naturae

2021 • 8

COLLOQUE NATIONAL DE MALACOLOGIE CONTINENTALE,
NANTES, 6 ET 7 DÉCEMBRE 2018

Édité par Lilian LÉONARD

Cinq ans d'inventaires des Bivalves de France par analyse de l'ADN environnemental : quelles conclusions, quelles perspectives ?

Vincent PRIÉ, Alice VALENTINI, Pauline JEAN, Jean-Baptiste DECOTTE, Émilie BREUGNOT, Stéphanie COUPRIE, Gaëlle JARDIN, Florent LAMAND, Nicolas ROSET, Thibault VIGNERON, Mathieu ROCLE, Xavier CUCHERAT, Tony DEJEAN & Pierre TABERLET

art. 2021 (8) — Publié le 31 mars 2021
www.revue-naturae.fr

OFB OFFICE FRANÇAIS DE LA BIODIVERSITÉ

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

MUSÉUM NAL HIST NATURELLE

Directeur de la publication / *Publication director* : Bruno David,
Président du Muséum national d'Histoire naturelle

Rédacteur en chef / *Editor-in-chief* : Jean-Philippe Siblet

Assistante de rédaction / *Assistant editor* : Sarah Figuet (naturae@mnhn.fr)

Mise en page / *Page layout* : Sarah Figuet

Comité scientifique / *Scientific board* :
Luc Abbadie (UPMC, Paris)
Luc Barbier (Parc naturel régional des caps et marais d'Opale, Colembert)
Aurélien Besnard (CEFE, Montpellier)
Vincent Boullet (Expert indépendant flore/végétation, Frugières-le-Pin)
Hervé Brustel (École d'ingénieurs de Purpan, Toulouse)
Patrick De Wever (MNHN, Paris)
Thierry Dutoit (UMR CNRS IMBE, Avignon)
Éric Feunteun (MNHN, Dinard)
Romain Garrouste (MNHN, Paris)
Grégoire Gautier (DRAAF Occitanie, Toulouse)
Olivier Gilg (Réserves naturelles de France, Dijon)
Frédéric Gosselin (Irstea, Nogent-sur-Vernisson)
Patrick Haffner (UMS PatriNat, Paris)
Frédéric Hendoux (MNHN, Paris)
Xavier Houard (OPIE, Guyancourt)
Isabelle Le Viol (MNHN, Concarneau)
Francis Meunier (Conservatoire d'espaces naturels – Hauts-de-France, Amiens)
Serge Muller (MNHN, Paris)
Francis Olivereau (DREAL Centre, Orléans)
Laurent Poncet (UMS PatriNat, Paris)
Nicolas Poulet (OFB, Vincennes)
Jean-Philippe Siblet (UMS PatriNat, Paris)
Laurent Tillon (ONF, Paris)
Julien Touroult (UMS PatriNat, Paris)

Couverture / Cover :
Dreissènes agglutinées sur une tige de Phragmite. L'analyse de l'ADN environnemental permet d'améliorer la détection précoce des espèces envahissantes.
Crédit photo : V. Prié.

Naturae est une revue en flux continu publiée par les Publications scientifiques du Muséum, Paris
Naturae *is a fast track journal published by the Museum Science Press, Paris*

Les Publications scientifiques du Muséum publient aussi / *The Museum Science Press also publish :*
Adansonia, Zoosystema, Anthropozoologica, European Journal of Taxonomy, Geodiversitas, **Cryptogamie sous-sections** ***Algologie, Bryologie, Mycologie, Comptes Rendus Palevol.***

Diffusion – Publications scientifiques Muséum national d'Histoire naturelle
CP 41 – 57 rue Cuvier F-75231 Paris cedex 05 (France)
Tél. : 33 (0)1 40 79 48 05 / Fax : 33 (0)1 40 79 38 40
diff.pub@mnhn.fr / http://sciencepress.mnhn.fr

© Publications scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 2021
ISSN (électronique / *electronic*) : 1638-9387

Cinq ans d'inventaires des Bivalves de France par analyse de l'ADN environnemental : quelles conclusions, quelles perspectives ?

Vincent PRIÉ
Association Caracol, 84 chemin du Castellas, F-34700 Lodève (France)
et Biotope, 22 Bd Maréchal Foch, F-34140 Mèze (France)
prie.vincent@gmail.com

Alice VALENTINI
Pauline JEAN
Jean-Baptiste DECOTTE
SPYGEN, 17 rue du Lac Saint-André,
Savoie Technolac, F-73375 Le Bourget du Lac Cedex (France)
alice.valentini@spygen.com
pauline.jean@spygen.com
jb.decotte@vigilife.org

Émilie BREUGNOT
Stéphanie COUPRIE
Gaëlle JARDIN
Florent LAMAND
Nicolas ROSET
Thibault VIGNERON
Office français de la Biodiversité, "Le Nadar" Hall C,
5, square Félix Nadar, F-94300 Vincennes (France)
emilie.breugnot@ofb.gouv.fr
stephanie.couprie@ofb.gouv.fr
gaelle.jardin@ofb.gouv.fr
florent.lamand@ofb.gouv.fr
nicolas.roset@ofb.gouv.fr
thibault.vigneron@ofb.gouv.fr

Mathieu ROCLE
Compagnie nationale du Rhône, 2 rue André Bonin, F-69004 Lyon (France)
m.rocle@cnr.tm.fr

Xavier CUCHERAT
Arion.idé, 10 rue Louis Aragon, F-59147 Gondecourt (France)
arion.ide@orange.fr

Tony DEJEAN
SPYGEN, 17 rue du Lac Saint-André,
Savoie Technolac, F-73375 Le Bourget du Lac Cedex (France)
tony.dejean@spygen.com

Pierre TABERLET
Université Grenoble Alpes, Laboratoire d'Écologie Alpine (UMR 5553),
Bâtiment D, 2233 rue de la Piscine, F-38610 Gières (France)
pierre.taberlet@univ-grenoble-alpes.fr

Soumis le 19 septembre 2019 | Accepté le 27 avril 2020 | Publié le 31 mars 2021

Prié V., Valentini A., Jean P., Decotte J.-B., Breugnot É., Couprie S., Jardin G., Lamand F., Roset N., Vigneron T., Rocle M., Cucherat X., Dejean T. & Taberlet P. 2021. — Cinq ans d'inventaires des Bivalves de France par analyse de l'ADN environnemental : quelles conclusions, quelles perspectives ?, *in* Léonard L. (éd.), Colloque national de malacologie continentale, Nantes, 6 et 7 décembre 2018. *Naturae* 2021 (8): 91-114. https://doi.org/10.5852/naturae2021a8

RÉSUMÉ

Les inventaires d'espèces dulçaquicoles par analyse de l'ADN environnemental (ADNe) se sont développés depuis une dizaine d'années. Nous présentons ici l'application de cette méthode à l'inventaire des Bivalves d'eau douce de France. De 2015 à 2018, nous avons réalisé plusieurs tests de terrain en France, en choisissant différentes conditions environnementales. Nous avons comparé les résultats des analyses ADNe avec les connaissances sur la répartition des Bivalves à l'échelle de la France métropolitaine, à l'échelle des bassins-versants de la Meuse et du Rhône, et avec des sites ayant fait l'objet d'inventaires poussés, impliquant plusieurs malacologues utilisant les méthodes traditionnelles (observations au bathyscope, plongée hyperbare, tri de sédiment). Nos résultats montrent l'efficacité des analyses d'ADNe pour la détection et la distinction de presque tous les taxons de Bivalves dulçaquicoles de France (à l'exception des différentes espèces de Corbicules et des sous-espèces de la Mulette méridionale *Unio mancus* Lamarck, 1819). La méthode est commercialisée depuis 2018 et notre base de données comporte fin 2020 plus de 300 sites inventoriés par analyse de l'ADNe. L'analyse de ces résultats montre que certaines espèces peu étudiées, en particulier des espèces des écosystèmes de l'aval, souffrent d'extinctions locales en France. Ils plaident en faveur de la mise en œuvre d'actions de conservation en particulier pour la Cyclade des fleuves *Sphaerium solidum* (Normand, 1844), la Grande Cyclade *Sphaerium rivicola* (Lamarck, 1818) et l'Anodonte comprimée *Pseudanodonta complanata* (Rossmässler, 1835).

MOTS CLÉS
ADNe,
Sphaerium solidum,
Sphaerium rivicola,
Pseudanodonta complanta.

ABSTRACT

Five years of freshwater bivalves survey using environmental DNA analysis: which conclusions, which perspectives?

Freshwater species surveys using environmental DNA (eDNA) analysis have developed over the last decade. We present here the application of this method to inventory freshwater bivalves of France. From 2015 to 2018, we conducted several field tests in France, choosing different environmental conditions. We compared the results of eDNA analyzes with knowledge on bivalves distribution at the scale of France mainland, at the scale of the Meuse and the Rhône watersheds, and with sites that were the subject of intensive surveys, involving several malacologists using traditional methods (observations with bathyscopes, scuba diving, sediment sorting). Our results show the effectiveness of eDNA analyzes for the detection and distinction of almost all freshwater bivalve taxa in France (except for the different species of Corbicula and the subspecies of *Unio mancus* Lamarck, 1819). The method has been commercialized since 2018 and at the end of 2020 our database contains more than 300 sites inventoried by eDNA analysis. The analysis of these results shows that some little studied species, in particular downstream ecosystem species, suffer from extirpation in France. They argue in favor of the implementation of conservation actions, in particular for the Witham Orb Mussel *Sphaerium solidum* (Normand, 1844), the Nut Orb Mussel *Sphaerium rivicola* (Lamarck, 1818) and the Depressed River Mussel *Pseudanodonta complanata* (Rossmässler, 1835).

KEY WORDS
eDNA,
Sphaerium solidum,
Sphaerium rivicola,
Pseudanodonta complanta.

INTRODUCTION

L'inventaire des Bivalves dulçaquicoles, en particulier dans les écosystèmes de l'aval, est un véritable défi naturaliste pour plusieurs raisons : d'une part parce que le milieu aquatique est difficile à prospecter (profondeur, turbidité, dangers liés à la navigation ou aux objets dérivants, etc. [voir Prié *et al.* 2018]) ; d'autre part parce que beaucoup d'espèces y sont – ou y sont devenues – rares ; enfin parce que les Bivalves dulçaquicoles sont difficiles à détecter (recouvrement par la vase ou les algues, enfoncement périodique dans le sédiment, très petite taille pour certaines espèces). À ces difficultés de terrain s'ajoutent les problèmes de détermination, particulièrement difficile pour certains taxons à forte variabilité morphologique comme la Mulette des peintres *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) et la Mulette méridionale *Unio mancus* Lamarck, 1819 ; ou bien au contraire indifférenciables morphologiquement, comme la Mulette épaisse *Unio crassus crassus* Philipsson, 1788 et la Mulette ligérienne *Unio crassus courtillieri* Hattemann, 1859 ; ou encore, pour plusieurs espèces du genre *Euglesa* dont les critères de détermination sont ténus.

Pourtant, les Bivalves d'eau douce font partie des invertébrés ayant le statut de conservation le plus préoccupant à l'échelle mondiale (Lydeard *et al.* 2004 ; Lopes-Lima *et al.* 2017 ; Ferreira-Rodríguez *et al.* 2019), les écosystèmes dulçaquicoles étant eux-mêmes les plus menacés sur la planète (Dudgeon *et al.* 2006 ; Carpenter *et al.* 2011 ; Albert *et al.* 2020). En France, quelques espèces charismatiques comme la Mulette perlière *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758), la Grande Mulette *Pseudunio auricularius* (Spengler, 1793) et la Mulette épaisse *Unio crassus*

Philipsson, 1788 mobilisent des sommes importantes pour des actions de conservation (programmes LIFE+, Plan nationaux d'Actions, fermes d'élevage, etc.) ou dans le cadre de mesures d'évitement, de réduction et de compensation des impacts des grands aménagements. Par ailleurs, d'autres espèces régressent de manière importante, comme la Mulette des rivières *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798) ou la Mulette renflée *Unio tumidus* Philipsson, 1788 sans éveiller l'attention des gestionnaires (Prié 2015). Enfin, certaines espèces peu détectables, comme les Sphaeriidae, peuvent décliner de manière encore plus inquiétante dans l'indifférence générale.

Compte tenu de ces déséquilibres liés pour l'essentiel à la difficulté d'observation ou de détermination des espèces, il devient de plus en plus indispensable de disposer d'outils fiables, utilisables par tous et peu onéreux, pour la recherche et l'inventaire des Bivalves dulçaquicoles.

L'analyse de l'ADN environnemental (ou « ADNe », Taberlet *et al.* 2012) est une technique mise au point récemment pour détecter la présence d'amphibiens (Ficetola *et al.* 2008 ; Dejean *et al.* 2012 ; Biggs *et al.* 2015), de poissons (Darling & Mahon 2011 ; Kelly *et al.* 2014 ; Evans *et al.* 2015 ; Klymus *et al.* 2015) ou d'autres organismes aquatiques (voir Thomsen & Willerslev 2015 pour une synthèse). Pour ce qui concerne les Mollusques, certains travaux sur les Gastéropodes (Goldberg *et al.* 2013) ou sur les Bivalves (e.g. Stoeckle *et al.* 2016 ; Sansom & Sassoubre 2017 ; Currier *et al.* 2018) ont pu montrer que l'analyse d'échantillons d'eau permettait de détecter efficacement certaines espèces. Elle a rapidement pris deux directions : les approches ne ciblant qu'une seule espèce (*single species detection*) et les analyses dites *ADNe metabarcoding* permettant de détecter simultanément toutes les espèces d'un groupe ciblé (Valentini *et al.* 2016 ; Klymus *et al.* 2017 ; Pont *et al.* 2018). Les premiers résultats d'*ADNe metabarcoding* à partir d'échantillons d'eau ont été obtenus par Thomsen *et al.* (2012) et Miya *et al.* (2015) pour les poissons, et Valentini *et al.* (2016) pour les poissons et les amphibiens.

De 2015 à 2017, nous avons développé une méthode d'analyse d'*ADNe metabarcoding* pour les Bivalves dulçaquicoles de France métropolitaine. Les premières étapes ont été de concevoir des amorces spécifiques pour les ordres des Unionida et des Venerida, d'élaborer une base de référence des séquences du gène ciblé (un fragment du 16S) intégrant l'ensemble des espèces de Bivalves dulçaquicoles de France, et surtout de comparer les résultats d'inventaires intensifs menés avec des méthodes traditionnelles (recherches à vue, plongée hyperbare, dragage de sédiment) et d'inventaires basés uniquement sur l'analyse de l'ADNe de manière à s'assurer de la fiabilité de la méthode. La technique est aujourd'hui parfaitement au point et commercialisée depuis 2018.

Nous présentons ici les résultats de ces quatre années d'échantillonnage sur la France entière. Nous évaluons la fiabilité de la méthode pour les inventaires de terrain en comparant nos résultats avec ceux obtenus par des méthodes d'inventaire traditionnelles aux échelles nationale, de grands bassins versants et de stations d'inventaire ponctuelles. Cette nouvelle méthode d'inventaire entraine un changement de paradigme. Ses conséquences immédiates concernent la hiérarchisation des enjeux de conservation de plusieurs espèces de Bivalves dulçaquicoles, actuellement ignorées des politiques de conservation. Nos résultats permettent également d'améliorer les connaissances sur certaines espèces mal connues et donnent enfin un éclairage nouveau sur la progression de certaines espèces exotiques envahissantes en France.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Base de référence

Pour toutes les espèces de Bivalves dulçaquicoles de la faune de France, l'ensemble des haplotypes connus du fragment du gène 16S ciblé par nos analyses a été compilé. La base de référence moléculaire s'appuie sur les travaux de Huff *et al.* (2004) et des séquences inédites de spécimens français pour les Margaritiferidae ; Prié & Puillandre (2014) pour les Unionidae ; Lee & Ó Foighil (2003), Mouthon & Forcellini (2017) et Bespalaya *et al.* (2015) pour les Sphaeriidae ; Pigneur *et al.* (2011) et des séquences inédites de spécimens français pour les Cyrenidae ; Therriault *et al.* (2004), Stepien *et al.* (2014) et des séquences inédites de spécimens français pour les Dresseinidae. Enfin, certaines séquences mal identifiées sur GenBank ont été expurgées, comme la séquence EU518636 attribuée à tort à *Pyganodon grandis* (Say, 1829) alors qu'il s'agit d'une séquence d'ADN mitochondrial mâle de *Sinanodonta woodiana* (I. Lea, 1834).

