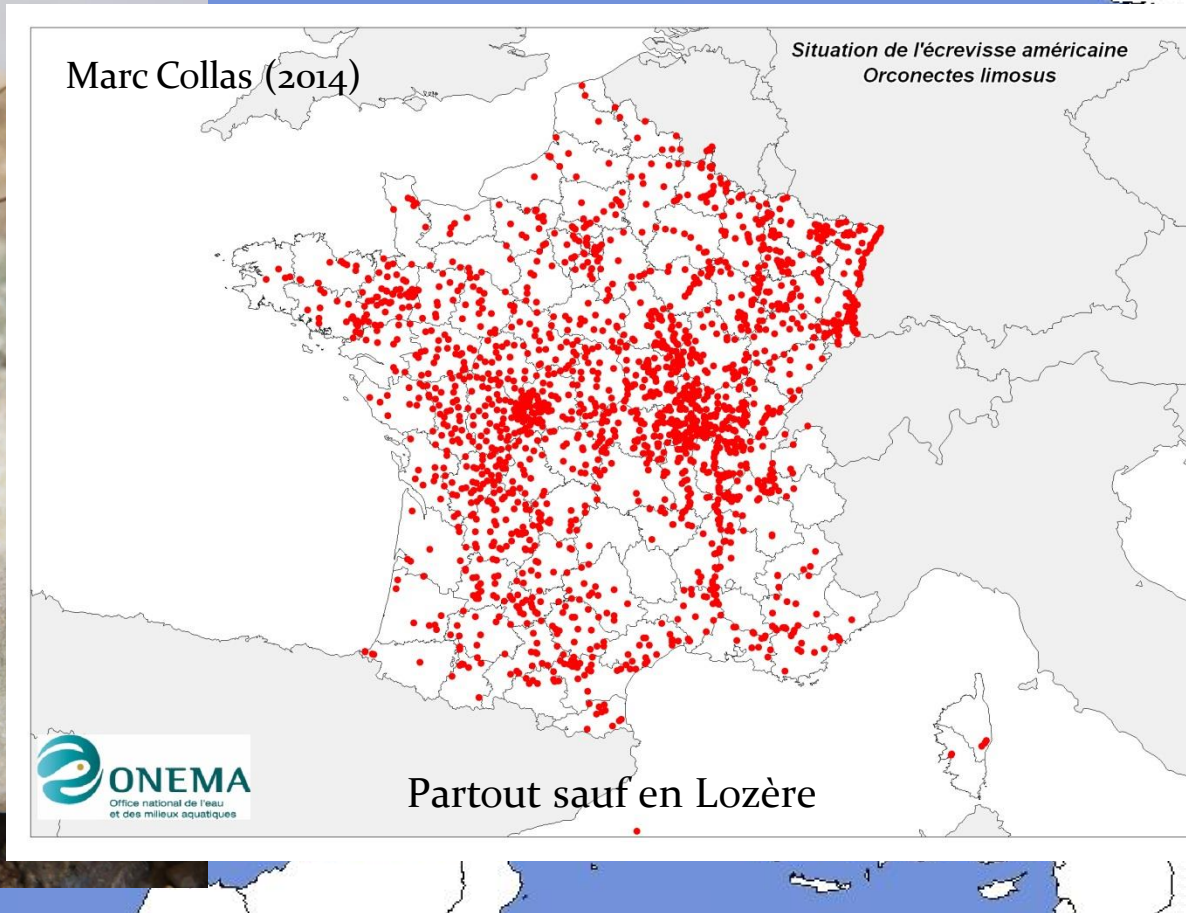


ADNe appliqué dans un contexte hôtes/pathogènes : cas des écrevisses invasives

- **Frédéric Grandjean**
- Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions,
- Equipe Ecologie, Evolution, Symbiose

Les écrevisses exotiques en France

- *Orconectes limosus*, écrevisse américaine

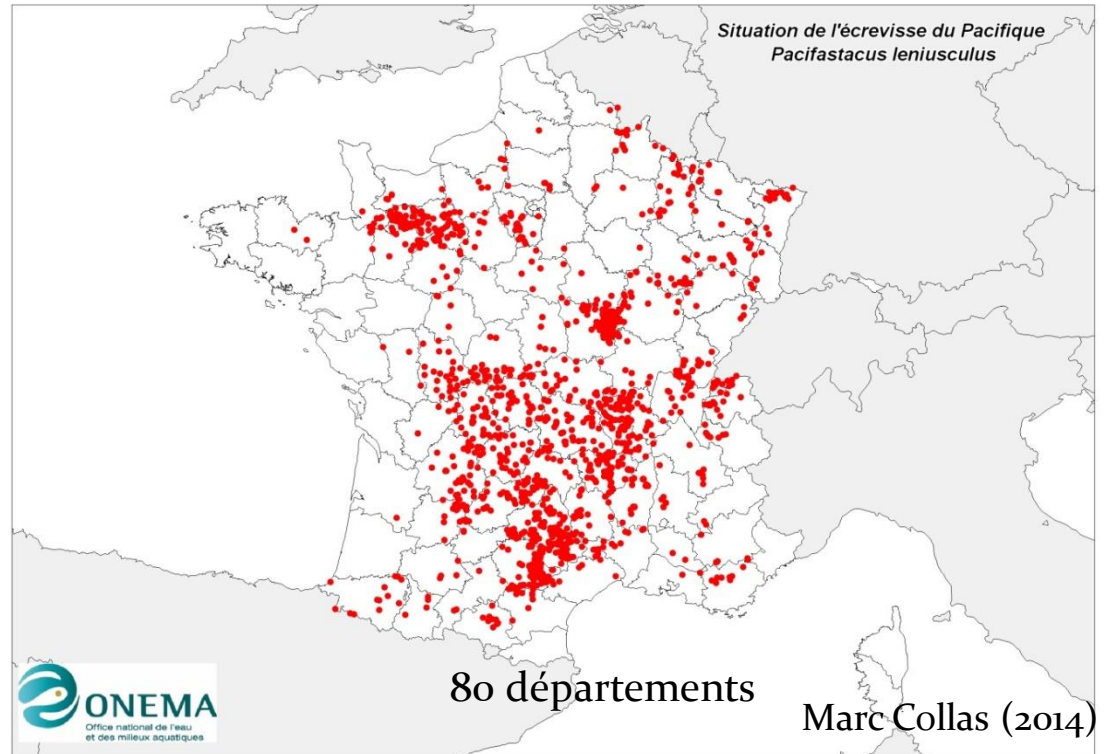


Cours d'eau intermédiaire

Les écrevisses exotiques en France

- *Pacifastacus leniusculus*, écrevisse signal de Californie

- 1^{ère} introduction Suède 1959 (60 000)
- 1973-1977 importation de 18 000 juvéniles en France



