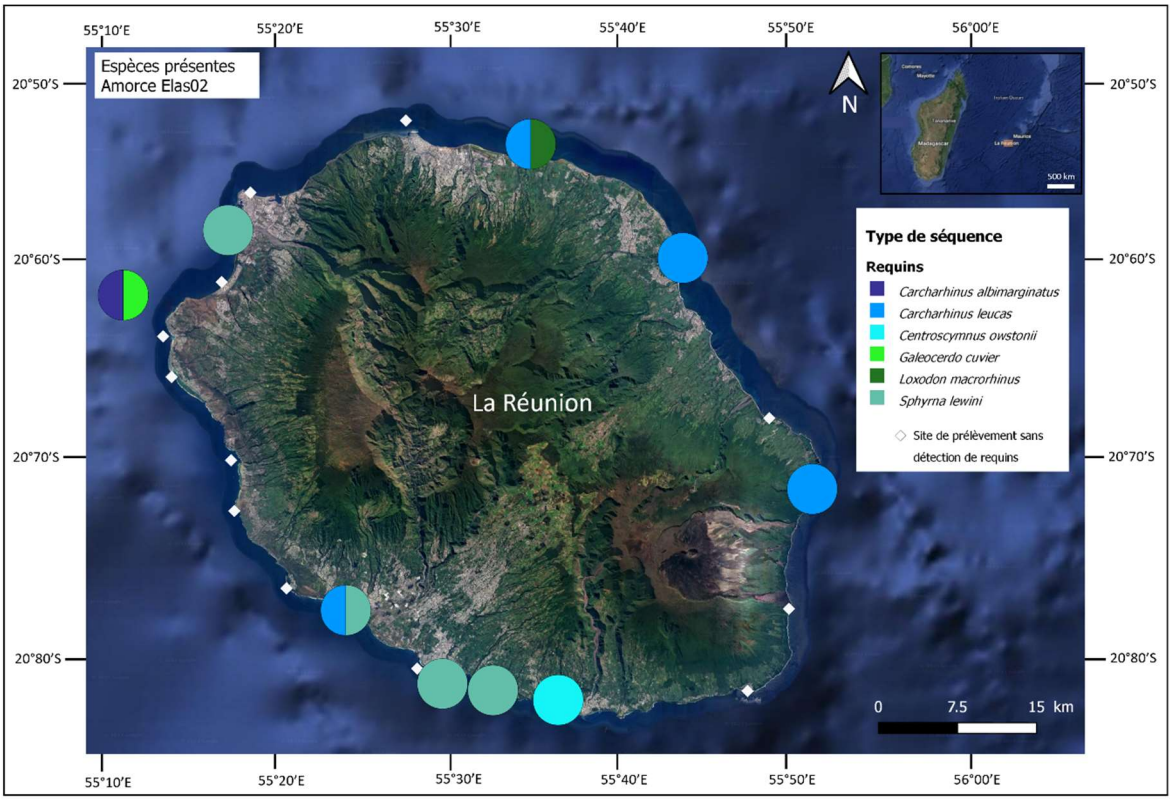
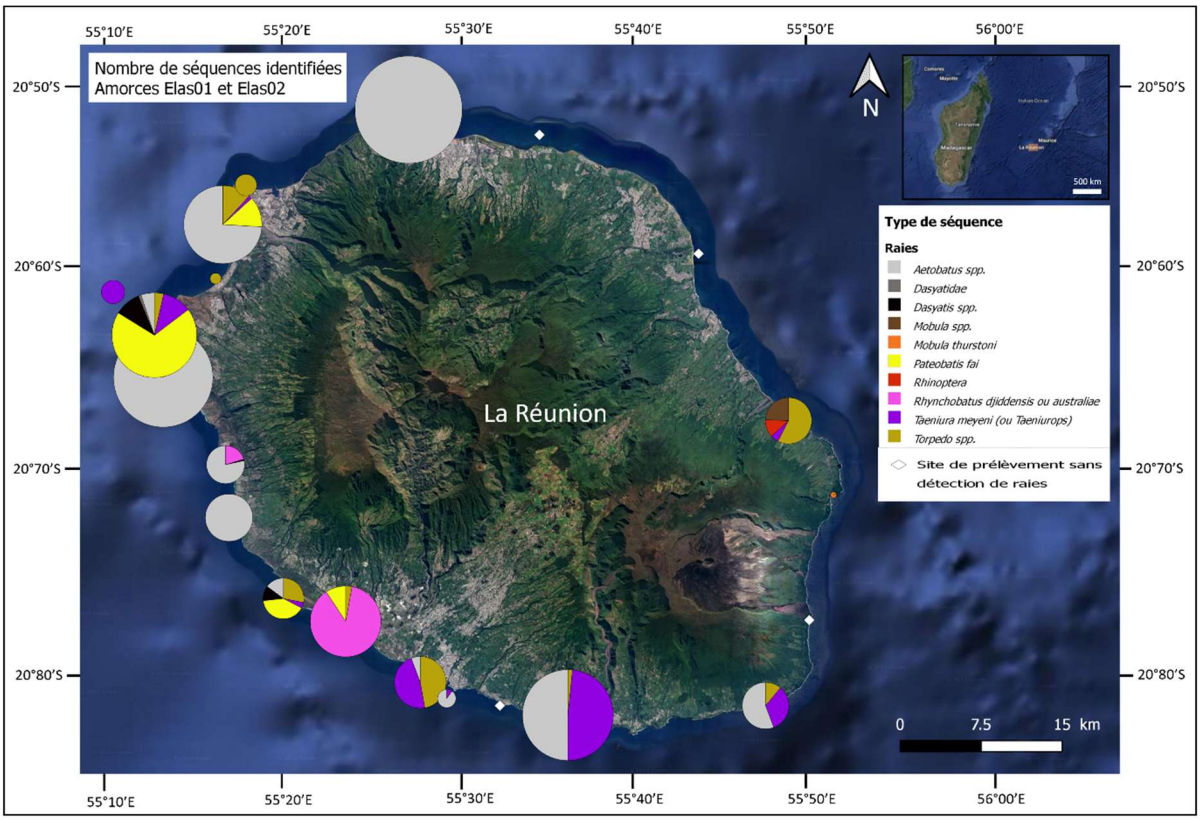
