

ETAT DES LIEUX DE LA RECHERCHE SUR LES ÉCREVISSSES EN FRANCE

Frédéric Grandjean, Laboratoire Ecologie et Biologie des interactions
UMR 7267 , équipe Ecologie, Evolution , Symbiose
Université de Poitiers



Photo: J. Mate

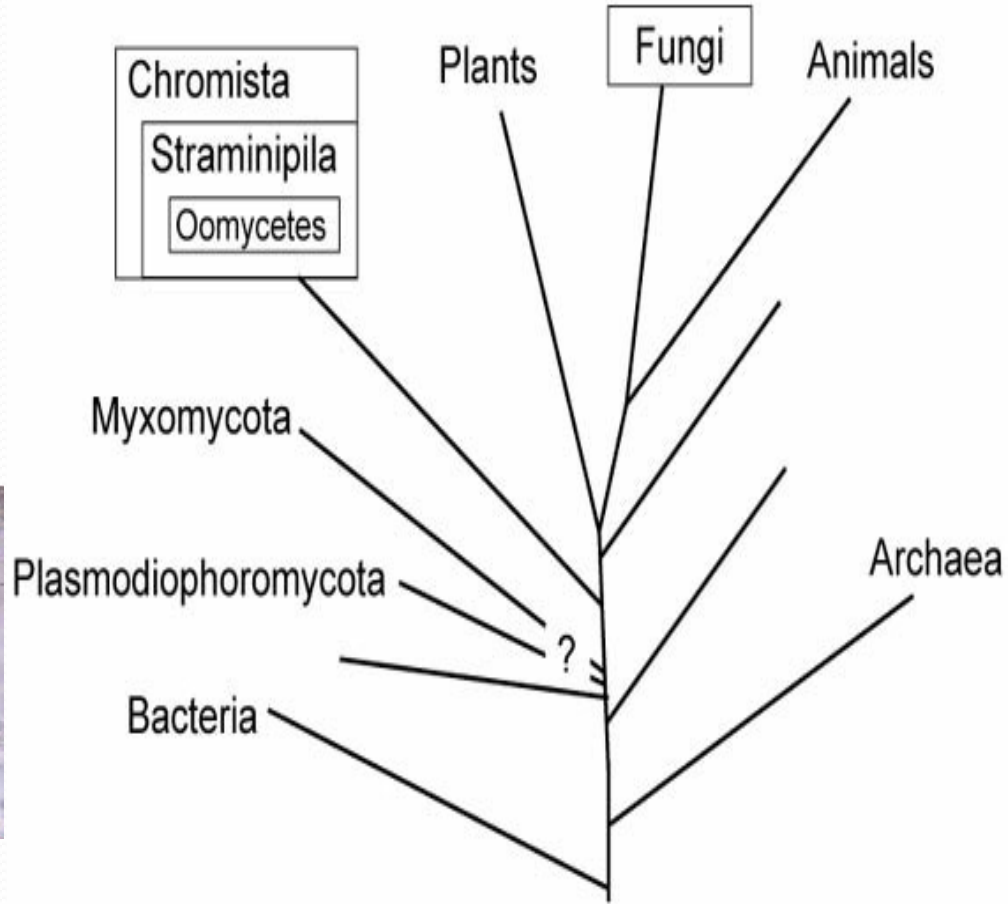
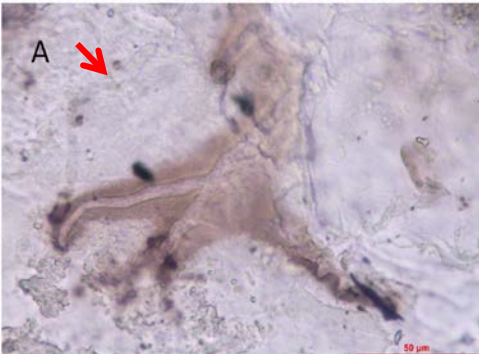
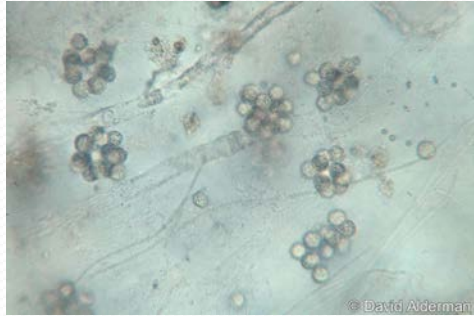


Sommaire

- Avancées scientifiques sur l'aphanomyose
- Autre pathologie : virus
- Détection écrevisses/peste par ADN env
- Bioindicateurs pour la sélection de site pour le repeuplement : les éphéméroptères