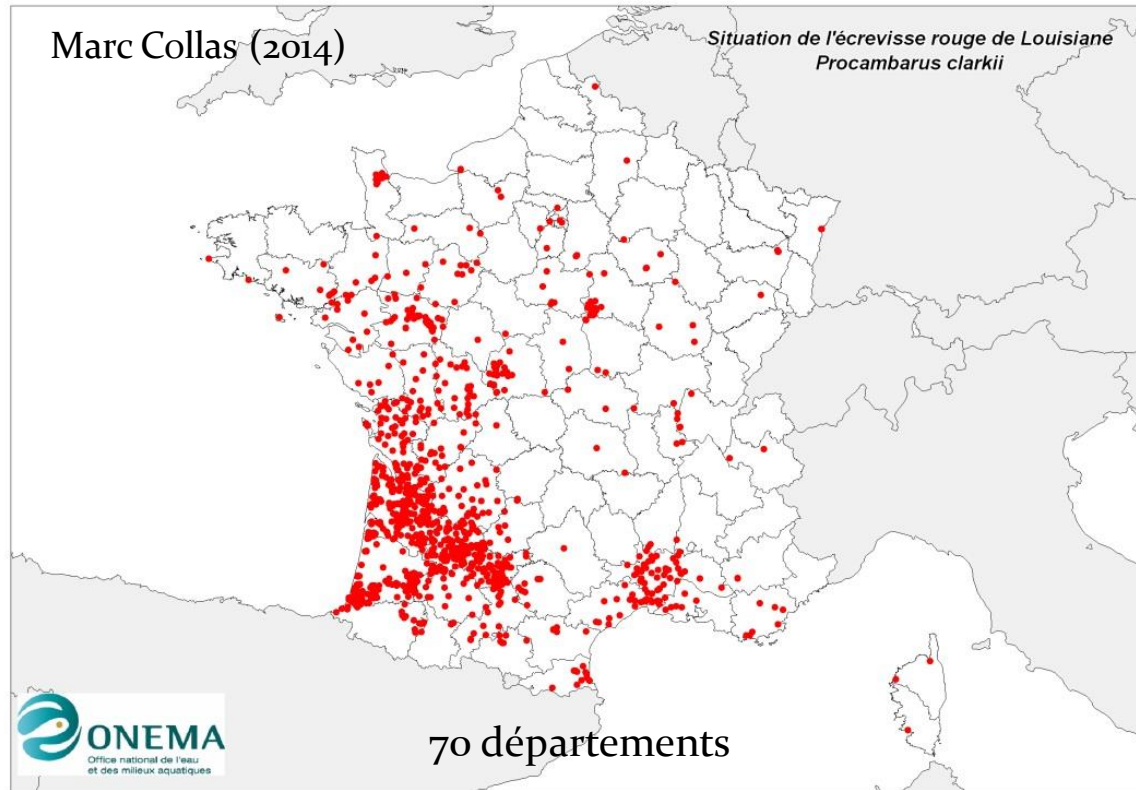
Têtes de bassin hydrographique

Les écrevisses exotiques en France

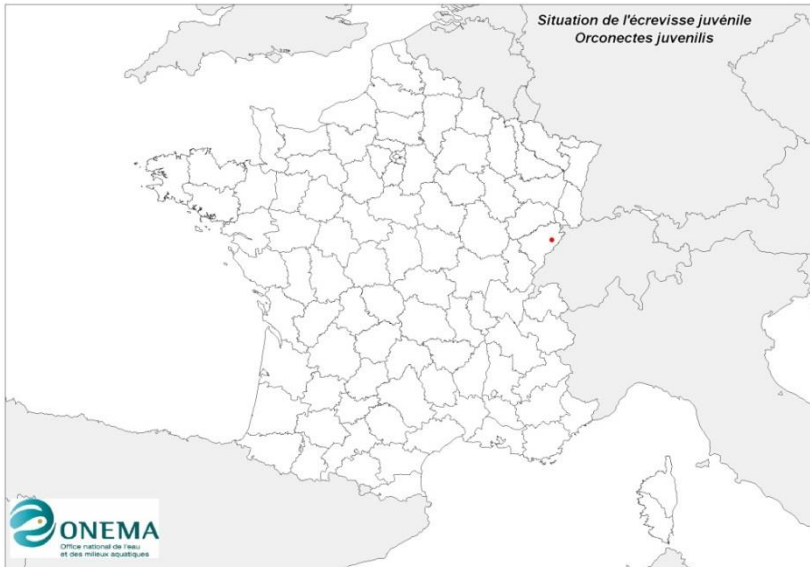
- *Procambarus clarkii*, écrevisse de Louisiane



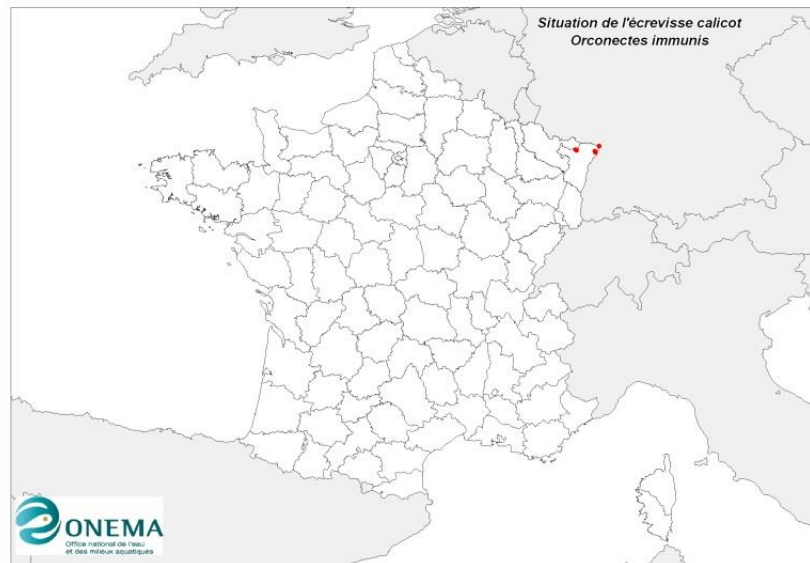
1^{ère} introduction Espagne 1976;
Importation en France jusqu'en 1983