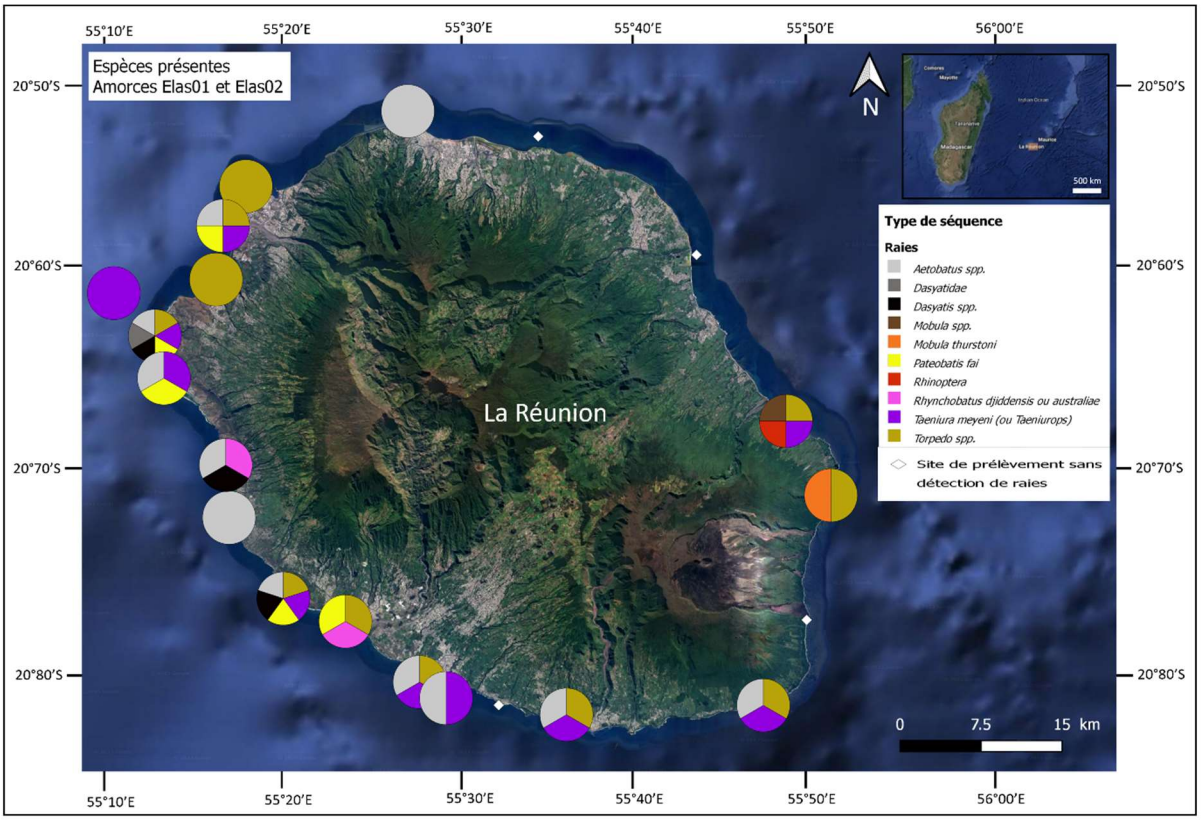