Concernant la Pisidie jolie *Euglesa pulchella* (Jenyns, 1832), la séquence de référence est celle publiée sur GenBank par Mouthon & Forcellini, avec le numéro d'accession KY202894, sous la référence Mouthon & Forcellini (2017) – bien que cette séquence du gène 16S ne soit pas mentionnée dans cet article, qui fonde ses conclusions uniquement sur l'analyse du fragment de gène ITS-1. Concernant la Cyclade ovale *Sphaerium ovale* (Ferussac, 1807), nous avons utilisé comme séquence de référence celle produite par Prié *et al.* 2020. L'identification du spécimen étudié se base sur la forme de la néphridie et l'espacement des pores sur la coquille. Le statut taxonomique de cette espèce ne fait pas consensus au sein de la communauté malacologique et nos résultats concernant la Cyclade ovale doivent être considérés avec précaution.

Protocole d'échantillonnage

Le protocole d'échantillonnage de l'ADNe (Fig. 1) consiste en un prélèvement d'eau pompée pendant 30 minutes à l'aide d'une pompe péristaltique (Vampir, Bürkle GmbH, Bad Bellingen, débit de 1,1 L.min^{-1}), d'un tuyau stérile (*DNA free*), et filtrée par une capsule de filtration dédiée VigiDNA® 0,45 µM (SPYGEN, le Bourget du Lac, France, voir Cantera *et al.* 2019 pour plus de détails). Le volume d'eau pompé n'est malheureusement pas constant car il varie en fonction de la pompe utilisée, de l'état de charge des batteries, du colmatage plus ou moins rapide de la capsule de filtration, etc. mais il correspond en théorie à environ 30 L d'eau par prélèvement. L'eau prélevée est filtrée à travers la capsule, l'eau restant dans la capsule en fin de pompage est extraite, une solution tampon est ajoutée (80 mL de CL1 Conservation

Fig. 1. — Exemple de protocole d'échantillonnage sur le terrain. Le tuyau et sa crépine sont laissés libres dans le courant, la pompe péristaltique est montée sur un moteur de perceuse maintenu en rotation par un scratch. L'eau est restituée après filtration dans la capsule. Crédit photo : V. Prié.

buffer, SPYGEN, le Bourget du Lac, France), puis la capsule est fermée hermétiquement et envoyée au laboratoire pour analyse. Pour chaque site, nous procédons à deux réplicats (i.e., environ 60 L d'eau analysés au total).

Le choix de réaliser deux réplicats sur chaque site résulte d'un compromis entre la recherche de fiabilité maximale d'une part, et les impératifs économiques d'autre part. La même méthodologie est employée à l'heure actuelle pour la détection des poissons en cours d'eau. Pour les poissons, il a été démontré sur le Rhône que deux réplicats étaient suffisants pour détecter 96,9 % du nombre total d'espèces présentes (Pont *et al.* 2018 ; résultats similaires obtenus par Cantera *et al.* 2019 sur les rivières de Guyane). Les coûts des analyses avec plus de deux réplicats nous ont semblés prohibitifs et un compromis a dû être établi entre une exigence de détection optimale et la réalité économique.

Les amorces utilisées, les techniques d'extraction, d'amplification et de bio-informatique mises en œuvre pour l'analyse des échantillons par *ADNe metabarcoding* ne sont pas développées ici (voir Prié *et al.* 2020 pour plus de détails).

Sites d'échantillonnage

Dans le cadre du développement de la méthode, des échantillonnages ont été réalisés en France entre 2015 et 2017 dans différentes conditions : grands fleuves et petits cours d'eau, substrats acides et calcaires, eaux courantes et stagnantes, limpides et turbides. Les sites analysés après 2017, alors que la technique commençait à être commercialisée, sont également intégrés au présent travail. L'échantillonnage couvre en 2020 la plupart des écosystèmes et est relativement bien réparti sur l'ensemble de la France (Fig. 2). Certains cours d'eau ont été échantillonnés de manière particulièrement intensive (Rhône et Meuse en particulier), dans le but de conforter la fiabilité des résultats et d'apprécier les distances de détection.

Notre base de données compile plus de 300 sites d'échantillonnage fin 2020 (Fig. 2).

Comparaison inventaires traditionnels *vs* analyse de l'ADNe

La comparaison entre les méthodes traditionnelles d'inventaire et l'analyse d'échantillons d'ADNe a été conduite à plusieurs échelles.

Pour la France entière, nous avons comparé les résultats de notre échantillonnage à la base de données nationale de l'Inventaire national du Patrimoine naturel (INPN), sans limite de temps, de manière à s'affranchir du biais de répartition lié à la régression importante qu'ont subi les Bivalves dulçaquicoles au cours du siècle dernier. Les quelques 27 000 données saisies sur la plateforme de l'INPN ont permis de comparer les

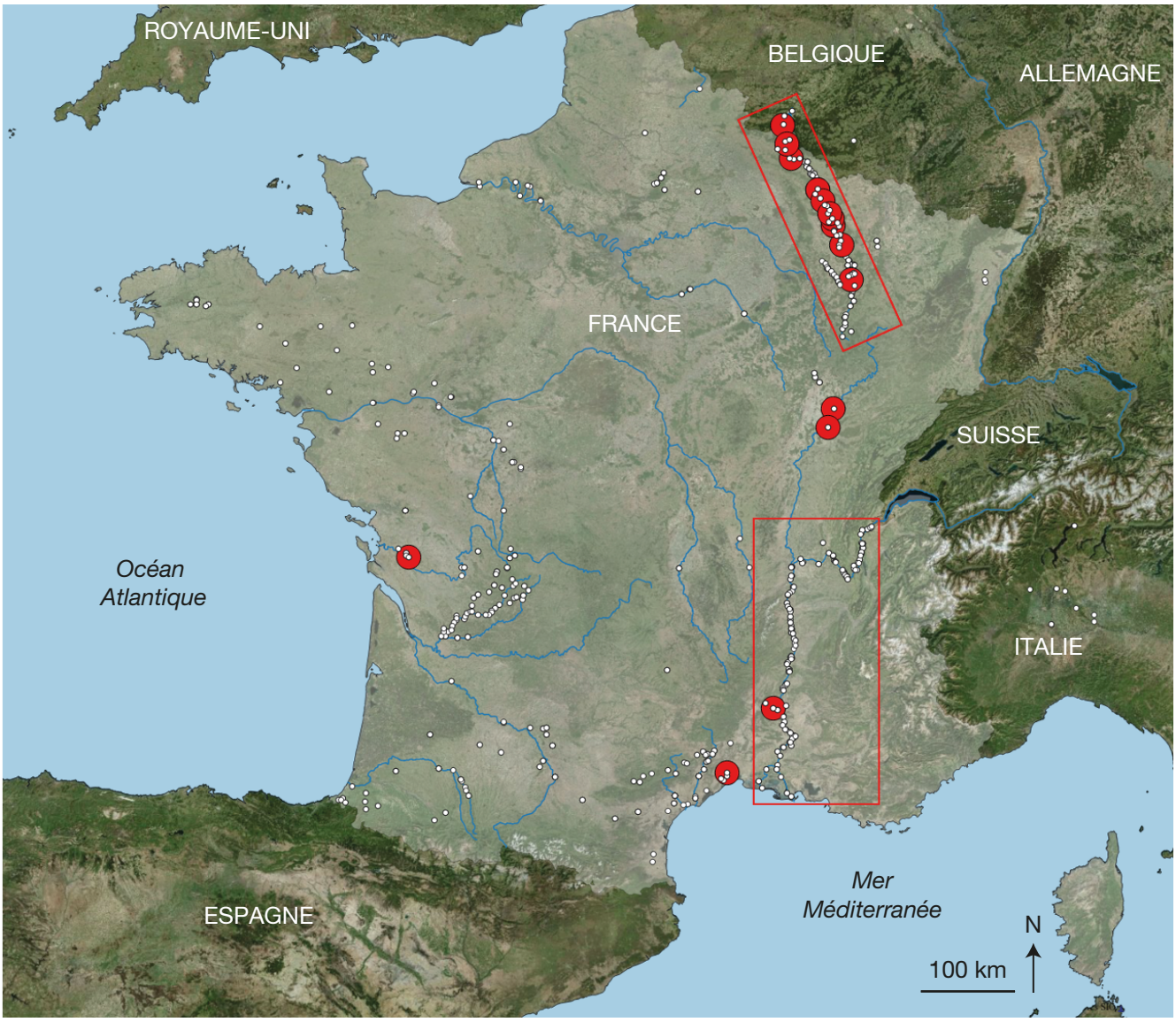

Fig. 2. — Localisation des stations d'échantillonnage d'ADNe entre 2015 et 2020 (○), des grands cours d'eau (Meuse et Rhône) où l'on a comparé les données disponibles avec les analyses ADNe (▭) et des stations d'inventaires ponctuels, menés de manière traditionnelle, qui ont été comparés aux analyses ADNe (●).

résultats obtenus par ADNe aux aires de répartition connues pour toutes les espèces (voir Prié 2017 pour les cartes de répartition par espèce).

À l'échelle des grands cours d'eau, nous nous basons sur deux campagnes d'échantillonnage d'ADNe réalisées sur le Rhône, avec 65 points d'échantillonnage sur 575 km de linéaire, et sur la Meuse, avec 52 points d'échantillonnage sur 480 km de linéaire (Fig. 2). Les données obtenues ont été également comparées avec la base de données de l'INPN, qui inclut un inventaire des Naïades réalisé par Biotope en 2009 sur la Meuse, impliquant trois opérateurs et des transects en plongée hyperbare sur 23 sites, ainsi que les données de l'inventaire des Sphaeriidae de Mouthon & Kuiper (1987). Sur le Rhône en revanche aucun inventaire spécifique n'est disponible et les données de comparaison ne concernent que des données issues des réseaux naturalistes, d'études ponctuelles ainsi que les données issues de l'inventaire de Mouthon & Kuiper (1987) pour les Sphaeriidae.

Enfin, des inventaires ponctuels visant quelques centaines de mètres de cours d'eau, réalisés en utilisant des méthodes traditionnelles (observation directe, dragage, tamisage de sédiment, exploitation des laisses de crues) ont été comparés aux résultats de l'analyse de l'ADNe à proximité immédiate (moins de 10 km à l'aval). Ces inventaires traditionnels mêlent généralement les données de coquilles et d'individus observés vivants. Nous avons sélectionné uniquement des inventaires pour lesquels :

– nous avions le détail de l'observation (individu vivant, coquille ou coquille subfossile) ;

– l'inventaire avait été réalisé de manière intensive, impliquant soit une équipe de plusieurs malacologues, soit des prospections

de terrains réitérées sur plusieurs années, et toujours au moins une prospection en plongée hyperbare ;

– les analyses ADNe ont été réalisées sur site ou à moins de 10 km à l'aval. Quinze sites ont ainsi pu être étudiés pour la comparaison ADNe / inventaires traditionnels.

Dix sites concernent la Meuse, où des inventaires ciblant les Mollusques ont été réalisés par le bureau d'études Biotope dans le cadre d'une étude d'impact concernant la rénovation des barrages à aiguilles. Ces inventaires ont impliqué quatre malacologues, dont deux plongeurs. Les prospections ont été réalisées en berge, en waders sur les radiers et les zones peu profondes et en plongée hyperbare (transects berge à berge réalisés par les deux plongeurs malacologues). Le temps passé sur chaque site est de deux à trois heures de prospections de terrain. Ces prospections visant en priorité les espèces protégées (Mulette épaisse), elles se sont limitées pour l'essentiel à la recherche des Naïades. Toutefois, sur deux de ces sites, un inventaire plus complet intégrant les Gastéropodes et les Sphaeriidae a également été réalisé. Deux autres sites concernent la Saône, qui a été prospectée par une équipe de malacologues incluant quatre plongeurs hyperbare et deux personnes à pied pour les zones moins profondes, à la recherche de la Grande Mulette et de la Mulette épaisse. Ces prospections visaient essentiellement les Naïades et nos données ne concernent que les grandes espèces, excluant les Sphaeriidae. Sur chaque site, le temps passé en prospections est d'environ une heure. Enfin, le Lez (à Montpellier), l'Ardèche et la Charente ont fait l'objet de prospections poussées sur plusieurs années. Concernant le Lez, nos données cumulent un inventaire basé sur les laisses de crues et visant les micro-mollusques (Prié 2003), des inventaires naturalistes incluant de la plongée s'échelonnant entre 2005 et 2016, et une étude ciblant les espèces du genre *Vertigo* réalisée en 2016. Les données incluent donc tous les Bivalves, mais souffrent toutefois d'un manque d'expertise concernant les Sphaeriidae. Sur l'Ardèche, les données concernent deux études ciblant la Mulette épaisse et des observations naturalistes réalisées en plongée entre 2010 et 2016. Sur la Charente, il s'agit de prospections menées entre 2007 et 2016, en plongée, centrées sur l'étude de la Grande Mulette. Les données ne concernent donc que les grandes espèces et excluent les Sphaeriidae, pour l'Ardèche comme la Charente.

Pour la plupart de ces inventaires réalisés avec des méthodes traditionnelles, les équipes ciblaient principalement les Naïades (Unionida) et nous ne disposons pas d'éléments de comparaison aussi poussés pour les Sphaeriidae, pour lesquels seuls trois sites d'inventaire ont pu être comparés avec les analyses ADNe (le Lez en amont de la ville de Montpellier, Prié 2003 ; et deux sites à proximité des villages de Dieue-sur-Meuse et de Saint-Mihiel sur la Meuse, Biotope 2009). En revanche, sur la base des cartes de répartitions disponibles et de la connaissance générale sur l'écologie de ce groupe, nous avons pu confronter nos résultats d'échantillonnage ADNe aux connaissances disponibles aussi bien à l'échelle nationale que régionale (bassins versants du Rhône et de la Meuse, et stations d'inventaire ponctuelles).

RÉSULTATS

Base de référence

Notre base de référence couvre l'ensemble des taxons de la faune de France et comporte 189 haplotypes pour le gène 16S, dont environ un tiers provient de spécimens collectés en France (Prié & Puillandre 2014 ; Mouthon & Forcellini 2017 et 25 séquences produites dans le cadre de ce travail pour compléter la base de référence). Les amorces utilisées permettent *in silico* de détecter et de distinguer tous les taxons actuellement valides de la faune de France (Tableau 1), à l'exception des sous-espèces de Mulette méridionale et du complexe d'espèces de Corbicules pour lesquelles la plupart des haplotypes sont partagés entre les différentes espèces décrites de France. Un des haplotypes de la Corbicule striolée *Corbicula fluminalis* (O. F. Müller, 1774) diffère toutefois des autres espèces d'une seule paire de base sur le fragment que nous analysons.

Les tests réalisés *in situ* depuis 2015 visaient notamment à confirmer la fiabilité de la méthode pour détecter ces différents taxons sur le terrain. Nos échantillonnages ont permis de mettre en évidence *in situ* 41 espèces soit 95 % de la faune de France (Tableau 1). Les espèces qui n'ont pas encore été détectées sur le terrain sont la Moule d'Amérique *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad, 1831) en raison de l'absence de site d'échantillonnage en milieu saumâtre, la Pisidie arctique *Odhneripisidium conventus* (Clessin, 1877) en raison du manque d'échantillonnage dans les grands lacs de montagne, la Cyclade d'Amérique *Sphaerium transversum* (Say, 1829) et la Cyclade des fleuves *Sphaerium solidum* (Normand, 1844) en raison de leur grande rareté en France.