Les écrevisses exotiques en France



- *Orconectes juvenilis*, écrevisse juvénile



- *Orconectes immunis*, écrevisse calicot

Les écrevisses exotiques en France



Nuisibles car considérées comme susceptibles de provoquer des **déséquilibres biologiques** (R 432-5, 2005)



Ecrevisse de Louisiane
(*Procambarus clarkii*)

Ecrevisse Américaine
(*Orconectes limosus*)

Ecrevisse de Californie
(*Pacifastacus leniusculus*)

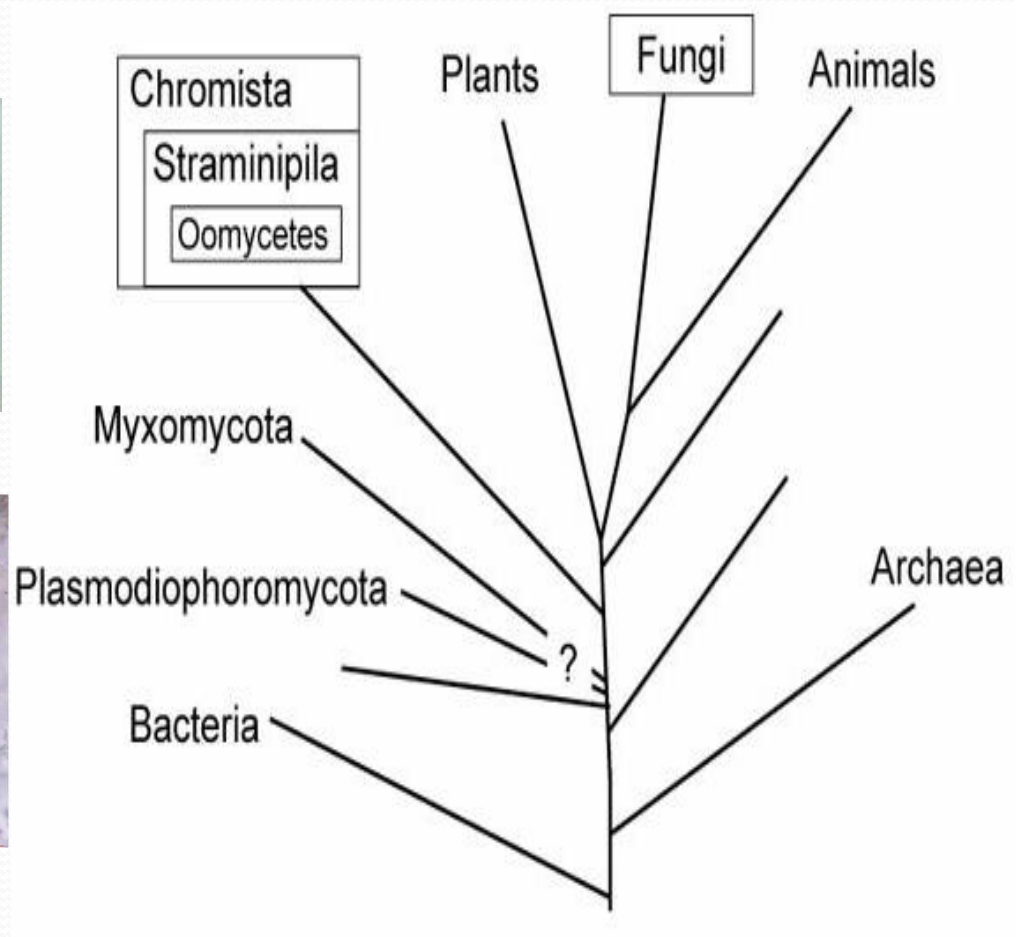
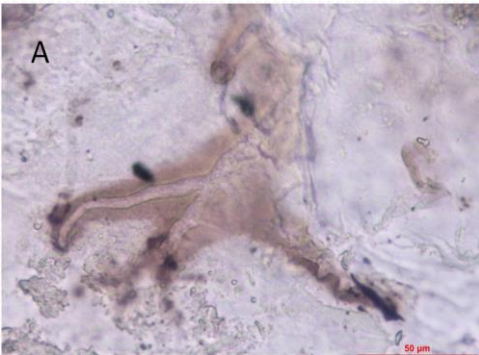
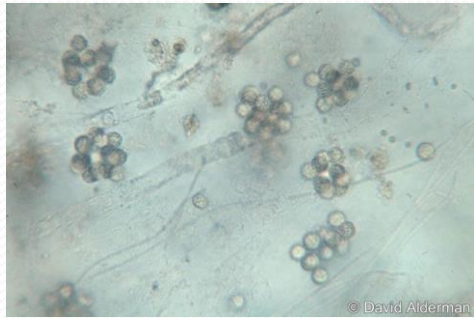
Impacts :

- Diminution de la biodiversité (flotistique et faunistique)
- Destruction d'habitat
- Porteuses de pathogènes (Chytridiomycose, Aphanomycose,



Position phylogénétique d' *A. astaci*

Aphanomyces astaci



Link *et al.* 2002

1895

Historique de la Peste: Introduction et vague d'expansion à travers l'Europe

■ Mortalité massive observée

■ Mortalité suspectée



- Mortalités massives reportée en Italie
- 10 ans plus tard même observations en France
- La peste s'étend alors rapidement à travers l'Europe