Quelques mots sur *Aphanomyces astaci*

Aphanomyces astaci

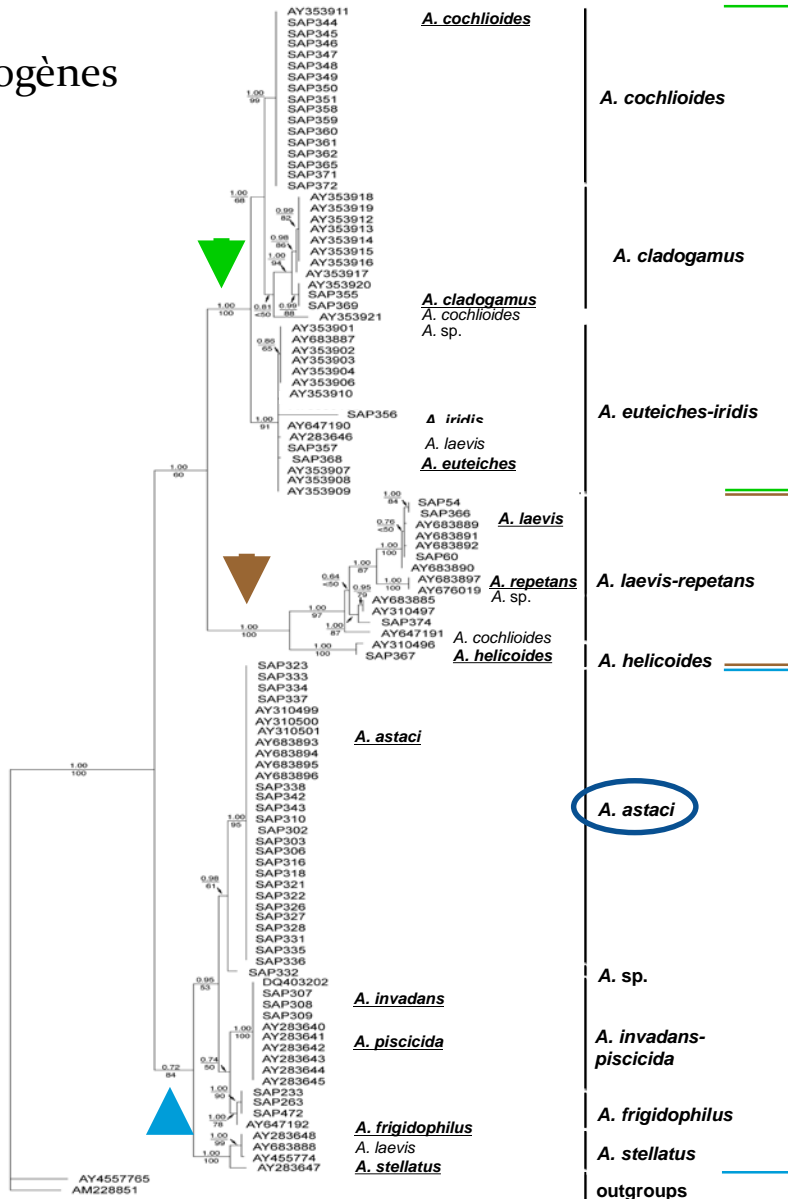
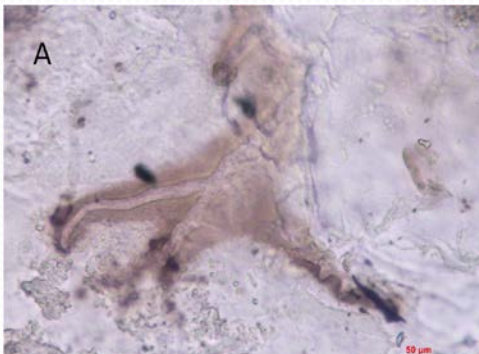
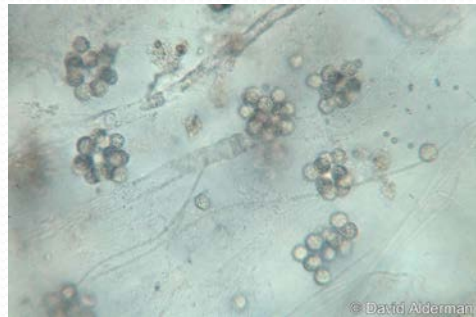