Protocoles d'échantillonnage

Sur tous les sites échantillonnés, nous avons pu collecter et extraire de l'ADNe en quantité suffisante pour réaliser les analyses *ADNe metabarcoding* pour les Bivalves, avec des valeurs oscillant entre quelques dizaines de lectures (en-dessous de dix lectures, les résultats ne sont pas validés) et plusieurs centaines de milliers de lectures (pour les Corbicules notamment). Les temps de pompage (et donc les quantités d'eau prélevées) varient d'un site à l'autre en raison du colmatage du filtre dans les rivières fortement turbides. Dans certains cas (ex. rivières à Mulette perlière), les temps de filtration dépassaient à peine les 10 minutes, soit une quantité d'eau estimée à deux fois 10 L. Il est probable dans ces conditions que le taux de détection soit plus faible ; l'ADNe étant un ADN rare il est alors plus aléatoirement récupéré dans l'échantillon.

Comparaison inventaires traditionnels / ADNe

À l'échelle de la France, nos résultats sont globalement cohérents avec les données disponibles et avec ce qui est connu des exigences écologiques des différentes espèces. Les différences observées sont discutées espèce par espèce ci-après.

Les analyses menées à large échelle sur le Rhône et la Meuse permettent également de révéler toutes les espèces connues sur ces deux fleuves et d'en ajouter quelques-unes (Annexe 1). Sur les 15 sites d'inventaire où nous avons pu comparer les données

TABLEAU 1. — Taxons de la Faune de France valides actuellement et détection *in silico* et/ou *in situ*. **(1)**, Taxons pour lesquels certains haplotypes sont partagés entre plusieurs espèces.

Bivalves de France		**Discriminable *in silico***	**Identifié *in situ***
Ordre Unionida Stoliczka, 1871	*Pseudunio auricularius* (Spengler, 1793)	1	1
Famille Margaritiferidae Haas, 1940	*Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758)	1	1
Famille Unionidae Rafinesque, 1820	*Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758)	1	1
	Anodonta cygnea (Linnaeus, 1758)	1	1
	Anodonta exulcerata Porro, 1838	1	1
	Pseudanodonta complanata (Rossmässler, 1835)	1	1
	Sinanodonta woodiana (I. Lea, 1834)	1	1
	Potomida littoralis (Cuvier, 1798)	1	1
	Unio c. crassus Philipsson, 1788	1	1
	Unio c. courtillieri Hattemann, 1859	1	1
	Unio mancus Lamarck, 1819	1	1
	Unio pictorum (Linnaeus, 1758)	1	1
	Unio tumidus Philipsson, 1788	1	1
Ordre Venerida J. E. Gray, 1854	*Corbicula fluminalis* (O. F. Müller, 1774)	(1)	1
Famille Cyrenidae J. E. Gray, 1840	*Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774)	1	1
	Corbicula leana Prime, 1867	0	0
Ordre Myida Stoliczka, 1870	*Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)	1	1
Famille Dreissenidae J. E. Gray, 1840	*Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897)	1	1
	Mytilopsis leucophaeata (Conrad, 1831)	1	0
Ordre Sphaeriida Lemer, Bieler & Giribet, 2019	*Euglesa casertana* (Poli, 1791)	1	1
Famille Sphaeriidae Deshayes, 1855 (1820)	*Euglesa compressa* (Prime, 1852)	1	1
	Euglesa globularis (Clessin, 1873)	1	1
	Euglesa henslowana (Sheppard, 1823)	(1)	1
	Euglesa hibernica (Westerlund, 1894)	1	1
	Euglesa lilljeborgii (Clessin, 1886)	1	1
	Euglesa milium (Held, 1836)	1	1
	Euglesa nitida (Jenyns, 1832)	(1)	1
	Euglesa obtusalis (Lamarck, 1818)	1	1
	Euglesa personata (Malm, 1855)	1	1
	Euglesa pseudosphaerium (J. Favre, 1927)	1	1
	Euglesa pulchella (Jenyns, 1832)	1	1
	Euglesa subtruncata (Malm, 1855)	(1)	1
	Euglesa supina (A. Schmidt, 1851)	(1)	1
	Odhneripisidium conventus (Clessin, 1877)	1	0
	Odhneripisidium moitessierianum (Paladilhe, 1866)	1	1
	Odhneripisidium tenuilineatum (Stelfox, 1918)	1	1
	Pisidium amnicum (O. F. Müller, 1774)	1	1
	Sphaerium corneum (Linnaeus, 1758)	(1)	1
	Sphaerium lacustre (O. F. Müller, 1774)	1	1
	Sphaerium nucleus (S. Studer, 1820)	(1)	1
	Sphaerium ovale (Férussac, 1807)	1	1
	Sphaerium rivicola (Lamarck, 1818)	1	1
	Sphaerium solidum (Normand, 1844)	1	1
	Sphaerium transversum (Say, 1829)	1	1

acquises par détection de l'ADNe aux données acquises par des méthodes d'inventaire traditionnelles, le nombre d'espèces détectées par analyse de l'ADNe était toujours supérieur ou égal à celui détecté par méthodes traditionnelles et toutes les espèces observées vivantes par méthodes traditionnelles étaient bien retrouvées dans les analyses ADNe (Fig. 3 ; Annexe 1).

Dans quelques cas, des espèces ont été observées sous la forme de coquilles uniquement et n'ont pas été détectées par analyse de l'ADNe. Nous supposons que dans ces cas, les espèces en question avaient disparu du site au moment du prélèvement d'ADNe, ou que, pour les petites espèces, les coquilles ont pu être drainées par le courant sur le site d'échantillonnage à partir de l'amont. Si l'on ne considère que les grandes espèces (à l'exclusion des Sphaeriidae) pour lesquelles les taux de détection par méthodes traditionnelles sont supposés être assez élevés, le taux de détection des espèces par analyse de l'ADNe est en moyenne 1,3 fois supérieur au taux de détection par méthodes traditionnelles. Si l'on ne considère que les spécimens observés vivants lors d'inventaires traditionnels, le taux de détection par analyse de l'ADNe est 2,1 fois supérieur.

Pour ce qui concerne les Sphaeriidae, l'analyse de l'ADNe sur l'ensemble du Rhône et l'ensemble de la Meuse a permis de détecter respectivement 1,11 et 1,17 fois plus d'espèces que les données disponibles. Sur les trois sites d'inventaires ponctuels pour lesquels nous disposons de données concernant les Sphaeriidae (Lez, Dieue-sur-Meuse et Saint-Mihiel), le nombre d'espèces détectées par ADNe est de 1,6 (Lez) à 6 (Saint-Mihiel) fois supérieur au nombre d'espèces détectées lors des inventaires traditionnels.

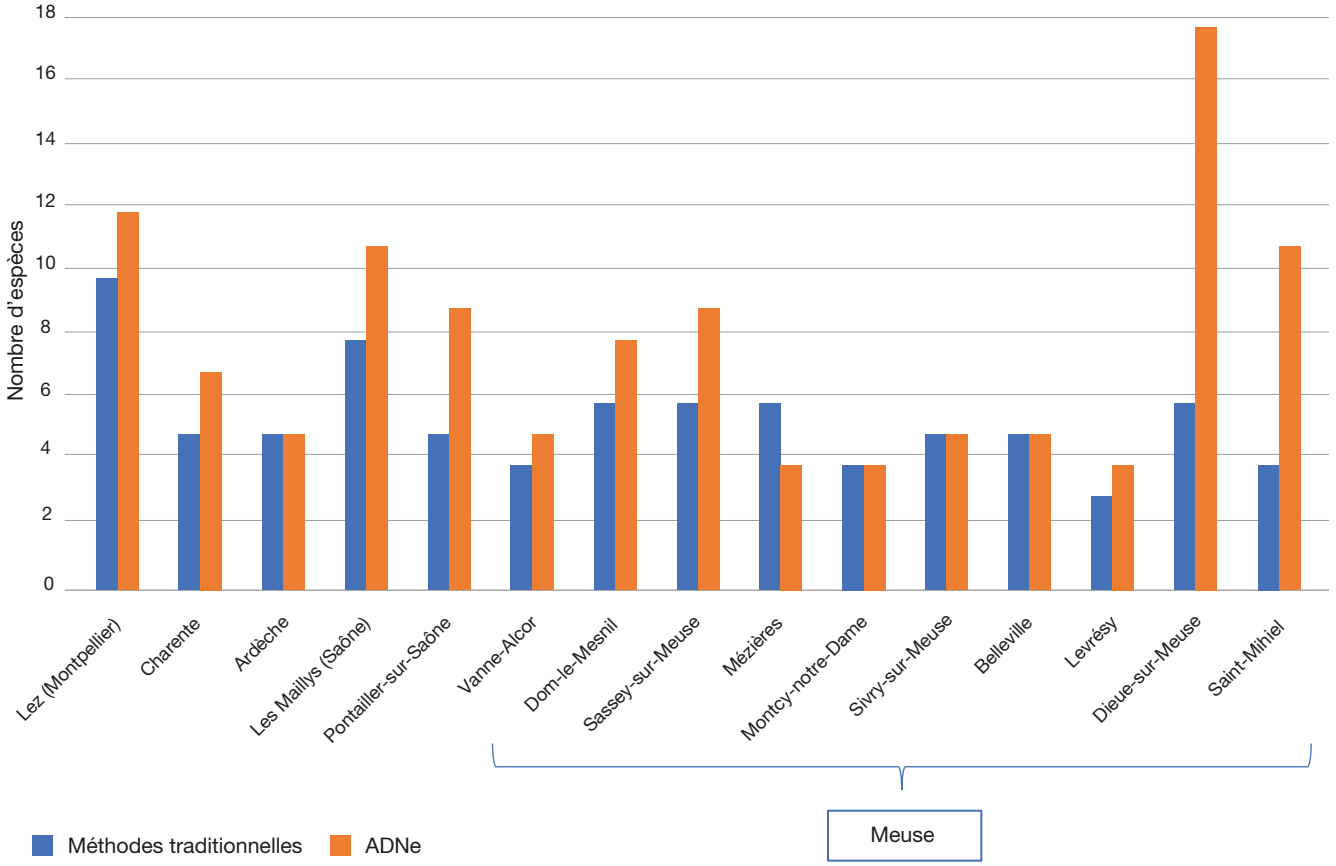

Fig. 3. — Comparaison en termes de richesse spécifique des résultats des inventaires menés par méthodes traditionnelles (en bleu) et par analyse de l'ADNe (en orange) sur le même secteur.

Résultats commentés par espèce

Espèces patrimoniales des écosystèmes de l'aval

La Cyclade des fleuves *Sphaerium solidum* (Normand, 1844)

La Cyclade des fleuves est une espèce typique de l'aval des grands cours d'eau, vivant en profondeur dans des eaux bien oxygénées, préférentiellement sur substrat sableux. Bien que l'espèce ait été décrite du nord de la France (dans l'Escaut à Valenciennes), elle semble avoir quasiment disparu de notre territoire. Elle n'a été détectée qu'à deux reprises par analyse de l'ADNe (Fig. 4) sur les quelques 250 sites échantillonnés à l'intérieur de son aire de répartition supposée (aire inférée d'après les données disponibles) et présentant *a priori* des biotopes favorables (écosystèmes de l'aval sur substrat calcaire, sablo-vaseux). Si la base de données nationale sur les Bivalves comporte 28 stations en France, nous n'avons que quatre données relativement récentes d'individus vivant (Choisy-au-Bac dans l'Aisne en 2009, Biotope [2009], deux stations dans la Seine aval en 2006, Bij de Vaate *et al.* [2007] et un individu juvénile observé dans un bras de la Loire en 2020). Les coquilles de *S. solidum* sont, comme son nom l'indique, très épaisses et peuvent se conserver longtemps après la mort des individus. Les données disponibles, basées pour l'essentiel sur l'observation de coquilles, donnent donc potentiellement une image obsolète de la réalité. Cette espèce est menacée sur toute son aire de répartition. Welter-Schultes (2012) la considère « presque disparue de l'Union Européenne ».

La Grande Cyclade *Sphaerium rivicola* (Lamarck, 1818)

La Grande Cyclade est également une espèce caractéristique de l'aval des grands cours d'eau, sans doute moins exigeante en termes de substrat que la Cyclade des fleuves, préférant les substrats plus vaseux. Elle semble aussi un peu moins menacée, mais sa situation au regard de l'échantillonnage ADNe sur l'ensemble de la France reste alarmante. Les bases de données nationales (Fig. 5) comprennent près d'une centaine de stations réparties sur la plupart des grands bassins versants français (Adour et petits fleuves côtiers exceptés). Néanmoins, très peu de populations vivantes sont connues actuellement. Au moins une population subsiste à l'aval de la Loire, présence confirmée par les analyses ADNe sur ce secteur. Un seul site révélé par ADNe sur le Vieux Rhône indique que l'espèce y est encore présente, mais vraisemblablement en très mauvais état de conservation puisqu'elle n'a été détectée que sur un seul site et n'est pas connue par ailleurs. Des individus vivants ont été collectés récemment sur la Meuse, données confirmées par

Fig. 4. — Répartition de la Cyclade des fleuves *Sphaerium solidum* (Normand, 1844) en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données disponibles pour la Cyclade des fleuves ; ●, données de Cyclade des fleuves observées vivantes depuis 2006 ; ★, données issues d'analyses ADNe. Il n'existe actuellement que deux données ADNe attestant la présence en France de cette espèce.

l'analyse ADNe. Il existe enfin plusieurs données d'individus vivants sur le bassin de la Seine. Les échantillonnages ADNe n'ont permis de détecter l'espèce que dans l'Oise, bien que des prélèvements aient été réalisés sur l'Aisne dans des secteurs où l'espèce avait été observée vivante. Toutefois, les données les plus récentes dans ces secteurs datent d'une dizaine d'année et il est possible que l'espèce ait disparu de ces sites depuis.