1995

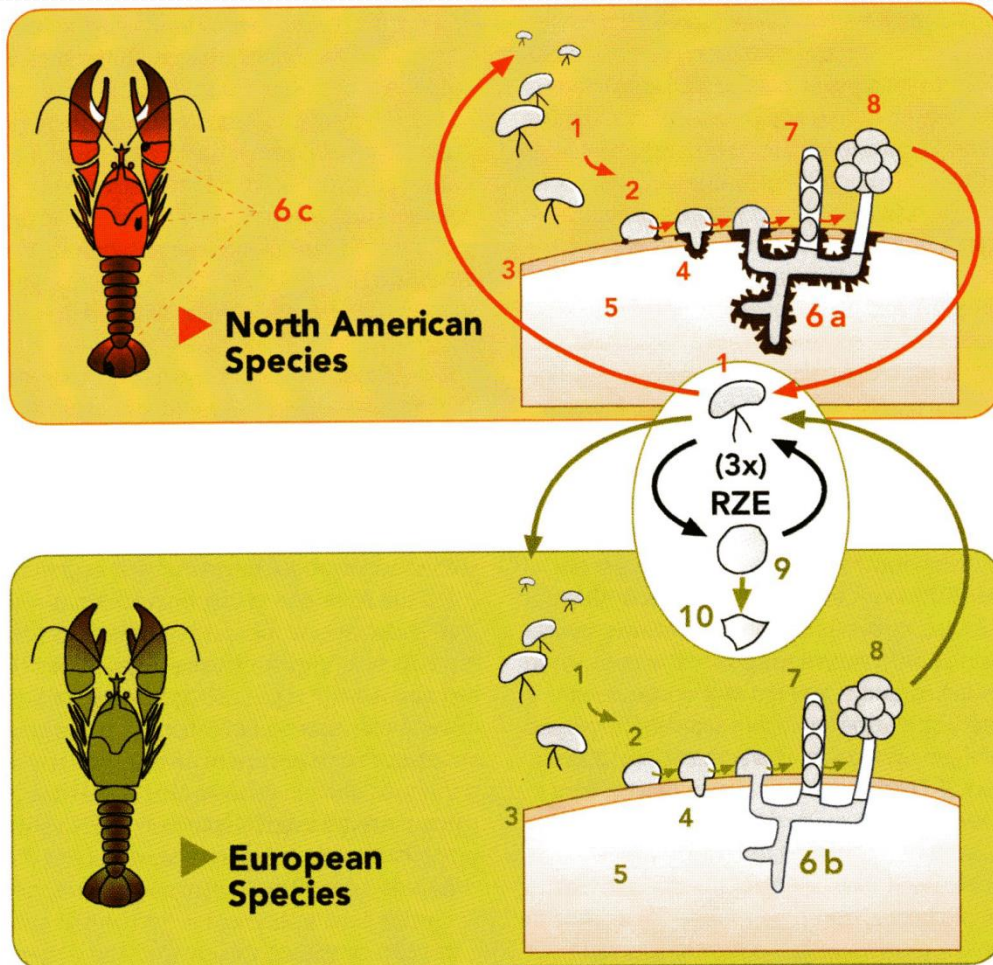
Historique de la Peste : Introduction et vague d'expansion en Europe

■ Documented outbreak

■ Assumed outbreak

- La Peste arrive en
 - Suède en 1907
 - Norvège en 1971
- À partir de 1995 la plupart des pays d'Europe sont touchés

La peste des écrevisses (*Aphanomyces astaci*, oomycète)



P. leniusculus infectée, porteuse saine



A. astacus morte (Plivitce, Croatie)

Détection de la peste



- Broyage de la cuticule (partie ventrale abdomen, uropodes)
- Extraction d'ADN
- Q-PCR (amplification de l'ADN) avec des amorces spécifiques (Vrálstad et al. 2009)

Vol. 97: 113–125, 2011 doi: 10.3354/dao02411	DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS Dis Aquat Org	Published December 6
Re-examination of the prevalence of <i>Aphanomyces astaci</i> in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan MGB real-time PCR Eva Kozubíková^{1,*}, Trude Vrålstad^{2,3}, Lenka Filipová^{1,4}, Adam Petrusek¹		
Niveau d'infection	Signification	
A ₀	Négatif	
A ₁	Traces d'A. astaci	
A ₂	Très faible présence	
A ₃	Faible présence	
A ₄	Présence modérée	
A ₅	Haut niveau de présence	
A ₆	Très haut niveau de présence	
A ₇	Niveau de présence exceptionnellement fort	

Taux d'infestation des populations de *P. leniusculus*

Echantillonnage :