Nombre de séquences identifiées
Amorce Elas02
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S
N
500 km
Type de séquence
Requins
Requin pointe blanche
Requin bouledogue
Requin dormeur
Requin tigre
Requin sagrin
Requin marteau halicorne
Site de prélèvement sans détection de requins
La Réunion
0
7.5
15 km


Espèces présentes
Amorce Elas01
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S
N
500 km
Type de séquence
Requins
Carcharhinus albimarginatus
Carcharhinus leucas
Galeocerdo cuvier
Sphyrna lewini
Site de prélèvement sans détection de requins
La Réunion
0
7.5
15 km


Nombre de séquences identifiées
Amorce Elas01
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S
N
500 km
La Réunion
Type de séquence
Requins
Carcharhinus albimarginatus
Carcharhinus leucas
Galeocerdo cuvier
Sphyrna lewini
Site de prélèvement sans détection de requins
0
7.5
15 km


Espèces présentes
Amorce Elas01
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S
N
500 km
La Réunion
Type de séquence
Requins
Requin pointe blanche
Requin bouledogue
Requin dormeur
Requin tigre
Requin sagrin
Requin marteau halicorne
Site de prélèvement sans détection de requins
0
7.5
15 km


Nombre de séquences identifiées
Amorce Elas01
La Réunion
N
Type de séquence
Requins
Requin à pointe blanche
Requin bouledogue
Requin tigre
Requin marteau halicorne
Site de prélèvement sans détection de requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S


Espèces présentes
Amorce Elas02
La Réunion
N
Type de séquence
Requins
Carcharhinus albimarginatus
Carcharhinus leucas
Centroscymnus owstonii
Galeocerdo cuvier
Loxodon macrorhinus
Sphyrna lewini
Site de prélèvement sans détection de requins
0 7.5 15 km
55°10'E
55°20'E
55°30'E
55°40'E
55°50'E
56°00'E
20°50'S
20°60'S
20°70'S
20°80'S

Annexe 5. Cartographie de la détection des raies autour de La Réunion sur les trois campagnes scientifiques à partir des amorces Elas01 et Elas02 avec les camemberts proportionnels aux nombres de séquences ou simplement au nombre de détection (présence/absence) – Voir le titre pour les détails en haut à gauche. Les noms d'espèces sur les cartes sont en noms latins.