La Pisidie des marais
Euglesa pseudosphaerium (J. Favre, 1927)

La Pisidie des marais est une espèce de plaine inféodée aux zones marécageuses stables, connectées au réseau hydrographique, dans des eaux claires et propres, sur substrat calcaire. Elle est intolérante à la pollution. Welter-Schultes (2012) lui donne une large aire de répartition dans les trois quarts nord de la France, bien qu'elle soit rare et localisée partout. Mouthon & Kuiper (1987) ne la documentent que de quatre sites de la vallée du Rhône et d'une donnée historique (coll. Moquin-Tandon) près de Toulouse. Malgré un échantillonnage important, nous ne l'avons pas détectée dans la vallée du Rhône par analyse de l'ADNe. En revanche, elle a été détectée une fois dans le Son, affluent de la Charente, et une fois dans le Canal de Nantes à Brest, en Ille-et-Vilaine. Cette espèce aux exigences écologiques particulières, puisqu'elle requiert des eaux propres, non polluées et stables, conditions de plus en plus rares en plaine compte-tenu des usages agricoles et de la pression sur la ressource en eau, en particulier en été,

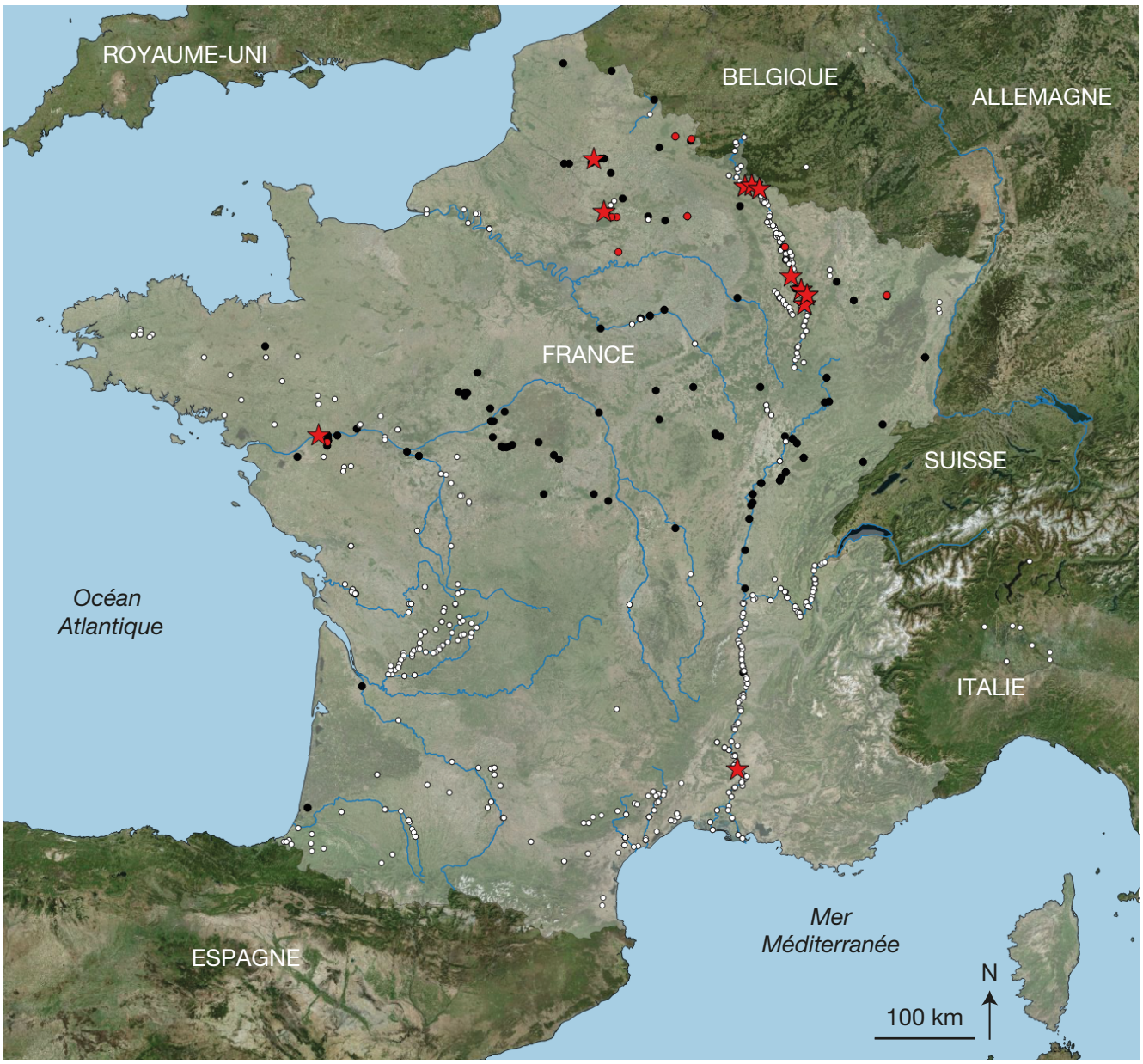

Fig. 5. — Répartition de la Grande Cyclade *Sphaerium rivicola* (Lamarck, 1818) en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données disponibles pour la Grande Cyclade ; ●, données de Grande Cyclade observées vivantes depuis 2006 ; ★, données issues de l'analyse de l'ADNe.

est considérée comme « en danger critique d'extinction » en Allemagne et en Autriche et « en danger » en Suisse. Elle semble être également très rare et très menacée en France.

L'Anodonte comprimée *Pseudanodonta complanata* (Rossmässler, 1835)

L'Anodonte comprimée vit préférentiellement dans les grands cours d'eau, sur substrat vaseux à sablo-vaseux où elle s'enfonce en profondeur, mais elle peut aussi être trouvée dans des cours d'eau de moindre importance (ex. l'Helpe majeure dans le bassin de la Meuse) et/ou avec un substrat caillouteux (ex. la rivière Dobra en Croatie). Elle avait historiquement une large répartition en France, comme en témoignent les collections muséologiques (en particulier celles du MHNH, données inédites), où trois sous-espèces étaient reconnues (Falkner *et al.* 2002) : *P. c. ligerica* Bourguignat, 1880 dans les bassins de la Seine et de la Loire ; *P. c. elongata* (Holandre, 1836) dans le bassin de la Moselle, *P. c. dorsuosa* (Drouët, 1881) dans le bassin de la Saône et *P. c. grateloupeana* (Gassies, 1849) dans le bassin de la Garonne. Un peu moins d'une centaine de données sont archivées dans les bases de données nationales (Fig. 6). Parmi celles-ci, 46 concernent des individus observés vivants récemment. Ces données attestent de la présence de l'espèce dans les bassins versants de la Seine (une quinzaine de stations), de la Somme (une seule station), de la Meuse (deux stations), de la Moselle (une seule station) et du Rhin (une seule station). Les données ADNe confirment la présence de

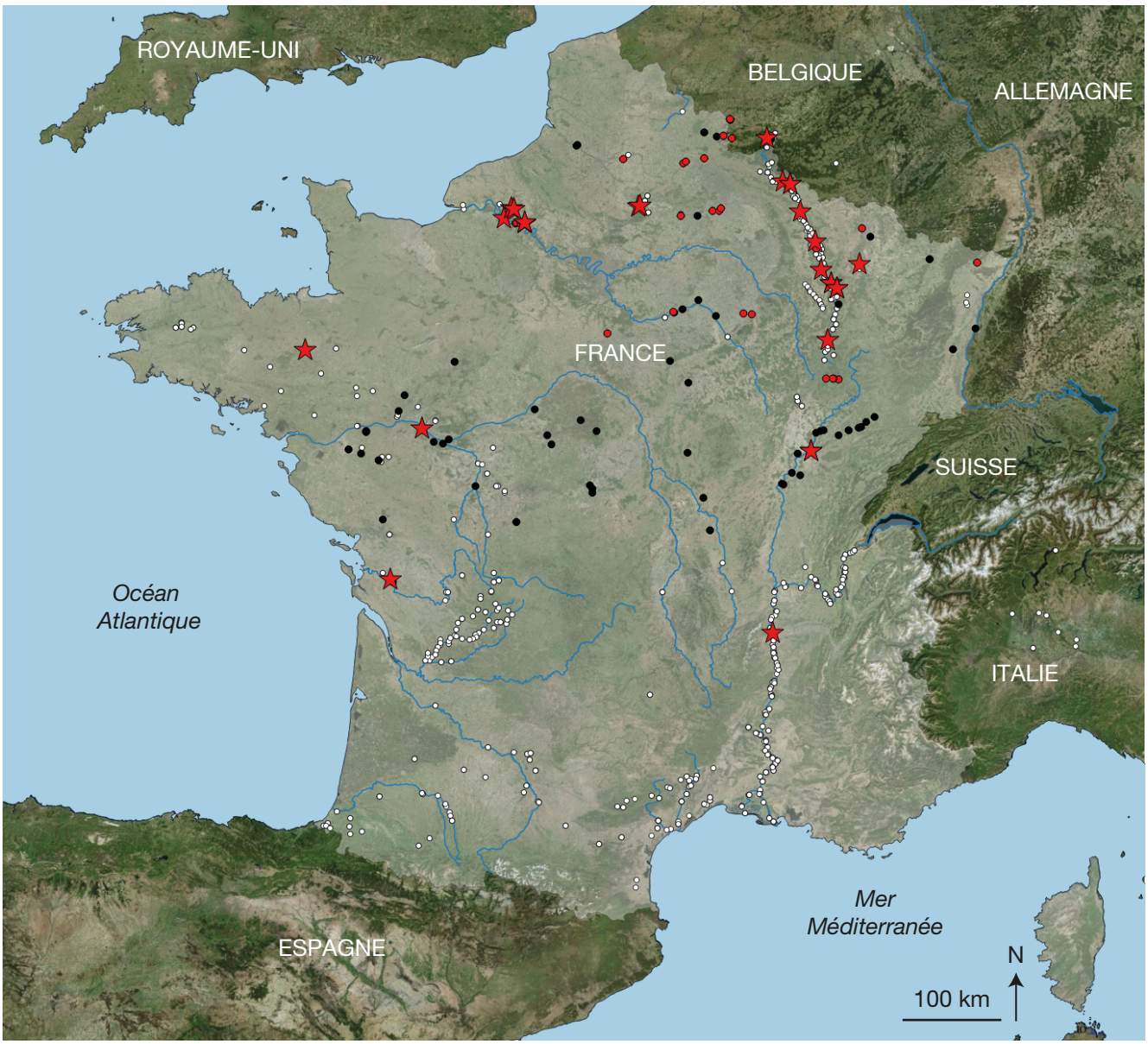

Fig. 6. — Répartition de l'Anodonte comprimée *Pseudanodonta complanata* (Rossmässler, 1835) en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données disponibles pour l'Anodonte comprimée ; ●, données d'Anodonte comprimée observées vivantes depuis 2006 ; ★, données issues de l'analyse de l'ADNe.

l'espèce dans la Seine (une seule station sur les 17 étudiées), de la Meuse (neuf stations sur les 52 stations analysées), de la Moselle (une seule station étudiée), mais également de la Saône (une station sur les deux étudiées), où elle avait été notée par Mouthon, ainsi qu'à l'aval du Rhône (une seule station sur les 65 analysées), de la Charente (une seule station sur les sept analysées) et de la Loire (une seule station sur les neuf potentiellement favorables dans le bassin de la Loire). Sur les 56 stations analysées dans des sites potentiellement favorables (écosystèmes de l'aval sur substrat calcaire) du bassin de la Garonne, aucune n'a permis de mettre l'espèce en évidence. Si l'espèce semble encore bien présente dans le quart nord-est de la France, au moins dans les bassins versants de la Seine et de la Meuse (où elle reste néanmoins peu abondante), elle semble avoir totalement disparu du bassin de la Garonne et se maintenir de manière extrêmement ponctuelle en Bretagne, dans les bassins de la Charente (où l'on trouve encore des coquilles attestant d'une répartition autrefois plus étendue), de la Loire et du Rhône. L'unique donnée dans le Rhône est remarquable, aucune donnée historique n'étant connue sur ce secteur.

La Grande Mulette *Pseudunio auricularius* (Spengler, 1793)

La Grande Mulette, espèce emblématique de l'aval des grandes rivières, a été très étudiée et activement recherchée au cours des dix dernières années (Prié *et al.* 2018). Le déploiement de l'ADNe n'a pas permis de mettre en évidence de nouvelles populations, ce qui semble indiquer que l'aire de répartition

de l'espèce est désormais bien connue, et notamment qu'elle semblerait bien avoir disparu des stations connues dans le bassin versant de la Seine, ainsi que de la Garonne, du Tarn et de l'Aveyron. Néanmoins, deux tests effectués sur des stations où l'espèce est très rare (amont de la Creuse, amont du Luy) montrent que l'analyse de l'ADNe ne permet pas toujours de la mettre en évidence quand les densités d'individus sont très faibles. *A contrario*, les analyses ont permis de la retrouver sur la Save en 2019, où un seul individu vivant avait été observé en 2010. Suite à ces résultats, une mission menée en 2020 a permis de retrouver quatre individus vivants quelques kilomètres en amont du point de prélèvement.

La Mulette épaisse
Unio crassus Philipsson, 1788

La Mulette épaisse est largement répandue dans les bassins de la Loire, de la Saône, de la Seine et d'une manière générale dans le quart nord-est de la France. Bien que ses populations aient largement déclinées au cours du siècle dernier, il existe de nombreuses données récentes témoignant de la survie de populations vivantes sur l'ensemble de son aire de répartition. En revanche, les données historiques à l'aval du bassin versant du Rhône n'ont pas été réactualisées malgré des recherches intensives et l'espèce n'était pas connue au sud du bassin versant de la Loire sur la façade atlantique (à l'exception de quelques spécimens en collection qui proviendraient de la Dordogne, données inédites). Les données collectées par analyse de l'ADNe (Fig. 7) confirment la présence de l'espèce un peu partout dans le quart nord-est de son aire de répartition, mais ont surtout permis de révéler sa présence sur plusieurs secteurs du Rhône, et notamment à l'aval où elle n'était pas connue hormis de quelques données historiques ponctuelles, et à l'amont des bassins versants de la Dordogne et de la Charente, où des prospections de terrain ont permis de confirmer sa présence par l'observation de quelques individus vivants en 2018 et 2019. Ces données nouvelles pourraient justifier la mise en place de mesures de conservation (réseau Natura 2000 notamment) sur de nouveaux tronçons de rivière.

Espèces mal connues

La Cyclade cerise
Sphaerium nucleus (S. Studer, 1820)

La Cyclade cerise vit dans les eaux stagnantes riches en végétation. Bien que les formes typiques soient facilement identifiables, il est possible que certains phénotypes de cette espèce soient peu discernables morphologiquement de la Cyclade commune *S. corneum* et qu'elle n'ait pas été identifiée par les naturalistes. Elle n'est connue actuellement que de quelques sites dans le quart nord-est de la France et en Normandie dans le Cotentin. Les données apportées par l'analyse de l'ADNe (Fig. 8) suggèrent une plus large répartition dans la moitié est de la France (Rhône, Seine, Meuse), qui inclut des zones courantes (bien que toujours lentiques) type rivières, canaux.

La Cyclade ovale
Sphaerium ovale (Férussac, 1807)

La Cyclade ovale est une espèce énigmatique, située morphologiquement et génétiquement entre la Cyclade commune et la Cyclade cerise. Un spécimen correspondant à la description de cette espèce (basée sur la forme des néphridies, l'espacement des pores sur la face interne de la valve et dans une moindre mesure sur le profil des valves) a été collectée en Normandie par B. Lecaplain (com. pers.). Ce spécimen a été analysé génétiquement (gènes 16S et ITS suivant les phylogénies de Lee & Ó Foighil [2003] et Bespalaya *et al.* [2015]) et les résultats semblent confirmer l'existence d'un taxon distinct, situé entre *S. corneum* et *S. nucleus*. Sur la base de cet unique haplotype, que nous avons depuis retrouvé sur des spécimens du bassin de la Seine, nous proposons une aire de répartition pour la France (Fig. 9) basée sur les résultats de l'analyse de l'ADNe. Ces résultats doivent toutefois être confirmés par des études taxonomiques et systématiques en cours.

La Pisidie jolie
Euglesa pulchella (Jenyns, 1832)

Les résultats présentés ici se basent sur l'unique séquence produite par Mouthon & Forcellini (2017). Cette séquence est très proche des différents haplotypes de la Pisidie chiendent *Euglesa subtruncata* (Malm, 1855), dont elle diffère seulement par quelques paires de bases sur le fragment du gène 16S que nous amplifions. Sur la base de cette unique séquence, nos résultats (Fig. 10) suggèrent une aire de répartition plus importante en France que celle donnée par Mouthon (2018). La fiabilité de nos résultats est corroborée par le fait que nous retrouvons bien l'espèce dans les bassins du Rhône amont (où Mouthon [2018] dit l'avoir observée jusqu'en 2012 à l'amont du Doubs, rivière Drugeon), de la Meuse et de la Seine (où elle est connue de fossiles selon Mouthon [2018]) et parce que les analyses de l'ADNe n'ajoutent que peu de données nouvelles. S'il s'agissait d'un haplotype d'*E. subtruncata*, on devrait le retrouver un peu partout, cette dernière espèce étant plus répandue et très commune. Il reste toutefois possible que nos résultats sur cette espèce soient remis en cause à l'avenir par des études plus approfondies sur les différents haplotypes de *E. subtrunctata* et *E. pulchella*.

La Pisidie jolie resterait, malgré l'apport des données d'ADNe, rare et localisée en France. Elle semble par exemple aujourd'hui complètement absente de la façade atlantique. Des recherches sur ses exigences écologiques pourraient permettre de mieux définir les raisons de cette rareté et de proposer des mesures de gestion qui lui soient favorables.