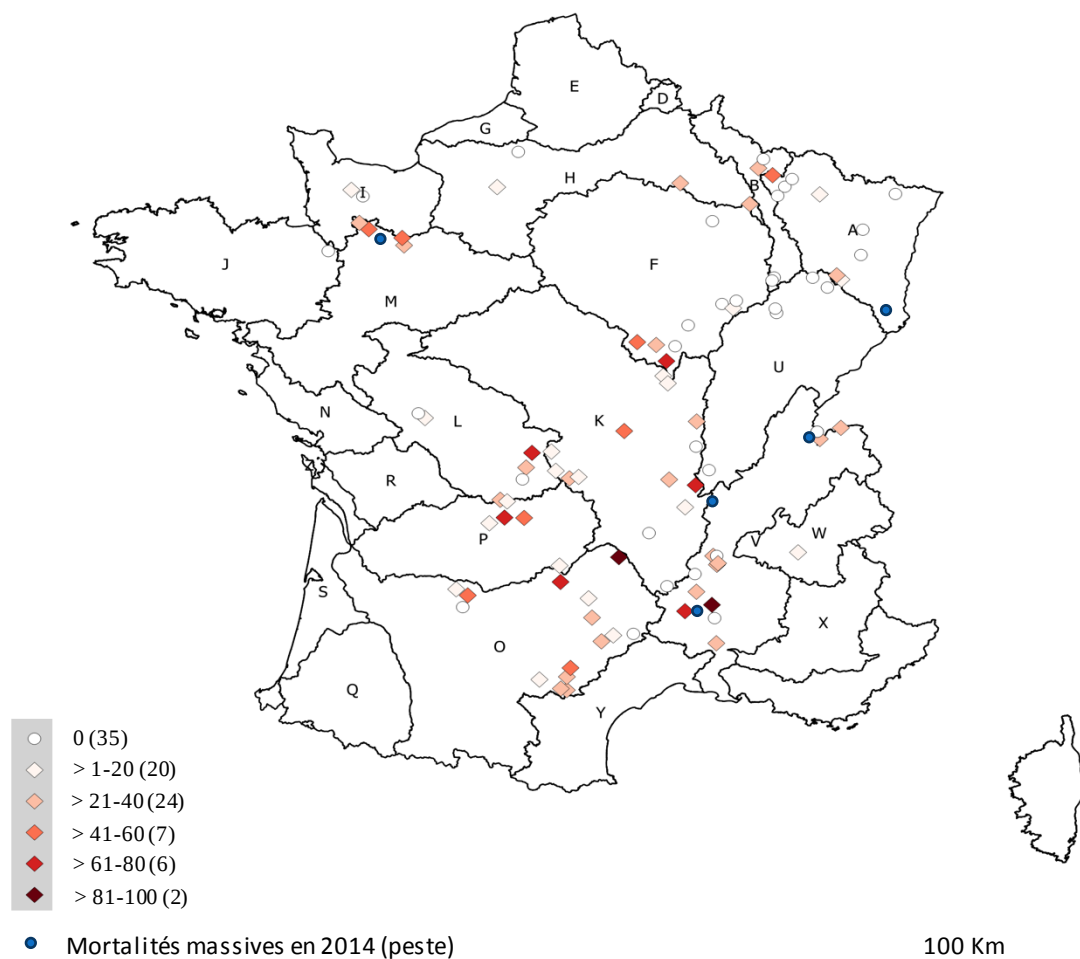
- 89 populations

- 1030 individus

55 populations infestées sur
89 . (1030)

Filipova et al. 2013

Grandjean et al. 2017



ADNe pour la détection d'écrevisses



Journal of Applied Ecology



Journal of Applied Ecology 2014, 51, 871–879

doi: 10.1111/1365-2664.12262

Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds

Anne Tréguier^{1,2,3}, Jean-Marc Paillisson³, Tony Dejean⁴, Alice Valentini⁴, Martin A. Schlaepfer^{1,2} and Jean-Marc Roussel^{1,2}

Etude : Comparaison de deux techniques d'échantillonnage de *P.clarkii* :



ADNe vs. Nasses



Méthodes d'échantillonnage

1. ADNe = Détection de l'ADN d'une espèce à partir d'eau de la mare

- 120m de périmètre maximum
- Prélèvement de 20 x 40 mL
- 6 sous-échantillons de 15 mL
- 12 qPCR sur 1 des sous-échantillons



2. Nasses = Piégeage d'écrevisses

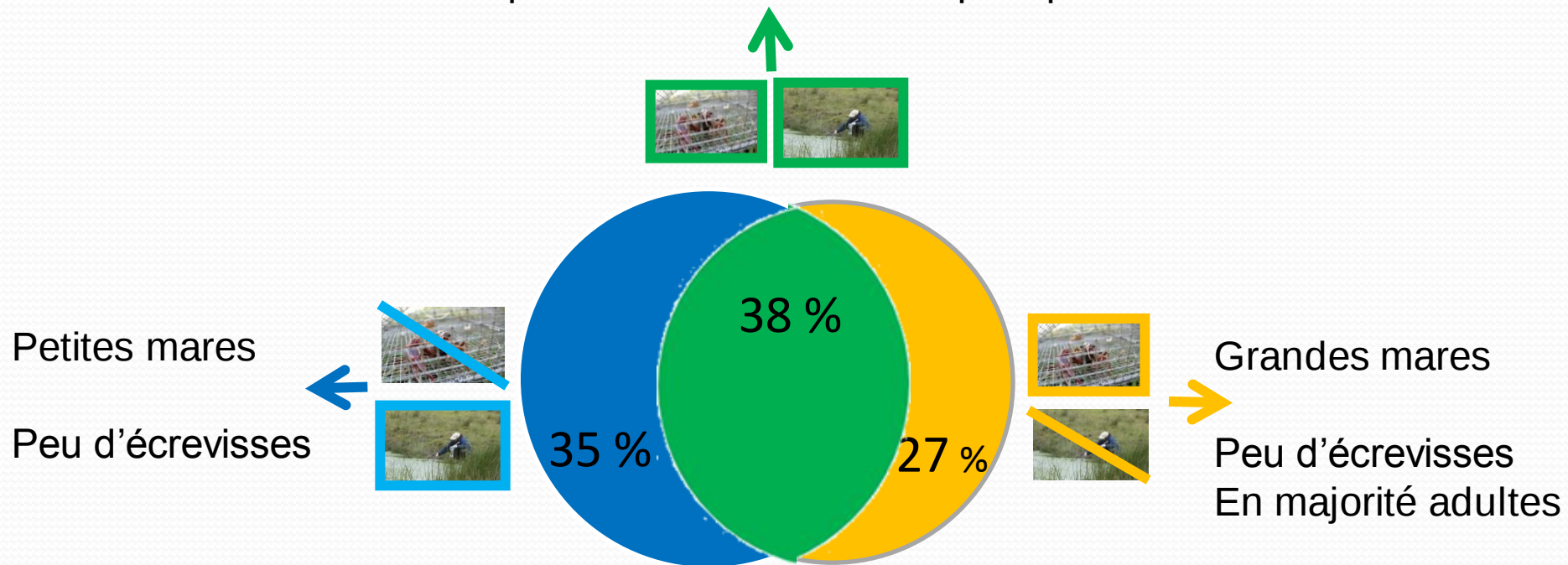
- 24 h
- Nombre de nasses : 1 pour 10 m de rive
- CPUE (Catch Per Unit Effort)
- 2 classes de taille



Détection par les 2 méthodes : réseau de 158 mares

Taux de détectabilité ADNe 59 %

Beaucoup d'écrevisses - Beaucoup de petites



-Conclusions

- Nasses & ADNe : complémentaires
- ADNe : Efficacité de détection supérieure
- Nasses : Estimations fiables de l'abondance