Link *et al.* 2002

Position phylogénétique d' *A. astaci*

Classe des Oomycètes

En majorité, ce sont des pathogènes



plant
parasitic
lineage

saprotrophic/
opportunistic
lineage

animal
parasitic
lineage

A. astaci

- *Aphanomyces astaci* (Oomycètes)
- Origine : Amérique du Nord
- Hôte spécifique : écrevisses

Aphanomyces astaci

100 OF THE WORLD'S WORST INVASIVE ALIEN SPECIES

A SELECTION FROM THE GLOBAL
INVASIVE SPECIES DATABASE



Published by



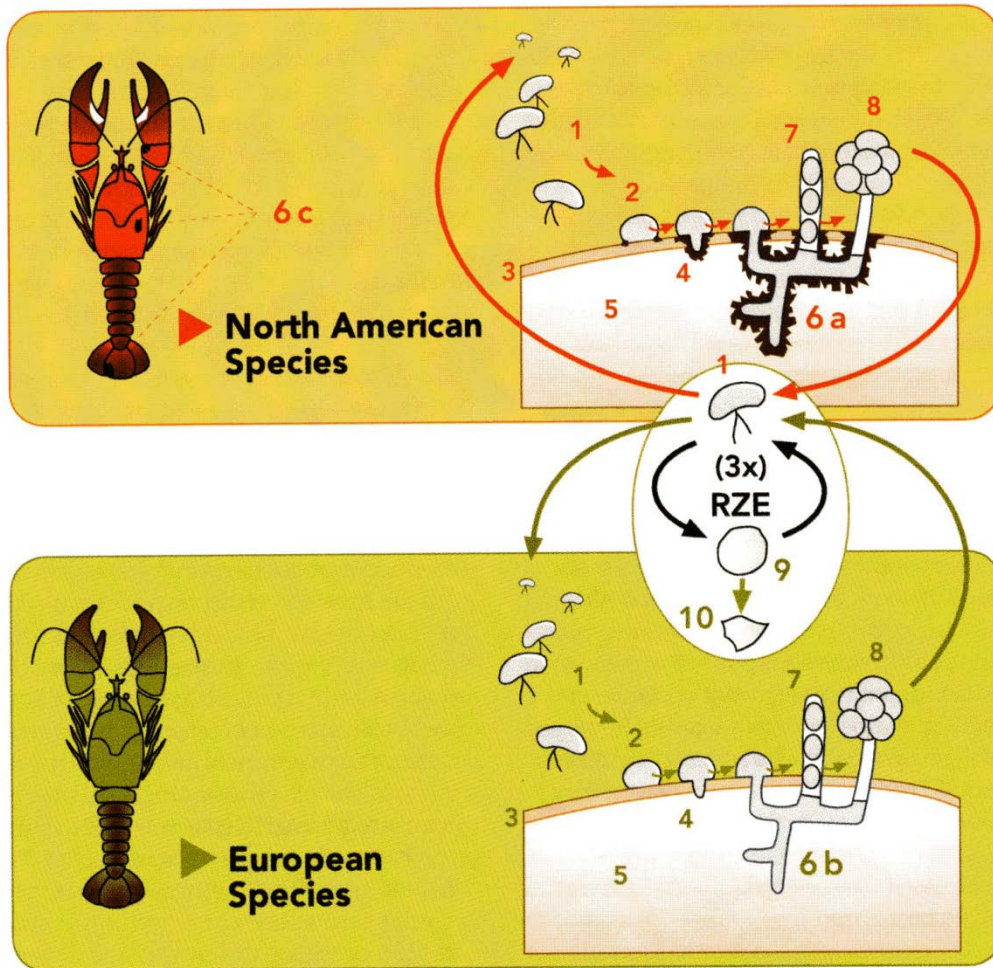
Contribution to the Global Invasive Species Programme (GISP)



In Association with

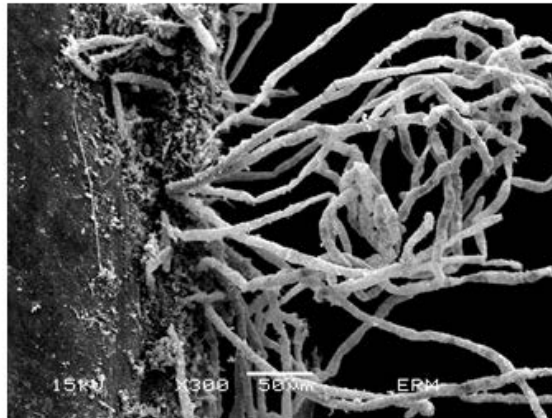


Profil d'infection d' *A. astaci*



Mortalité massive due à la peste

- Ne touche que les écrevisses; poissons ou autres animaux ne sont pas affectés
- Animaux morts, mourants et apparemment « normaux » peuvent être observés simultanément
- Mortalité s'étend vers l'amont
- Ecrevisses mourantes déambulent de jour