Espèces introduites et envahissantes

L'Anodonte chinoise
Sinanodonta woodiana (I. Lea, 1834)

L'Anodonte chinoise est introduite en France depuis 2007 et s'est rapidement dispersée dans le sud de la France et le bassin du Rhône (Adam 2010). Les données collectées

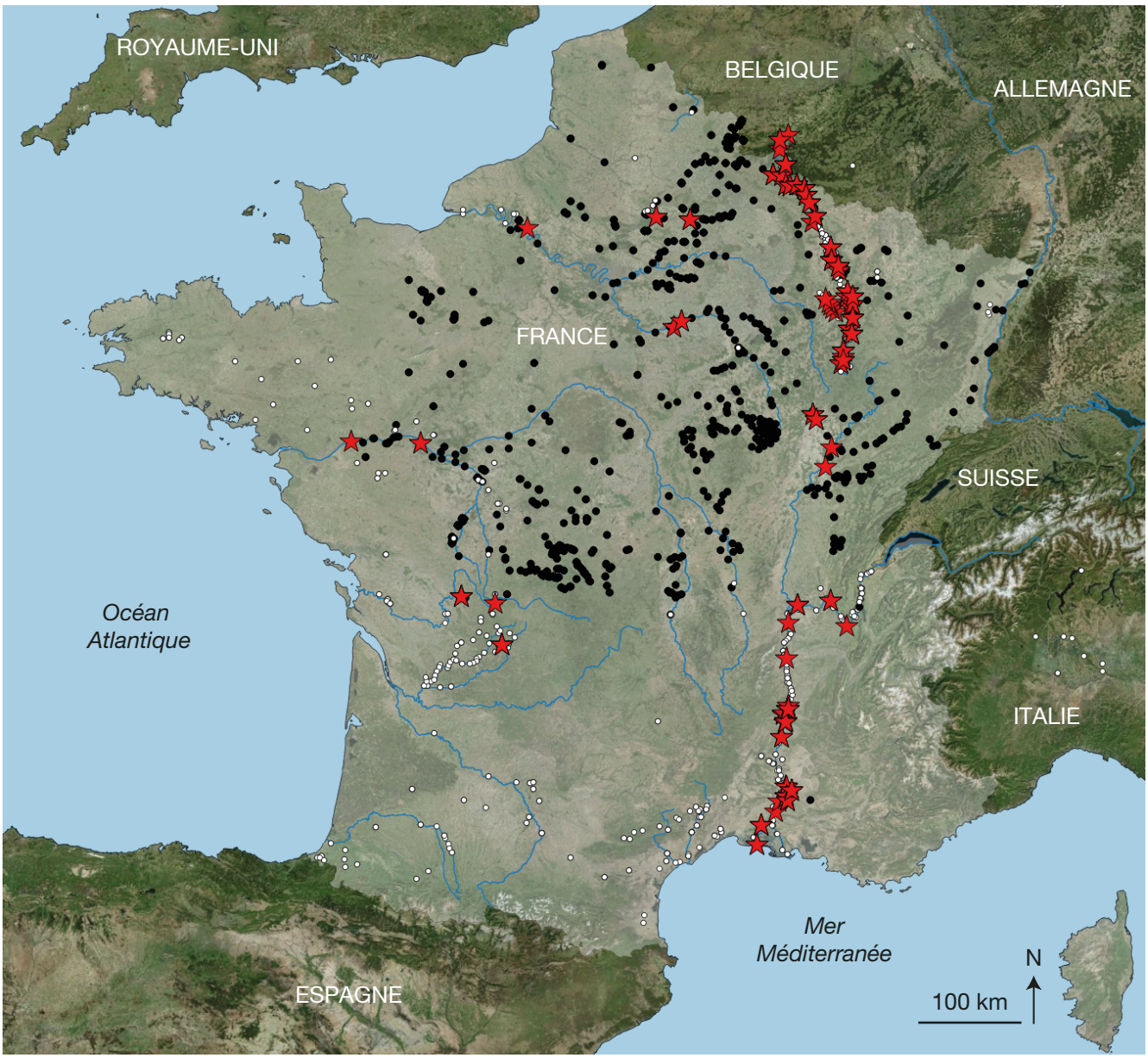

Fig. 7. — Répartition de la Mulette épaisse *Unio crassus* Philipsson, 1788 en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données disponibles pour la Mulette épaisse ; ★, données issues de l'analyse de l'ADNe. Les nombreuses stations d'observation récente de la Mulette épaisse vivante ne sont pas figurée.

par analyse de l'ADNe confirment l'expansion de cette espèce aisément identifiable sur le terrain. Elles permettent d'ajouter quelques stations qui n'étaient pas connues précédemment : l'aval du Tarn, ce qui confirme la rapide colonisation du bassin de la Garonne, la Sèvre niortaise, d'où elle a été observée depuis (Bertrand 2018), la Saône, où elle n'avait pas été détectée lors des plongées réalisées en 2016 pour rechercher la Grande Mulette, et la Moselle (Fig. 11). En revanche, les analyses ADNe montrent qu'elle est vraisemblablement encore absente des bassins de la Meuse et de la Dordogne, où la pression d'observation est très importante, et également des bassins de l'Adour, de la Seine (même si elle a été observée en 2019 dans l'un des lacs réservoir en communication avec l'Aube) et de la Charente. Pour tous ces bassins, il serait important de mettre en œuvre aujourd'hui des mesures de protection, tant qu'il est encore temps, pour éviter la colonisation de l'Anodonte chinoise. On sait en effet aujourd'hui que cette espèce présente une menace importante pour les espèces autochtones (Donrovich *et al.* 2017 ; Huber & Geist 2019). Elle colonise les hydrosystèmes adjacents de proche en proche en particulier *via* les canaux, mais peut aussi être introduite ponctuellement par le transport de poissons, comme cela a vraisemblablement été le cas dans des étangs du nord-est de la France ou de Loire-Atlantique. Les bassins versants de la Charente et de l'Adour par exemple, ne sont pas connectés aux autres grands hydrosystèmes par des canaux et pourraient être préservés de l'expansion de

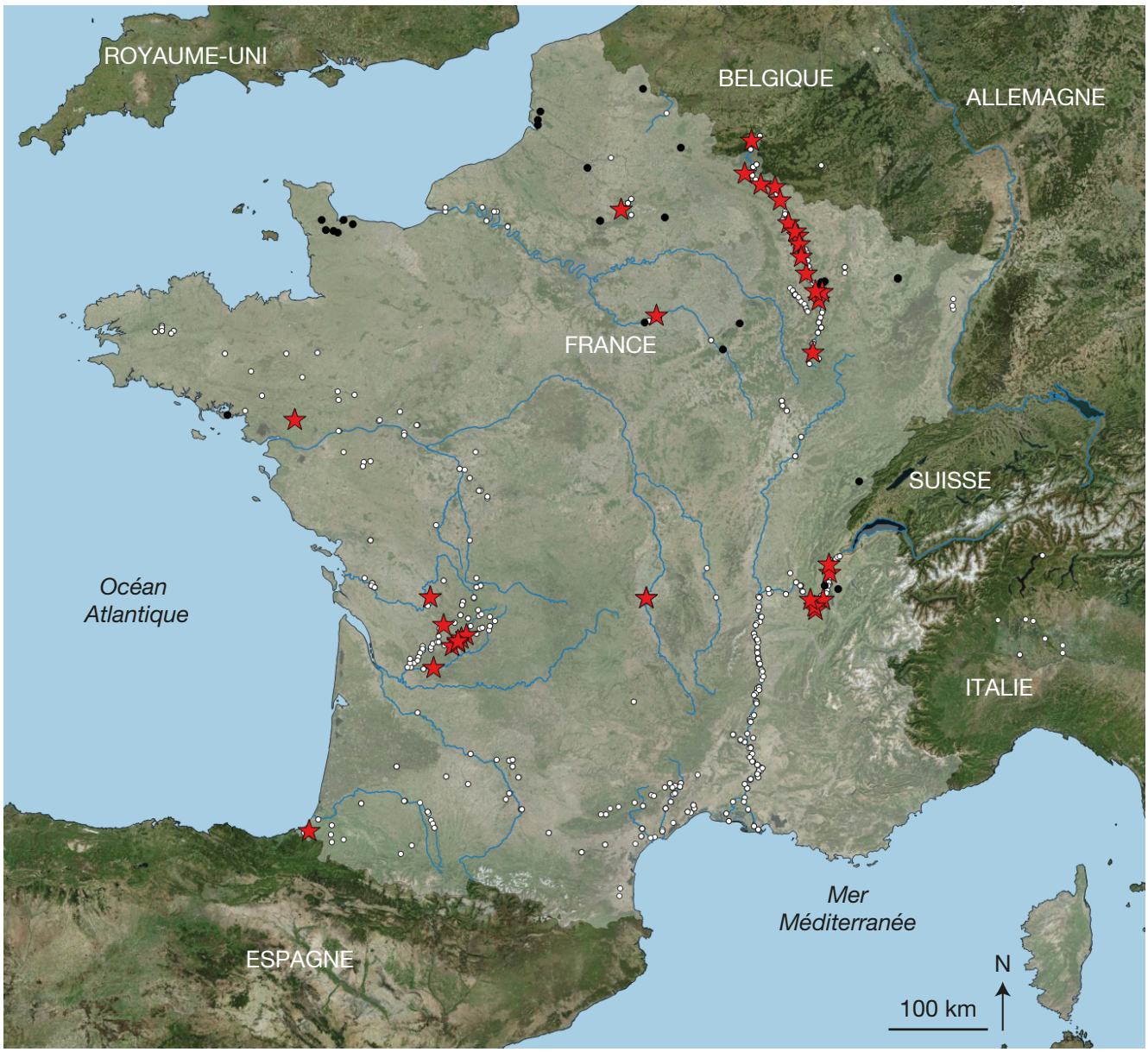

Fig. 8. — Répartition de la Cyclade cerise *Sphaerium nucleus* (S. Studer, 1820) en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données disponibles pour la Cyclade cerise ; ★, données issues de l'analyse de l'ADNe.

l'Anodonte chinoise si les transports de poissons dans ces bassins versants pouvaient être contrôlés.

La Moule quagga
Dreissena rostriformis bugensis (Andrusov, 1897)

Cette espèce n'est connue en France que depuis 2011, date à laquelle elle a été mise en évidence dans les bassins de la Meuse et de la Moselle (Bij de Vaate & Beisel 2011), puis du Rhin (Wagner 2014). Une actualisation en 2017 (Prié & Fruget 2017) montrait son expansion dans le bassin du Rhône et de l'Escaut. Depuis, elle a été observée en 2019 dans l'Aa (Hauts-de-France, vers Saint-Omer). Les données ADNe disponibles aujourd'hui montrent qu'elle a colonisé presque tout le linéaire du Rhône et de la Meuse, comme on pouvait s'y attendre, mais également qu'elle progresse vers les fleuves côtiers méditerranéens (le Lez à Montpellier, alimenté par le canal du Rhône à Sète) et qu'elle est déjà présente dans la Seine (Fig. 12).

La Pisidie d'Amérique
Euglesa compressa (Prime, 1852)

Cette espèce a été décrite formellement en France très récemment (Mouthon & Forcellini 2017), bien que les premières données sur sa répartition datent de 1989 (Mouthon & Taïr-Abbaci 2012). L'analyse de l'ADNe a permis d'étendre son aire de répartition actuelle, avec des données nouvelles dans la Meuse, l'amont de la Seine, la Saône, l'Ardèche, tout l'aval du Rhône et jusqu'à l'aval de la Loire (Fig. 13).

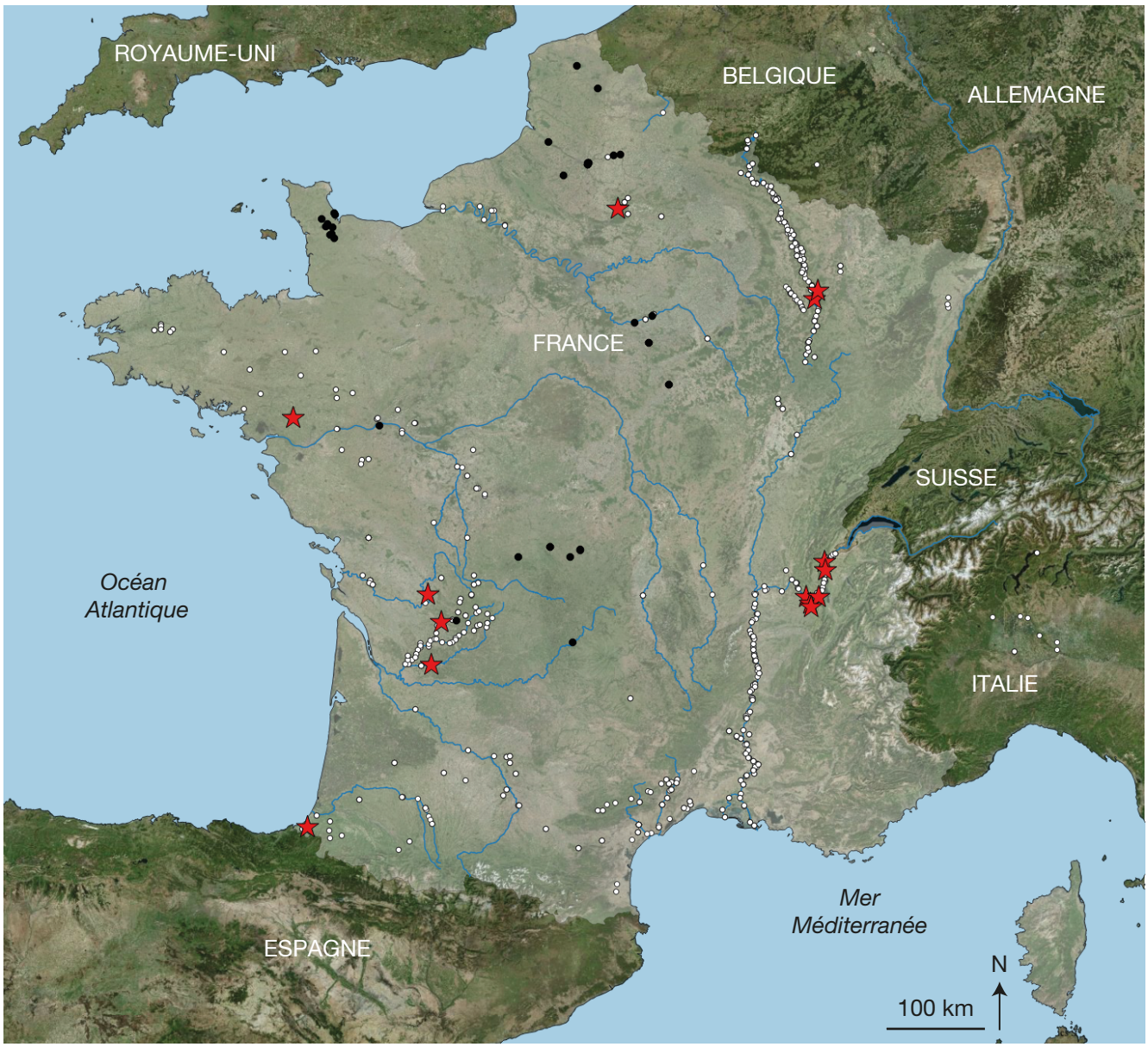

Fig. 9. — Répartition dela Cyclade ovale *Sphaerium ovale* (Férussac, 1807) en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données disponibles pour la Cyclade ovale ; ★, données issues de l'analyse de l'ADNe.

DISCUSSION

Comparaison inventaires traditionnels / ADNe

L'analyse de l'ADNe a permis de bien détecter les espèces déjà connues sur les sites échantillonnés. Quand une espèce a été détectée par inventaire traditionnel mais pas par ADNe, les données d'inventaire ne concernaient que des coquilles. Nous émettons l'hypothèse que l'espèce ne vivait plus sur le site au moment de l'échantillonnage ADNe.