ADNe pour la détection d'écrevisses

6 papiers scientifiques

Méthodologie non standardisée

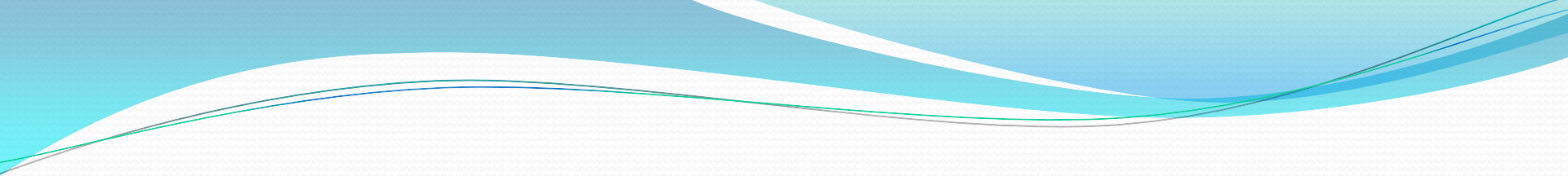
Auteur	Espèces	Gene	Taille produit	Q-PCR	Site	Nbre de Site	Vol. Eau échantillonné/site	Volume filtré
Treguier et al 2014	<i>P. clarkii</i>	COI	65	Sonde Taq man	Etang < 120 m	158	40 ml X 20	15ml
Mauvisseau et al 2016	<i>P. leniusculus</i>	COI	114	Taq man et SYBR green	Etangs 0.07 à 16 Ha	31	15 ml X 10	15 ml
	<i>O. limosus</i>	COI	78					
	<i>P. clarkii</i>	COI	73					
Dougherty et al 2016	<i>O. rusticus</i>	COI	128	Eva green	Lacs 61 à 338 ha	12	250 ml X 10	250 ml X 10
Ikeda et al 2017	<i>C. japonicus</i>	COI	124	Sonde Taq man	Cours d'eau, L < 2 m	21	1 L	1 L
Cai et al. 2017	<i>P. clarkii</i>	COI	65	Sonde Taq man	Etang	32	1L X 15	15 L
Larson et al 2017	<i>O. rusticus</i>	COI	128	Eva green	Lacs et rivières	14 dont 5 lacs	250 ml X 10	250 ml X 10
	<i>P. leniusculus</i>	COI	184	Eva green	Lacs	11	250 ml X 10	
Agersnap et al 2017	<i>A. astacus</i>	COI	45 et 65	Sonde Taq man	Lacs, rivière	23	500 ml à 14 L	500ml à 14 L
	<i>P. leniusculus</i>	COI	45 et 65	Sonde Taq man				
	<i>A. leptodactylus</i>	COI	45 et 65	Sonde Taq man				

Taux de Détection

Auteur	Espèces	Nbre de Site	Détection
Ikeda et al 2017	<i>C. japonicus</i>	21	100%
Treguier et al 2014	<i>P. clarkii</i>	158	59%
Cai et al. 2017	<i>P. clarkii</i>	32	68%
Dougherty et al 2016	<i>O. rusticus</i>	12	100%
Larson et al 2017	<i>O. rusticus</i>	14 dont 5 lacs	100%
	<i>P. leniusculus</i>	11	66%
Agersnap et al 2017	<i>A. astacus</i>	23	100%
	<i>P. leniusculus</i>		100%
	<i>A. leptodactylus</i>		100%
Mauvisseau et al 2016	<i>P. leniusculus</i>	31	100%
	<i>O. limosus</i>		100%
	<i>P. clarkii</i>		100%

Conclusions

- Plus les volumes d'eau prélevés sont importants, meilleure est la détection
- Plus les abondances d'écrevisses sont élevées, meilleure est la détection



Résultats préliminaires d'étude en cours en France

- Détection de l'écrevisse à pattes blanches, *Austropotamobius pallipes* en milieux lotique et stagnant (région nouvelle aquitaine)
- Etude préliminaire de détection d'*Aphanomyces astaci* sur le bassin de la Sélune (Haute-Normandie)

- Détection de l'écrevisse à pattes blanches en milieu lotique (2015)

- 6 sites en milieu lotique (densité forte et faible), 3 périodes d'échantillonnage de Mai à Novembre : influence de la saison sur la détectabilité

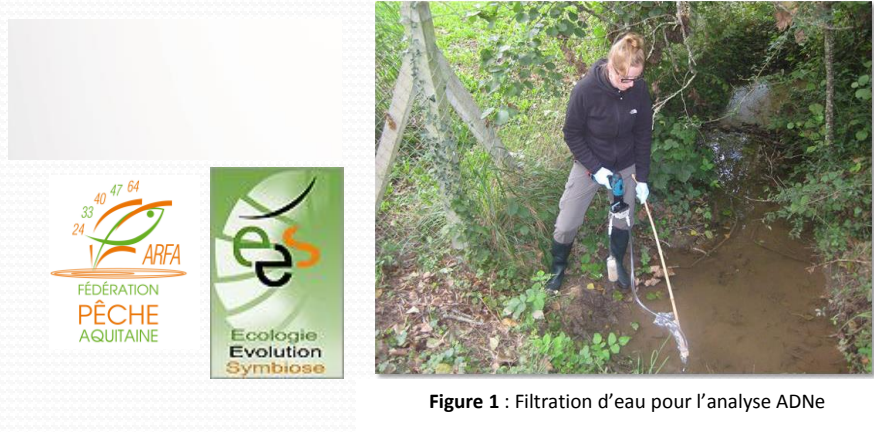


Tableau 1 : Nombre de répliques positifs pour la détection de l'Ecrevisse à pattes blanches en Mai, Août et Novembre

Site - Prélèvement	Nombre de répliques positifs en Mai	Nombre de répliques positifs en Août	Nombre de répliques positifs en Novembre	Densité observée en 2013
Site A - 1	0/12	0/12	10/12	Forte
Site A - 2	2/12	0/12	2/12	
Site A - 3	4/12	0/12	6/12	
Site B - 1	0/12	3/12	7/12	Forte
Site B - 2	0/12	1/12	3/12	
Site B - 3	9/12	1/12	6/12	
Site C - 1	0/12	0/12	0/12	X
Site C - 2	0/12	0/12	0/12	
Site C - 3	0/12	0/12	0/12	
Site D - 1	0/12	0/12	1/12	Faible
Site D - 2	1/12	0/12	0/12	
Site D - 3	0/12	0/12	-	
Site E - 1	6/12	0/12	1/12	Faible
Site E - 2	5/12	3/12	3/12	
Site E - 3	2/12	1/12	1/12	
Site F - 1	0/12	0/12	0/12	Faible
Site F - 2	0/12	0/12	1/12	
Site F - 3	0/12	0/12	0/12	

- Détection de l'écrevisse à pattes blanches en milieu stagnant (2016)