1895

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

- Mortalité massive observée
- Mortalité suspectée



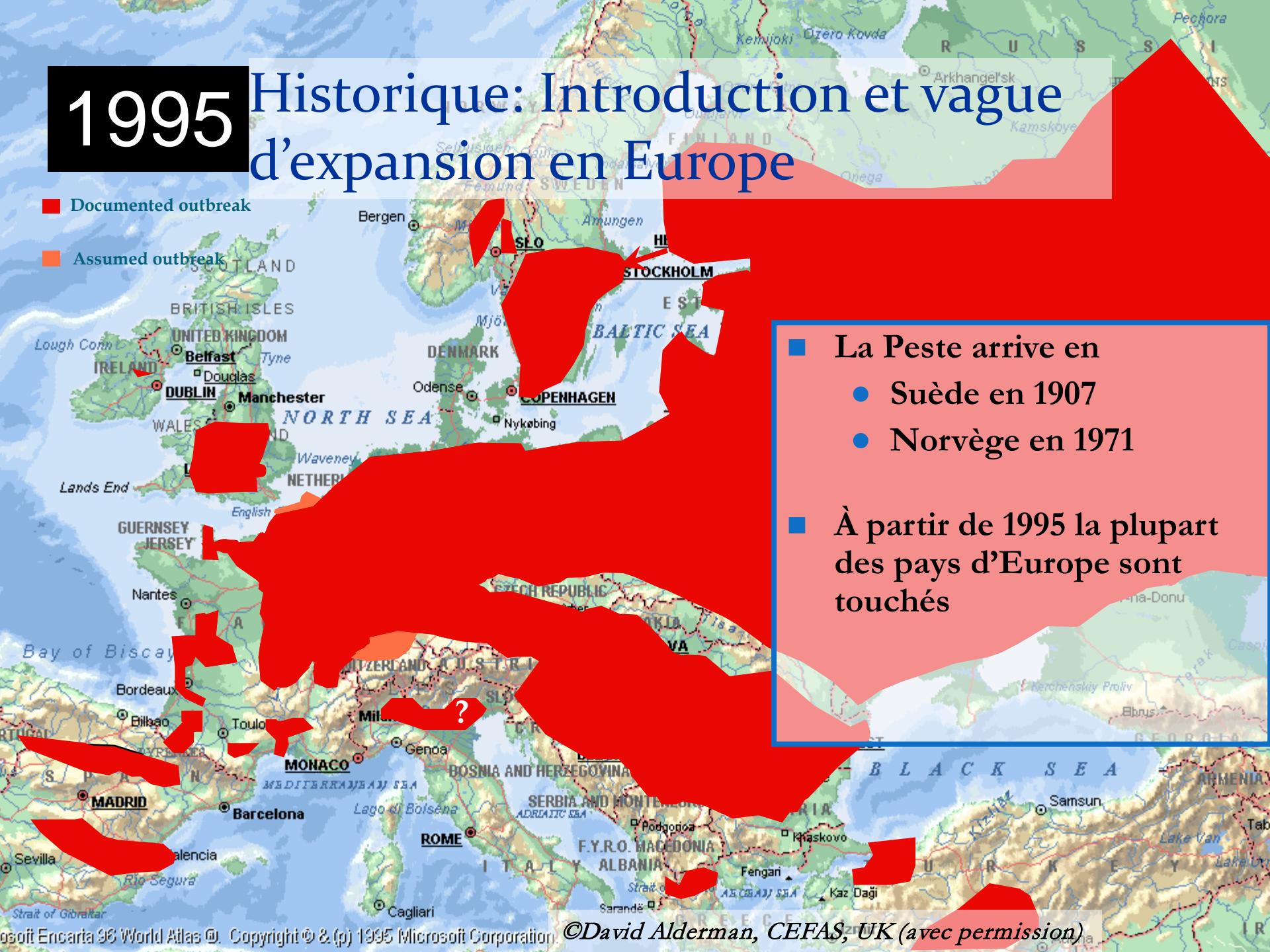
- Mortalités massives reportée en Italie
- 10 ans plus tard même observations en France
- La peste s'étend alors rapidement à travers l'Europe

1995

Historique: 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 vieille menace est de retour ...