L'analyse de l'ADNe a donc prouvé son efficacité pour la présence / absence comparé aux inventaires utilisant des méthodes traditionnelles. Bien que son coût (environ 1000 euros par site) puisse paraître prohibitif, il doit être mis en perspective avec celui, beaucoup plus élevé, d'une équipe de malacologues professionnels, incluant de la plongée hyperbare (pour les Naïades) et du tri de sédiment (pour les Sphaeriidae), donc du temps d'expert. Sans parler du risque et du coût humain en cas d'accident pour ce qui concerne la plongée.

Espèces de la faune de France : répartition et enjeux de conservation

Notre échantillonnage couvre une grande variété de milieux en France métropolitaine et a permis de détecter *in situ* plus de 95 % de la faune de France. Il est encore incomplet pour les lacs d'altitude et les milieux saumâtres. Il est en revanche particulièrement intense sur les écosystèmes de l'aval, qui sont souvent sous-prospectés par les inventaires traditionnels en raison de leur difficulté d'accès.

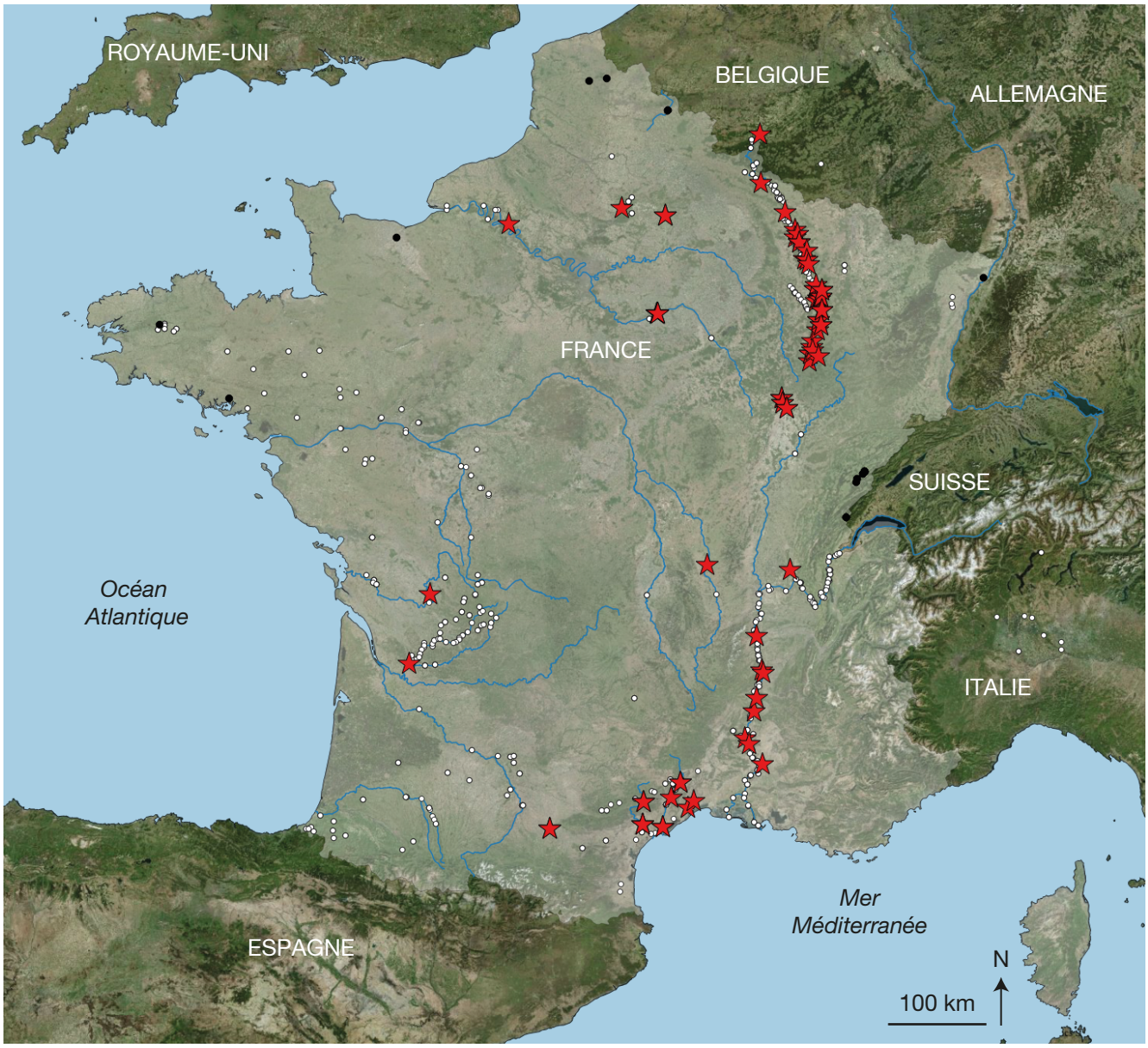

Fig. 10. — Répartition de la Pisidie jolie *Euglesa pulchella* (Jenyns, 1832) en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données disponibles pour la Pisidie jolie suivant Mouthon (2018) qui a revu les données disponibles à partir des coquilles gardées en collections par leurs auteurs (ces données incluent des données fossiles, voir Mouthon [2018] pour plus de détail) ; ★, données issues de l'analyse de l'ADNe.

Pour la plupart des espèces, les données obtenues par ADNe sont conformes à la répartition connue par ailleurs. Plusieurs exceptions existent cependant. La présence de la Mulette épaisse est par exemple attestée à l'aval du Rhône par plusieurs analyses. Sur l'amont du bassin de la Charente, sa présence a été confirmée par des observations de terrain. L'ADNe apporte également des données nouvelles pour des espèces mal connues comme la Cyclade cerise, la Cyclade ovale et la Pisidie jolie. Nos résultats mettent enfin l'accent sur la progression de plusieurs espèces envahissantes, qui ont été détectées au-delà de leurs aires de répartition connues. Dans tous les cas, les données de répartition obtenues avec l'analyse de l'ADNe pour ces espèces introduites envahissantes sont conformes à ce que l'on pouvait attendre en considérant les voies de colonisation (linéaires de cours d'eau et canaux).

Biais actuels et apports de l'analyse de l'ADNe

Pour plusieurs espèces, en particulier celles de l'aval des cours d'eau, les données disponibles (INPN et inventaires par méthodes traditionnelles) illustrent une répartition assez large en France, alors que les données obtenues par analyse de l'ADNe donnent une toute autre image et suggèrent un statut de conservation alarmant. Ceci peut s'expliquer par deux biais. D'une part, ces données d'inventaire se basent essentiellement sur la collecte de coquilles, et rarement sur des spécimens collectés vivants. Or les coquilles peuvent se conserver très longtemps après la disparition de l'espèce. C'est le

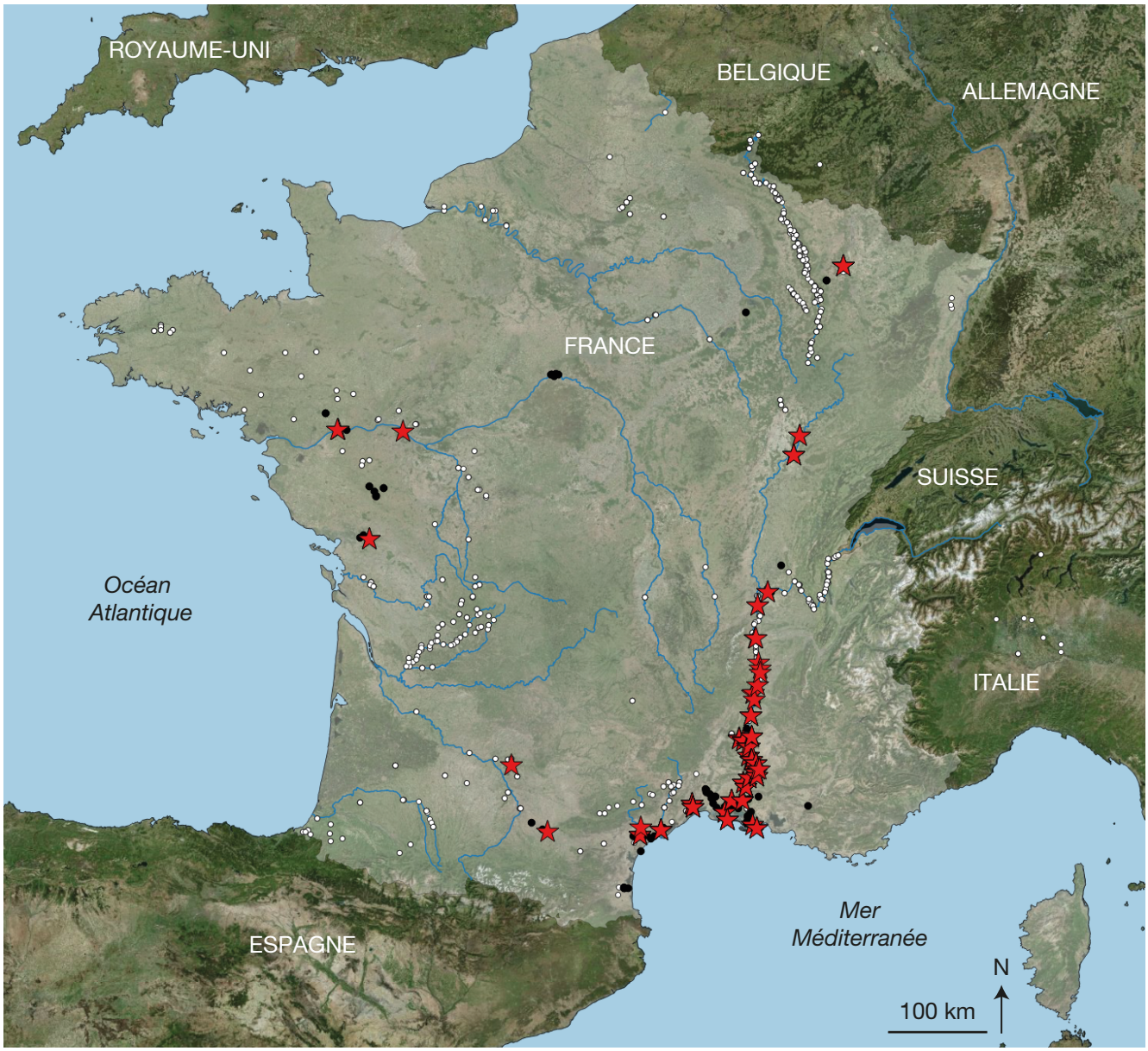

Fig. 11. — Répartition de l'Anodonte chinoise *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données disponibles pour l'Anodonte chinoise (en général des spécimens observés vivants) ; ★, données issues de l'analyse de l'ADNe.

cas notamment pour la Cyclade des fleuves, qui a une coquille remarquablement épaisse. Mais d'autres espèces à la coquille plus fragile peuvent également être conservées très longtemps dans les sédiments. D'autre part, les cartes de répartition dont nous disposons incluent des données anciennes et ne reflètent donc pas la dynamique de raréfaction ou de disparition locale des espèces. Pour amoindrir ces deux biais, il est important lors de la saisie de données concernant les Bivalves de préciser si les individus ont été observés vivants ou non, et dans le second cas d'indiquer quel semble être l'âge des coquilles (récent, avec périostracum bien conservé et ligament toujours en place, ancien, ou subfossile).

L'analyse de l'ADNe présente l'avantage de ne détecter que les espèces vivantes au moment de l'observation. En effet les tests réalisés montrent que l'ADN n'est détectable que de quelques jours à quelques semaines après sa libération dans le milieu (Dejean *et al.* 2011 ; Thomsen *et al.* 2012 ; Piaggio *et al.* 2014).

Un changement de paradigme

L'analyse de l'ADNe constitue un changement de paradigme pour toute l'hydrobiologie. Pour ce qui concerne les Bivalves dulçaquicoles, les résultats présentés ici donnent une nouvelle image de la hiérarchisation des enjeux de conservation (Tableau 2), en permettant de prendre en considération des espèces qui ne faisaient pas l'objet d'attention en raison de leur difficulté d'accès (soit parce qu'elles sont difficiles à récolter, soit parce qu'elles sont difficiles à déterminer).

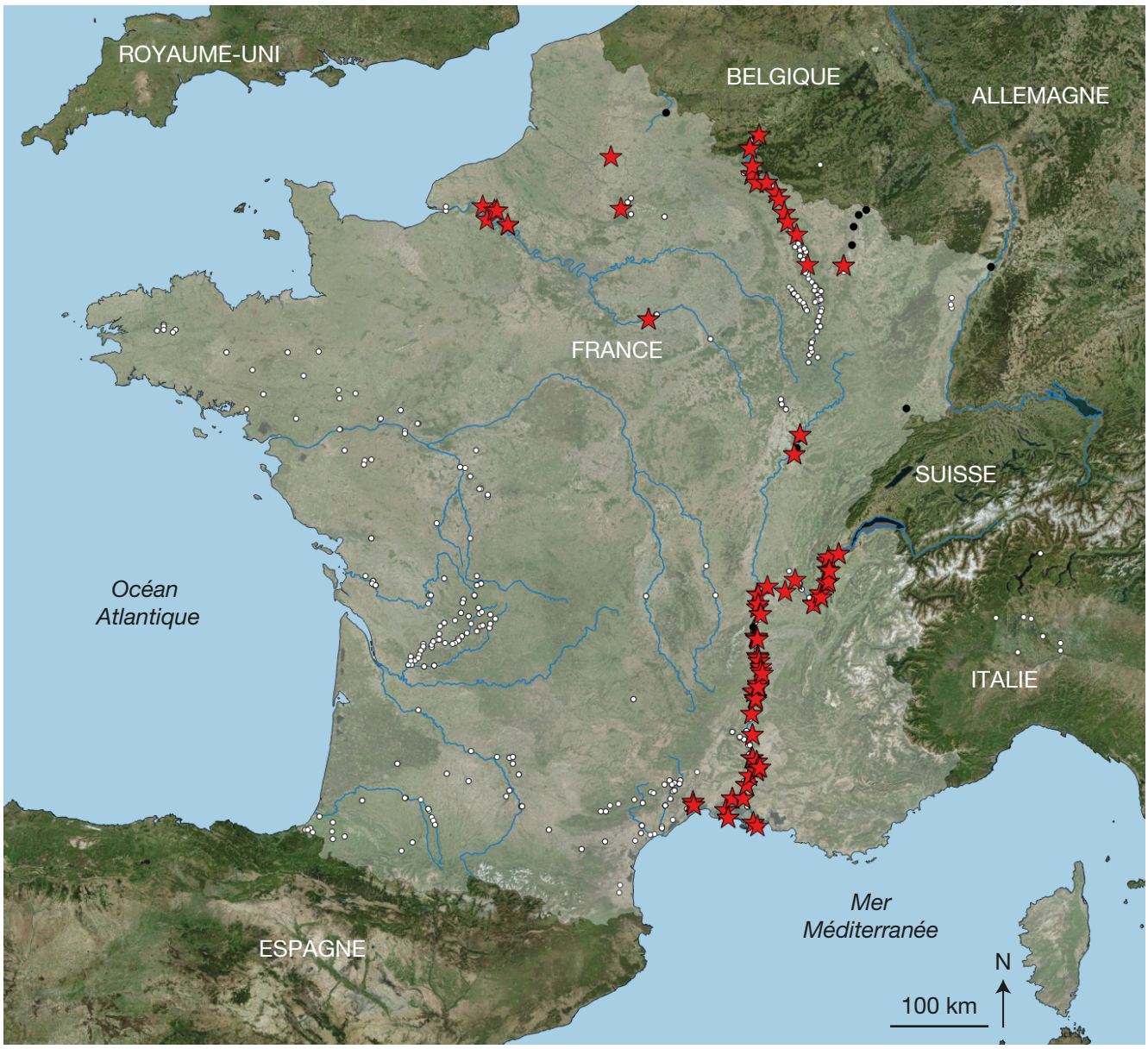

Fig. 12. — Répartition de la Moule quagga *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données disponibles pour la Moule quagga (quelques données d'inventaires traditionnels l'aval de la Meuse, la Saône et l'aval du Rhône sont masquées par les points rouges) ; ★, données issues de l'analyse de l'ADNe.