- 3 sites en milieu lotique, 6 sites en milieu stagnant



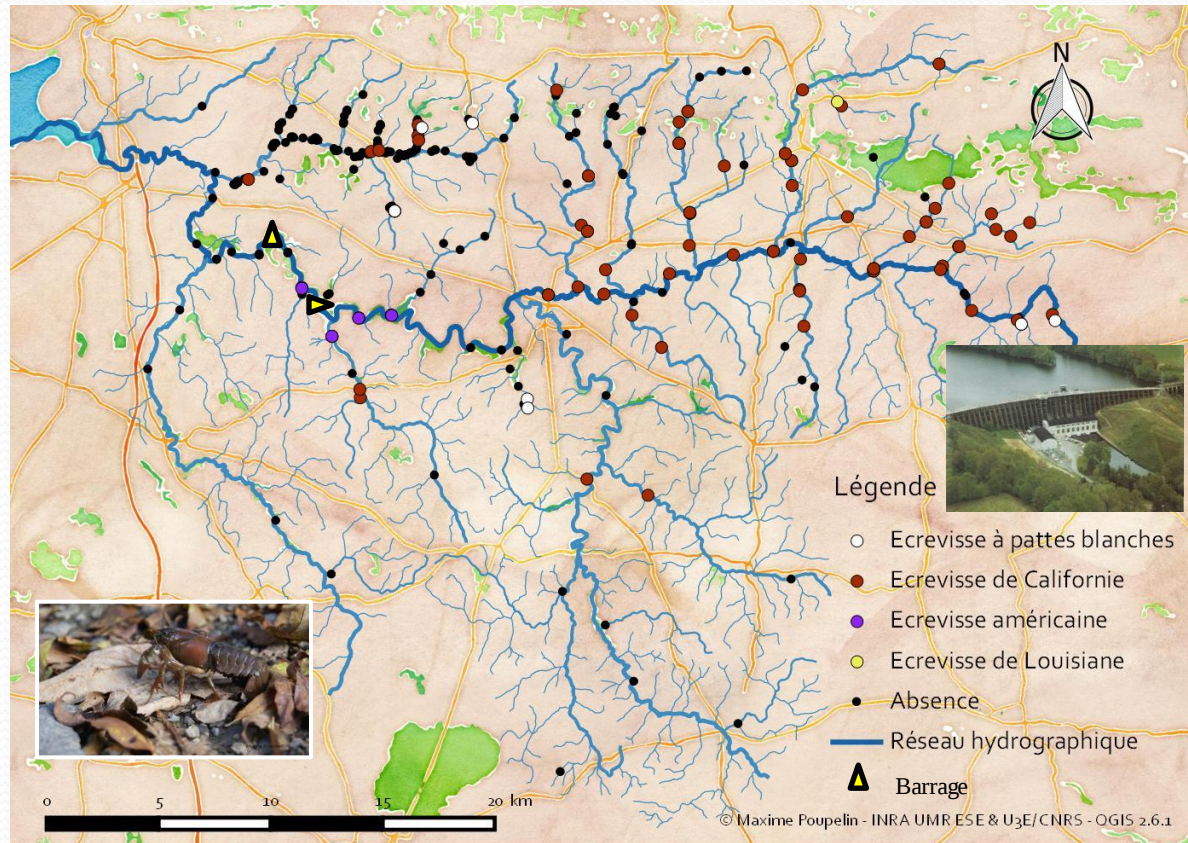
Tableau 1 : Résultats de la détection de l'Ecrevisse à pattes blanches par l'ADN environnemental (approche spécifique) sur les 9 sites étudiés

Type	Site	Prélèvement	Détection de l'ADN d'Ecrevisses à pattes blanches	Nombre de réplicats positifs
Milieux courants	JUREN	1	OUI	1/12
		2		3/12
		3		1/12
	FONTR	1	OUI	7/12
		2		7/12
		3		6/12
	NAVAR	1	NON	0/12
		2		0/12
		3		0/12
Milieux stagnants	E104	1	OUI	2/12
	E121	1	OUI	1/12
	E122	1	OUI	1/12
	E124	1	NON	0/12
	E129	1	NON	0/12
	E136	1	OUI	6/12



Présence d'inhibiteur ? Caractéristiques de l'eau ?

- Etude préliminaire de détection d'*Aphanomyces astaci* sur le bassin de la Sélune (Haute-Normandie)



Eric Petit et al, UMR ESE, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes

Jean-Marc Paillisson, UMR ECOBIO, CNRS, Université Rennes 1, Rennes

Frédéric Grandjean, Carine Delaunay, UMR EBI, CNRS, Université de Poitiers



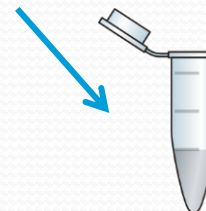
Prélèvement d'eau (500 ml X4)