De la même manière que l'utilisation de détecteurs d'ultrasons a révolutionné les connaissances concernant les Chauves-souris (et les Orthoptères) dans les années 2000, en rendant « visibles » (ou plutôt audibles) des espèces qui passaient inaperçues auparavant, les progrès de l'analyse de l'ADNe ouvrent une énorme fenêtre sur la connaissance des milieux aquatiques. Cependant, comme toute nouvelle méthode, l'analyse de l'ADNe soulève aujourd'hui des réticences, des doutes quant à sa fiabilité, que nous essayons de dissiper dans ce travail. Mais l'analyse de l'ADNe va inéluctablement devenir une méthode majeure d'investigation des milieux aquatiques. Son déploiement n'en est encore qu'à ses débuts. La généralisation des inventaires par ADNe est l'avenir et des méthodes standardisées, très probablement automatisées dans un futur proche, nous permettront d'effectuer un grand pas en avant pour la connaissance de nos cours d'eau. Ces progrès ne vont pas à l'encontre des méthodes traditionnelles d'inventaire puisque l'ADNe ne fournit pas d'indication sur la localisation précise des populations (donnée indispensable notamment dans le cadre des études d'impacts) ni sur leur taille ou leur état de santé. L'analyse de l'ADNe peut en revanche fournir un préalable au déploiement de recherches de terrain, en donnant une liste d'espèces potentielles à rechercher sur un site. Dans le cadre d'une étude d'impacts par exemple, la détection d'un taxon patrimonial par ADNe peut déclencher la mise en œuvre d'inventaires plus lourds, engageant les méthodes traditionnelles, pour localiser précisément et quantifier la population.

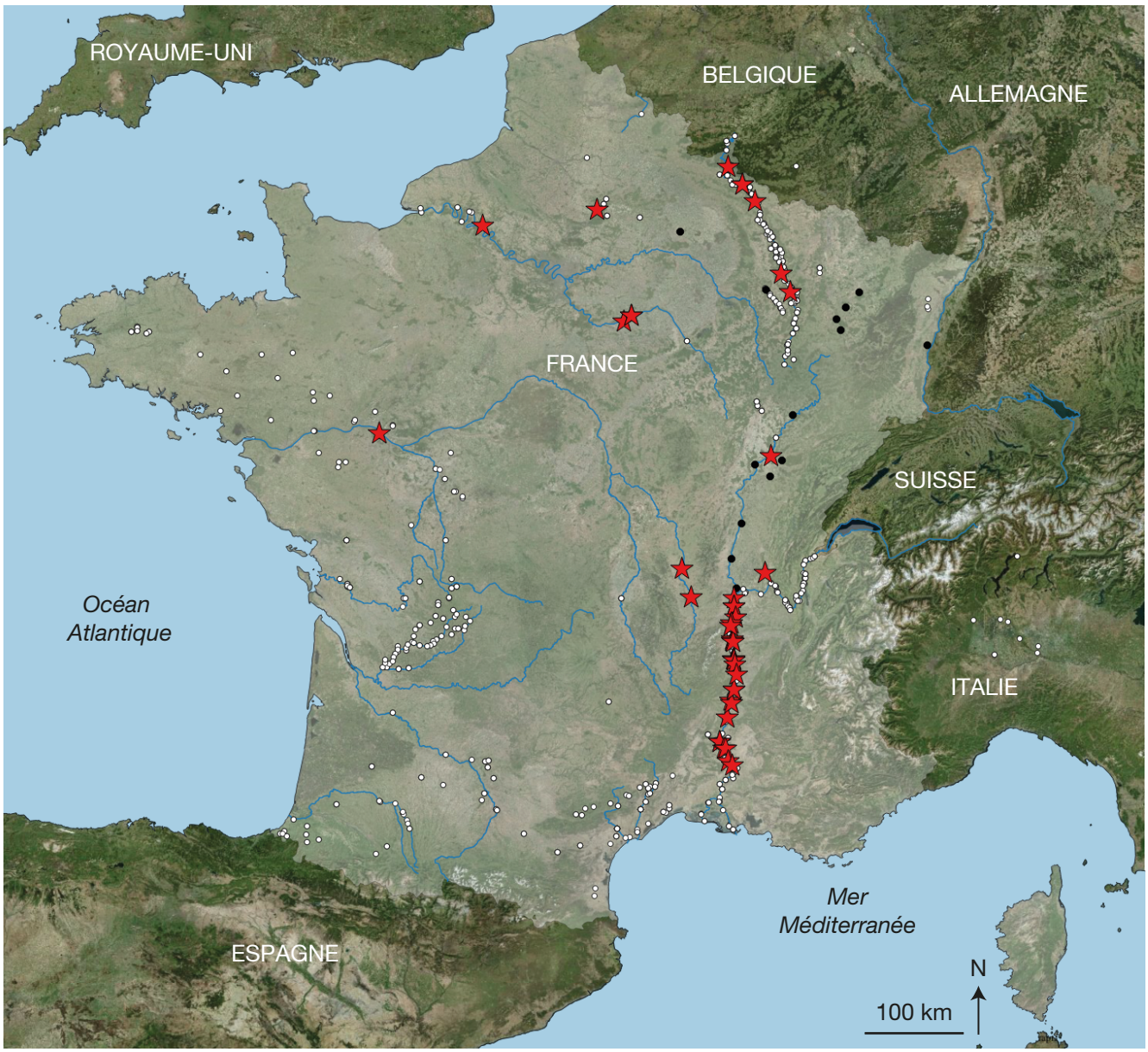

Fig. 13. — Répartition de la Pisidie d'Amérique *Euglesa compressa* (Prime, 1852) en France. ○, sites d'échantillonnage ADNe ; ●, données issues de Mouthon & Taïr-Abbaci 2012 et Mouthon & Forcellini 2017 ; ★, données issues de l'analyse de l'ADNe.

CONCLUSION

L'analyse de l'ADNe présente plusieurs intérêts dans le contexte actuel :

– elle a montré son efficacité en comparaison à des inventaires réalisés de manière traditionnelle ;

– elle permet de réaliser sur le terrain des prélèvements de manière standardisée, sans connaissances particulières de la part de l'opérateur et donc sans biais observateur ;

– elle permet de s'affranchir des problèmes de détermination en se calquant directement sur les données moléculaires, qui président aujourd'hui à la délimitation des espèces, et ainsi de pallier la mauvaise prise en compte des Bivalves dans les politiques de conservation due au manque d'experts capables de les déterminer correctement dans les bureaux d'études ou les associations naturalistes ;

– elle est non invasive, pour les individus (pas de manipulation) et pour le milieu (pas de piétinement par exemple) ;

– elle permet de limiter la propagation de pathogènes introduits envahissants (par exemple la Chitride *Batrachochytrium dendrobatidis* M. J. Powell, 2007 ou la peste de l'Écrevisse *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906) puisque le matériel utilisé est stérile ;

– elle permet de limiter les risques humains liés à la prospection en cours d'eau, point non négligeable en particulier dans le contexte professionnel.

Elle a néanmoins des limites :

– pas de localisation précise des espèces détectées ;

Tableau 2. — Hiérarchisation des espèces de France par leur rareté dans les résultats des échantillonnages ADNe. Les auteurs/dates des espèces sont indiqués dans le Tableau 1.

Espèces	Nombre de sites positifs ADNe	Commentaires
Sphaerium transversum	1	Espèce introduite et connue uniquement de deux stations qui n'ont pas été étudiées
Sphaerium solidum	2	Espèce supposée répandue dans le tiers nord-est de la France (Welter-Schultes 2012)
Euglesa pseudosphaerium	2	Espèce devenue très rare en France alors qu'elle était considérée comme largement répandue dans les trois quarts nord du pays (Welter-Schultes 2012)
Euglesa globularis	3	Espèce en limite d'aire de répartition et très rare en France
Sphaerium rivicola	11	Espèce supposée répandue dans le tiers nord-est de la France
Sphaerium ovale	14	Espèce mal connue en raison de sa confusion avec *S. nucleus* et *S. corneum*. L'attribution des fragments de séquences obtenus par analyse de l'ADNe à *S. ovale* reste à confirmer
Pseudunio auricularius	18	L'échantillonnage ADNe n'a pas permis de retrouver de nouvelles stations
Pseudanodonta complanata	21	Espèce supposée largement répandue en France, régions méridionales exceptées
Margaritifera margaritifera	27	Notre échantillonnage cible plutôt les écosystèmes de l'aval et peu de sites favorables à *M. margaritifera* ont été échantillonnés.
Euglesa hibernica	31	–
Euglesa obtusalis	32	–
Sphaerium nucleus	34	–
Euglesa compressa	41	Introduite, dynamique inconnue
Unio tumidus	46	–
Euglesa supina	51	–
Euglesa pulchella	56	–
Euglesa milium	62	–
Odhneripisidium tenuilineatum	66	–
Unio crassus	76	–
Euglesa henslowana	79	–
Odhneripisidium moitessierianum	85	–
Sinanodonta woodiana	>100	Introduite, en expansion
Sphaerium lacustre	>100	–
Anodonta cygnea	>100	–
Pisidium amnicum	>100	–
Euglesa nitida	>100	–
Potomida littoralis	>100	–
Unio mancus	>100	–
Dreissena rostriformis bugensis	>100	Introduite, en expansion
Dreissena polymorpha	>100	Introduite, en expansion
Euglesa personata	>100	–
Sphaerium corneum	>100	–
Euglesa subtruncata	>100	–
Euglesa casertana	>100	–
Unio pictorum	>150	*U. pictorum* s'avère être plus présente dans le quart sud-ouest de la France que l'on ne le pensait
Anodonta anatina	>150	–
Corbicula spp.	>200	Introduite, les différentes espèces décrites ne sont pas discernables par les fragments étudiés

– pas d'estimation de la taille des populations (le nombre de lectures des fragments de séquences d'ADN fournit une indication semi-quantitative, mais il est impossible de faire correspondre cette valeur à un nombre d'individus) ;

– un taux de détection variable (mais qui reste toutefois supérieur à celui des inventaires réalisés selon des méthodes traditionnelles).

L'ADNe est comparable à une odeur : on détecte une présence (ou pas), une direction générale, mais l'essentiel reste à découvrir (où exactement, combien d'individus ?). De la même manière que le flair préside à la traque, l'analyse de l'ADNe est un formidable prélude aux inventaires de terrain. Elle permet de « lever des lièvres ».

Sur la base des travaux réalisés en France au cours des quatre dernières années, et considérant que l'analyse de l'ADNe est une méthode suffisamment puissante pour que l'on puisse accorder du crédit aux résultats obtenus, les enjeux de conservation des Bivalves d'eau douce de France peuvent être revisités. Alors que la faible pression d'inventaire laissait le flou sur l'état de conservation de certaines espèces difficilement détectables, nous pouvons aujourd'hui, sur la base de notre échantillonnage, affirmer que les espèces inféodées à l'aval des cours d'eau sont dans un état de conservation préoccupant. Alors que la Mulette épaisse et – dans une moindre mesure – la Mulette perlière, deux espèces particulièrement ciblées par les politiques de conservation, sont régulièrement identifiées dans les milieux qui leur sont favorables, certaines espèces caractéristiques des écosystèmes de l'aval comme la Cyclade

des fleuves, qui n'a pas été détectée et la Grande Cyclade et l'Anodonte comprimée qui semblent avoir subi une contraction importante de leurs aires de répartition, ont un statut de conservation alarmant en France, comme ailleurs en Europe. Enfin, la Grande Mulette, représentant emblématique des espèces des écosystèmes de l'aval, n'a pas été révélée par les prélèvements d'ADNe ailleurs que dans les stations déjà connues.

Ces résultats mettent en lumière des enjeux de conservation très importants pour les espèces de l'aval des grands cours d'eau, qui subissent les menaces diffuses de tout l'amont. Il semble aujourd'hui primordial dans un contexte d'érosion de la biodiversité et d'effondrement des effectifs de mettre en œuvre des politiques de conservation conséquentes pour les espèces de l'aval, insuffisamment considérées actuellement par les naturalistes comme par les gestionnaires en raison de la difficulté d'accès de ces milieux. La mise en œuvre d'un Plan national d'Actions pour les Bivalves de l'aval pourrait permettre, en regroupant les différents acteurs impliqués dans la gestion des grands cours d'eau, à la fois de répondre aux lacunes de connaissances, et de proposer des mesures de gestion de ces écosystèmes intégrateurs qui abritent l'essentiel de la biodiversité dulçaquicole. Cibler les espèces mal connues de l'aval des cours d'eau, autant dans l'amélioration des connaissances que dans les mesures de gestion, apparait aujourd'hui prioritaire pour la conservation de la biodiversité.

Remerciements

Le développement de la méthode d'analyse de l'ADNe pour les Bivalves a été mené conjointement par le bureau d'étude Biotope, l'association Caracol et la société SPYGEN. L'Office français de la Biodiversité (OFB) et la Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL) d'Occitanie ont contribué à son financement. Les données présentées ici intègrent des travaux menés par les bureaux d'études Biotope et Aquascop, l'association Caracol, la Compagnie nationale du Rhône, le Parc naturel régional du Limousin, les Conservatoires d'Espaces naturels Midi-Pyrénées et Nouvelle Aquitaine, l'OFB, le programme LIFE + Grande Mulette, GRT Gaz, Voies navigables de France, l'EPTB Vilaine et le CPIE Loire-Anjou. Les DREAL Grand Est, Nouvelle Aquitaine, Occitanie ainsi que la DDT du Tarn ont également financé une partie des études dont les résultats sont présentés ici. Nous remercions également toutes les personnes qui ont participé à l'échantillonnage et à l'analyse en laboratoire des échantillons. Enfin, nous remercions particulièrement les personnes ayant participé à l'initiative et à l'interprétation des résultats ainsi que leurs structures respectives, en particulier Alain Serena, Mathieu Charneau (OFB), Frédéric Melki (Biotope), Maxime Cosson et Matthieu Duffau (CEN Nouvelle-Aquitaine), Frédéric Néri (CEN Midi-Pyrénées), Jérôme Tourneur (CPIE Loire-Anjou), Benjamin Bottner (EPTB Vilaine), Charlie Pichon (PNR Limousin). Nous remercions enfin les deux relecteurs de la première version de cet article.

RÉFÉRENCES

Adam B. 2010. — L'Anodonte chinoise *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca, Bivalvia, Unionidae) : une espèce introduite qui colonise le bassin Rhône-Méditerranée. *MalaCo* 6: 278-287.

Albert J. S., Destouni G., Duke-Sylvester S. M., Magurran A. E., Oberdorff T., Reis R. E., Winemiller K. O. & Ripple W. J. 2020. — Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis. *Ambio* 50: 85-94. https://doi.org/10.1007/s13280-020-01318-8

Bertrand A. 2018. — Notes d'observations de mollusques continentaux de France et d'Espagne. *Folia conchyliologica* 4: 23-27

Bespalaya Y., Bolotov I., Aksenova O., Kondakov A., Gofarov M. & Paltser I. 2015. — Occurrence of a *Sphaerium* species (Bivalvia: Sphaeriidae) of Nearctic origin in European Arctic Russia (Vaigach Island) indicates an ancient exchange between freshwater faunas across the Arctic. *Polar Biology* 38: 1545-1551. https://doi.org/10.1007/s00300-015-1656-5

Biggs J., Ewald N., Valentini A., Gaboriaud C., Dejean T., Griffiths R. A., Foster J., Wilkinson J. W., Arnell A., Brotherton P. Williams P. & Dunn F. 2015. — Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183:19-28. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029

Bij de Vaate A. & Beisel J.-N. 2011. — Range expansion of the quagga mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in Western Europe: first observation from France. *Aquatic Invasions* 6 (Suppl. 1): 71-74. https://doi.org/10.3391/ai.2011.6.S1.016

Bij de Vaate A., Klink A. & Paalvast P. 2007. — *Macrozoobenthos in the Lower Seine: a Survey from the Perspective of the European Water Framework Directive*. Ecoconsult report 200703, Lelystad, 121 p.

Biotope 2009. — *Inventaire des mollusques de la vallée de la Meuse*. [Rapport d'étude] BAMEO, Paris, 30 p.

Cantera I., Cilleros K., Valentini A., Cerdan A., Dejean T., Iribar A., Taberlet P., Vigouroux R. & Brosse S. 2019. — Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers. *Scientific reports* 9 (1): 3085 https://doi.org/10.1038/s41598-019-39399-5

Carpenter S. R., Stanley E. H. & Vander Zanden M. J. 2011. — State of the world's freshwater ecosystems: physical, chemical, and biological changes. *The Annual Review of Environment and Resources* 36: 75-99. https://doi.org/10.1146/annurev-environ-021810-094524

Currier C. A., Morris T. J., Wilson C. C. & Freeland J. R. 2018. — Validation of environmental DNA (eDNA) as a detection tool for at-risk freshwater pearly mussel species (Bivalvia: Unionidae). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 28 (3): 545-558.

Darling J. A. & Mahon A. R. 2011. — From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research* 111 (7): 978-988.

Dejean T., Valentini A., Duparc A., Pellier-Cuit S., Pompanon F., Taberlet P. & Miaud C. 2011. — Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE* 6: e23398. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398

Dejean T., Valentini A., Miquel C., Taberlet P., Bellemain E. & Miaud C. 2012. — Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* 49: 953-959. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x

Donrovich S. W., Douda K., Plechingerova´ V., Rylkova´ K., Horky´P., Slavi´k O., Liu H.Z., Reichard M., Lopes-Lima M. & Sousa R. 2017. — Invasive Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* threatens native mussel reproduction by inducing cross-resistance of host fish. *Aquatic Conservation of Marine and*

Freshwater Ecosystems 27: 1325-1333. https://doi.org/10.1002/aqc.2759

Dudgeon D., Arthington A. H., Gessner M. O., Kawabata Z.-I., Knowler D. J., Lévêque C., Aiman R. J. N, Prieur-Richard A.-H., Soto D., Stiassny M. L. J. & Sullivan C. A. 2006. — Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81: 163-182. https://doi.org/10.1017/S1464793105006950

Evans N. T., Olds B. P., Turner C. R., Li Y., Jerde C. L., Mahon A. R., Pfrender M. E., Lamberti G. A. & Lodge D. M. 2015. — Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via eDNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 16 (1): 29-41. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12433

Falkner G., Ripken T. & Falkner M. 2002. — *Mollusques continentaux de France: Liste de Référence annotée et Bibliographie.* Muséum national d'Histoire naturelle, Paris (coll. Patrimoines naturels; 52) 356 p.

Ferreira-Rodríguez N., Akiyama Y. B., Aksenova O. V., Araujo R., Barnhart M. C., Bespalaya Y. V., Bogan A. E., Bolotov I. N., Budha P. B., Clavijo C., Clearwater S. J., Darrigran G., Do V. T., Douda K., Froufe E., Gumpinger C., Henrikson L., Humphrey C. L., Johnson N. A., Klishko O., Klunzinger M. W., Kovitvadhi S., Kovitvadhi U., Lajtner J., Lopes-Lima M., Moorkens E. A., Nagayama S., Nagel K.-O., Nakano M., Negishi J. N., Ondina P., Oulasvirta P., Prié V., Riccardi N., Rudzīte M., Sheldon F., Sousa R., Strayer D. L., Takeuchi M., Taskinen J., Teixeira A., Tiemann J. S., Urbańska M., Varandas S., Vinarski M. V., Wicklow B. J., Zając T. & Vaughn C. C. 2019. — Research priorities for freshwater mussel conservation assessment. *Biological Conservation* 231: 77-87. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.002

Ficetola G. F., Miaud C., Pompanon F. & Taberlet P. 2008. — Species detection using environmental DNA from water samples. *Biological Letters* 4: 423-425. https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118

Goldberg C. S., Sepulveda A., Ray A., Baumgardt J. & Waits L. P. 2013. — Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science* 32: 792-800. https://doi.org/10.1899/13-046.1

Huber V. & Geist J. 2019. — Reproduction success of the invasive *Sinanodonta woodiana* (Lea 1834) in relation to native mussel species. *Biological Invasions* 21: 3451-3465. https://doi.org/10.1007/s10530-019-02060-3

Huff S. W., Campbell D., Gustafson D. L., Lydeard C., Altaba C. R. & Giribet G. 2004. — Investigations into the phylogenetic relationships of freshwater pearl mussels (Bivalvia: Margaritiferidae) based on molecular data: implications for their taxonomy and biogeography. *Journal of Molluscan Studies* 70: 379-388. https://doi.org/10.1093/mollus/70.4.379

Kelly R. P., Port J. A., Yamahara K. M. & Crowder L. B. 2014. — Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS ONE* 9: e86175. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086175

Klymus K. E., Richter C. A., Chapman D. C. & Paukert C. 2015. — Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation* 183: 77-84. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.020

Klymus K. E., Marshall N. T. & Stepien C. A. 2017. — Environmental DNA (eDNA) metabarcoding assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes. *PLoSOne* 12 (5): e0177643. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177643

Lee T. & Ó Foighil D. 2003. — Phylogenetic structure of the Sphaeriinae, a global clade of freshwater bivalve molluscs, inferred from nuclear (ITS-1) and mitochondrial (16S) ribosomal gene sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society* 137 (2): 245-260. https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00047.x

Lopes-Lima M., Sousa R., Geist J., Aldridge D. C., Araujo R., Bergengren J., Bespalaya Y., Bódis E., Burlakova L., Van Damme D., Douda K., Froufe E., Georgiev D., Gumpinger C., Karatayev A., Kebapçi Ü., Killeen I., Lajtner J., Larsen B. M., Lauceri R., Legakis A., Lois S., Lundberg S., Moorkens E., Motte G., Nagel K.-O., Ondina P., Outeiro A., Paunovic M., Prié V., von Proschwitz T., Riccardi N., Rudzīte M., Rudzītis M., Scheder C., Seddon M., Şereflişan H., Simić V., Sokolova S., Stoeckl K., Taskinen J., Teixeira A., Thielen F., Trichkova T., Varandas S., Vicentini H., Zajac K., Zajac T. & Zogaris S. 2017. — Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biological Reviews* 92 (1): 572-607. https://doi.org/10.1111/brv.12244

Lydeard C., Cowie R. H., Ponder W. F., Bogan A. E., Bouchet P., Clark S. A., Cumming K. S., Frest T. J., Gargominy O., Herbert D. G., Hershler R., Perez K. E., Roth B., Seddon M., Strong E. E. & Thompson F. G. 2004. — The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience* 54: 321-330. https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0321:TGDONM]2.0.CO;2

Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J. Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M. & Iwasaki W. 2015. — MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2 (7). https://doi.org/10.1098/rsos.150088

Mouthon J. 2018. — Répartition en France des formes actuelle et fossile d'*Euglesa pulchella* Jenyns, 1832 (Bivalvia, Sphaeriidae), une espèce rare. *Folia conchyliologica* 45 : 3-8.

Mouthon J. & Kuiper J. 1987. — *Inventaire des Sphaeriidae de France*. MNHN, secrétariat de la Faune et de la Flore (coll. Inventaire deFaune et de Flore), Paris, vol. 41, 160 p.

Mouthon J. & Taïr-Abbaci K. 2012. — The taxonomic confusion surrounding Pisidium (Bivalvia, Sphaeriidae): the possible birth of a new taxon. *Basteria* 76 (4-6): 126-130.

Mouthon J. & Forcellini M. 2017. — Genetic evidence of the presence in France of the North American species *Euglesa compressa* Prime, 1852 (Bivalvia, Sphaeriidae). *BioInvasions Records* 6 (3): 225-231. https://doi.org/10.3391/bir.2017.6.3.07

Piaggio A. J., Engeman R. M., Hopken M. W., Humphrey J. S., Keacher K. L., Bruce W. E. & Avery M. L. 2014. — Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* 14 (2): 374-380. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12180

Pigneur L. M., Marescaux J., Roland K., Etoundi E., Descy J.-P. & Van Doninck K. 2011. — Phylogeny and androgenesis in the invasive *Corbicula* clams (Bivalvia, Corbiculidae) in Western Europe. *BMC Evolutionary Biology* 11: 1471-2148. https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-147

Pont D., Rocle M., Valentini A., Civade R., Jean P., Maire A., Roset N., Schabuss M., Zornig H. & Dejean T. 2018. — Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports* 8: 10361. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8

Prié V. 2003. — Notes sur les Mollusques du bassin du Lez (Hérault, France). *Documents malacologiques* 4: 19-31.

Prié V. 2015. — Loin des yeux, loin du cœur : la situation critique de la Grande Mulette et d'autres naïades de France. *Penn ar Bed* 222: 112-113.

Prié V. 2017. — *Naïades et autres bivalves d'eau douce de France.* Biotope éditions, Mèze ; Publications scientifiques du Muséum (coll. Inventaires et Biodiversité), Paris, 336 p.

Prié V. & Puillandre N. 2014. — Molecular phylogeny, taxonomy and distribution of French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae). *Hydrobiologia* 735 (1): 95-110. https://doi.org/10.1007/s10750-013-1571-0

Prié V. & Fruget J.-F. 2017. — Heading south: new records of the

invasive freshwater quagga mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Deshayes, 1838) in France and further perspectives. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 418 (37): 1-6. https://doi.org/10.1051/kmae/2017023

Prié V., Valentini A., Lopes-Lima M., Froufe E., Rocle M., Poulet N., Taberlet P. & Déjean T. 2020. — Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia*. https://doi.org/10.1007/s10750-020-04260-8

Prié V., Soler J., Araujo R., Cucherat X., Philippe L., Legrand N., Patry N., Adam B., Jugé P., Richard N. & Wantzen K. M. 2018. — Challenging exploration of troubled waters: ten years' surveys of the giant freshwater pearl mussel *Margaritifera auricularia* in Europe. *Hydrobiologia* 810 (1): 157-175. https://doi.org/10.1007/s10750-017-3456-0

Sansom B. J. & Sassoubre L. M. 2017. — Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates to model freshwater mussel eDNA transport in a river. *Environmental science & technology* 51 (24): 14244-14253. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05199

Stepien C. A., Grigorovich I. A., Gray M. A., Sullivan T. J., Yerga-Woolwine S. & Kalayci G. 2014. — Evolutionary, biogeographic, and population genetic relationships of Dreissenid mussels, with revision of component taxa, *in* Nalepa T. F. & Schloesser D. W. (éds), *Quagga and zebra Mussels: Biology, Impacts, and Control, 2 edn*. CRC Press, Boca Raton: 403-444.

Stoeckle B. C., Huehn R. & Geist J. 2016. — Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conservation Marine and Freshwater ecosystems* 26 (6): 1120-1129. https://doi.org/10.1002/aqc.2611

Taberlet P., Coissac E., Hajibabaei M. & Rieseberg L. H. 2012. — Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21 (8): 1789-1793. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x

Therriault T. W., Docker M. F., Orlova M. I., Heath D. D. & MacIsaac H. J. 2004. — Molecular resolution of the family Dreissenidae (Mollusca: Bivalvia) with emphasis on Ponto-Caspian species, including first report of *Mytilopsis leucophaeata* in the Black Sea basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 479-489. https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00240-9

Thomsen P. F. & Willerslev E. 2015. — Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183: 4-18. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019

Thomsen P. F., Kielgast J. O. S., Iversen L. L., Wiuf C., Rasmussen M., Gilbert M. T., Orlando L. & Willerslev E. 2012. — Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21 (11): 2565-2573. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x

Valentini A., Taberlet P., Miaud C., Civade R., Herder J., Thomsen P. F., Bellemain E., Besnard A., Coissac E., Boyer F., Gaboriaud C., Jean P., Poulet N., Roset N., Copp G. H., Geniez P., Pont D., Argillier C., Baudoin J.-M., Peroux T., Crivelli A., Olivier A., Acqueberge M., Le Brun M., Møller P., Willerslev E. & Dejean T. 2016. — Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25 (4): 929-942. https://doi.org/10.1111/mec.13428

Wagner A. 2014. — Arrivée de *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) (Mollusca, Bivalvia, Dreissenidae), nouvelle espèce pour la faune d'Alsace. *Folia Conchiliologica* 28: 19-22.

Welter-Schultes F. 2012. — *European non-Marine Molluscs, a Guide for Species Identification.* Planet Poster Editions, Göttingen, 760 p.

Soumis le 19 septembre 2019;
accepté le 27 avril 2020;
publié le 31 mars 2021.

ANNEXE

Annexe 1. — Liste des sites pilotes ayant permis de comparer les résultats des inventaires menés par des méthodes traditionnelles (**colonne A**) et les résultats des échantillonnages d'ADNe (**colonne B**). En grisé sont indiqués les sites où seules des coquilles ont été observées par les inventaires traditionnels. Les auteurs/dates des espèces sont indiqués dans le Tableau 1.

	Grands cours d'eau				**Sites d'inventaire ponctuels**																													
	Rhône		**Meuse**		**Lez**		**Charente**		**Ardèche**		**Les Maillys**		**Pontailler-sur-Saône**		**Vanne-Alcor**		**Dom-le-Mesnil**		**Sassey-sur-Meuse**		**Mézières**		**Montcy-notre-Dame**		**Sivry-sur-Meuse**		**Bellevile**		**Levrésy**		**Dieue sur Meuse**		**Saint-Mihiel**	
Espèces	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**
Margaritifera auricularia	–	–	–	–	–	–	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Anodonta anatina	1	1	1	1	–	–	0	1	1	1	1	1	0	0	–	–	1	0	1	1	–	–	–	–	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Anodonta cygnea	1	1	0	1	1	–	0	0	0	0	1	1	0	0	–	–	–	–	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Pseudanodonta complanata	0	1	1	1	–	–	1	1	0	0	0	1	0	0	–	–	–	–	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1	0	1
Sinanodonta woodiana	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Potomida littoralis	1	1	0	0	1	–	1	1	1	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Unio crassus crassus	1	1	1	1	–	–	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	–	1	1	1	1	1	–	–	1	0	1	0	–	–	1	1	1	0
Unio crassus courtillieri	–	–	0	1	–	–	0	0	0	0	0	0	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1	–	–
Unio mancus	1	1	0	0	–	–	0	1	1	1	1	1	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Unio pictorum	1	1	1	1	–	–	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1			1	0	1	0			1	1	–	–	0	1	1	1
Unio tumidus	0	1	1	1	–	–	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	–	–	1	1	0	1	–	–
Corbicula fluminea	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	–	–	0	1
Dreissena polymorpha	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Dreissena rostriformis bugensis	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	–	–	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	–	–
Pisidium amnicum	1	1	1	1	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1	0	1
Sphaerium corneum	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1	1	1	1	0	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1	0	1
Sphaerium lacustre	1	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1	–	–
Sphaerium nucleus	0	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1	–	–
Sphaerium ovale	0	1	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Sphaerium rivicola	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1
Sphaerium solidum	0	0	1	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euglesa casertana	1	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1	1	1
Euglesa compressa	1	1	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1
Euglesa globularis	0	1	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euglesa henslowana	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1	–	–
Euglesa hibernica	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euglesa lilljeborgii	0	0	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euglesa milium	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euglesa nitida	1	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1	–	–
Euglesa obtusalis	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euglesa personata	1	1	1	1	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euglesa pseudosphaerium	1	0	0	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euglesa pulchella	1	1	0	1	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1	–	–
Euglesa subtruncata	1	1	1	1	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euglesa supina	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1	0	1
Odhneripisidium moitessierianum	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1	–	–
Odhneripisidium tenuilineatum	1	1	1	1	0	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–