Filtration

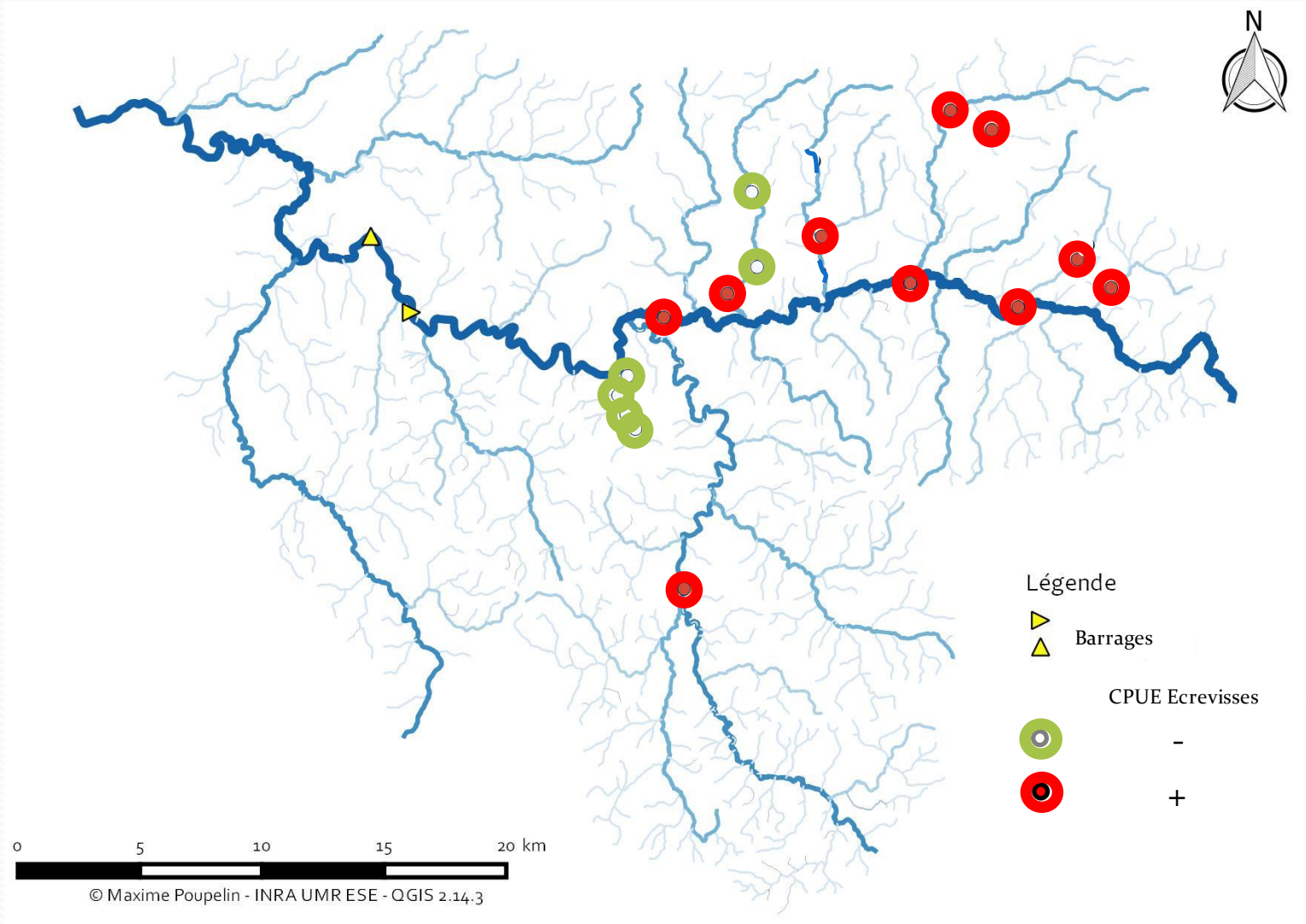


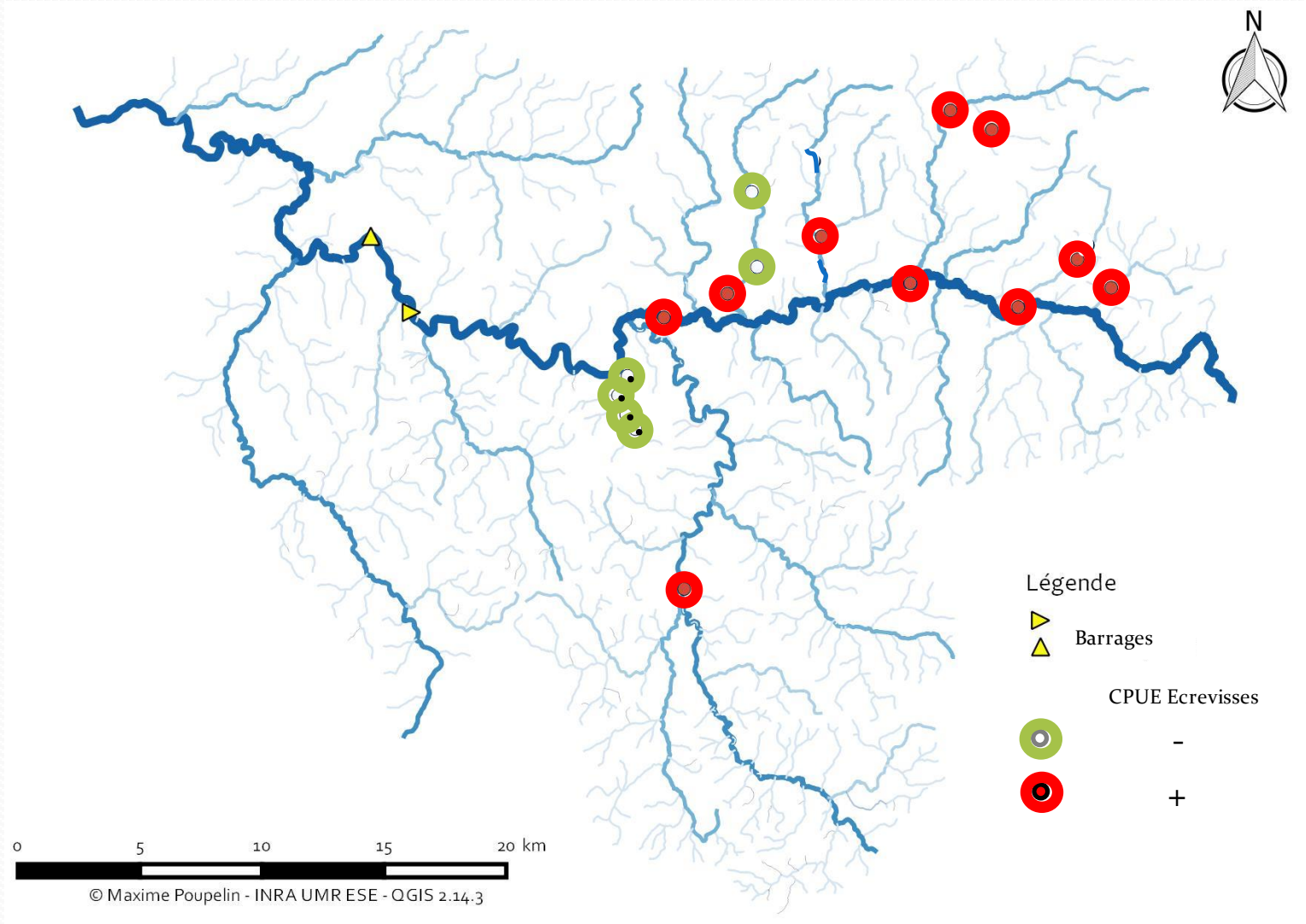
Support de filtration
NALGENE

Membrane
filtrante en nitrate
cellulose, maille
0,45µm



Extraction d'ADN
(CTAB)





Conclusions

- Forte efficacité (hôte/peste)
- Effet de la saison sur l'efficacité de la détection
- Influence du volume prélevé sur la détection (notamment en milieu stagnant)
- Comment les paramètres environnementaux (physico-chimie) influent sur la détectabilité
- Difficile de relier l'abondance estimée par capture/la quantité d'ADNe