Available online at www.sciencedirect.com



Aquaculture 274 (2008) 208–217

Aquaculture

www.elsevier.com/locate/aqua-online

The old menace is back: Recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic

E. Kozubíková^{a,*}, A. Petrušek^{a,b}, Z. Ďuriš^c, M.P. Martín^d, J. Diéguez-Urbeondo^d, B. Oidtmann^e

^a Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Ecology, Viničná 7, Prague 2, CZ-12844, Czech Republic

^b University of South Bohemia in České Budějovice, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Zátěží 728/II, Vodňany, CZ-38925, Czech Republic

^c University of Ostrava, Department of Biology, Chittusihho 10, Ostrava, CZ-71000, Czech Republic

^d Real Jardín Botánico CSIC, Departamento de Micología, Plaza Murillo 2, 28014 Madrid, Spain

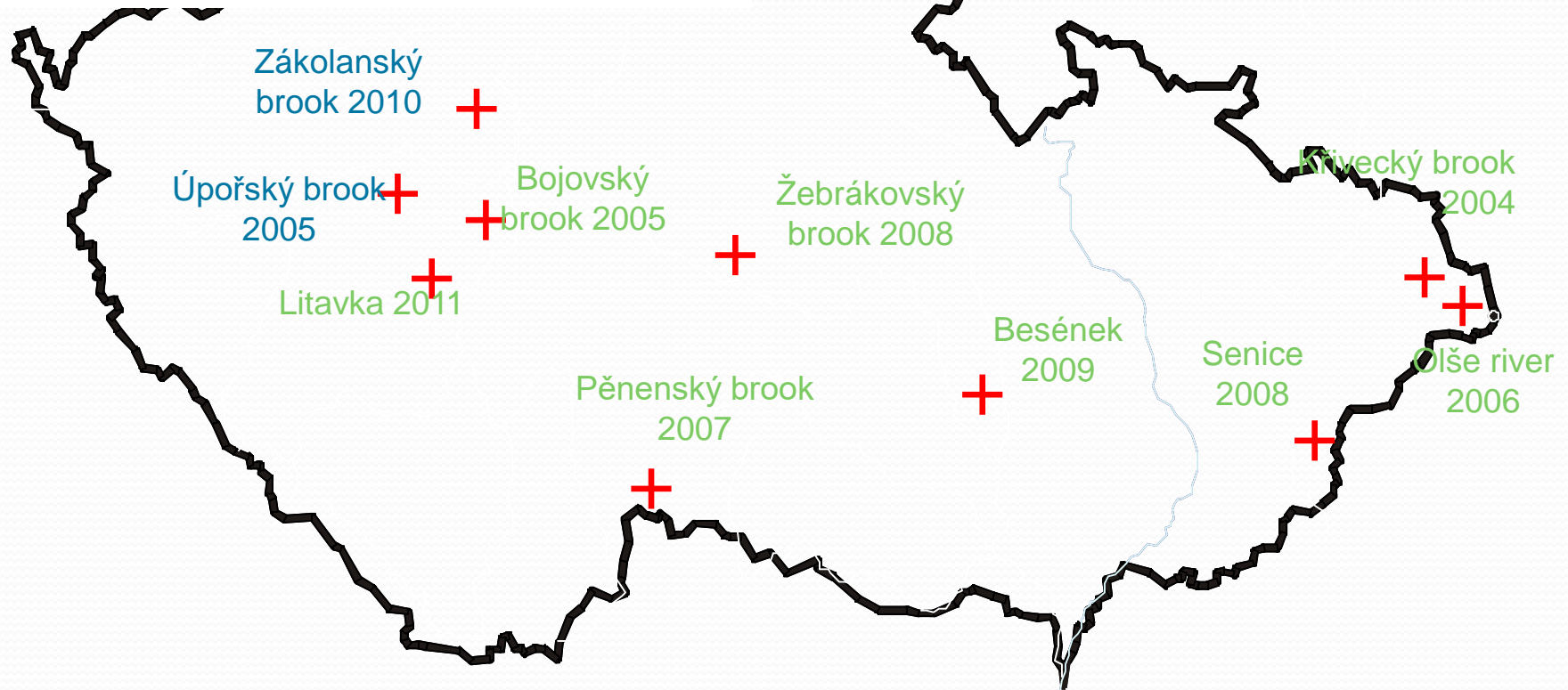
^e CEFAS Weymouth Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset DT4 8UB, United Kingdom

Received 5 September 2007; received in revised form 2 November 2007; accepted 12 November 2007

-10 Mortalités (2004-2011) +

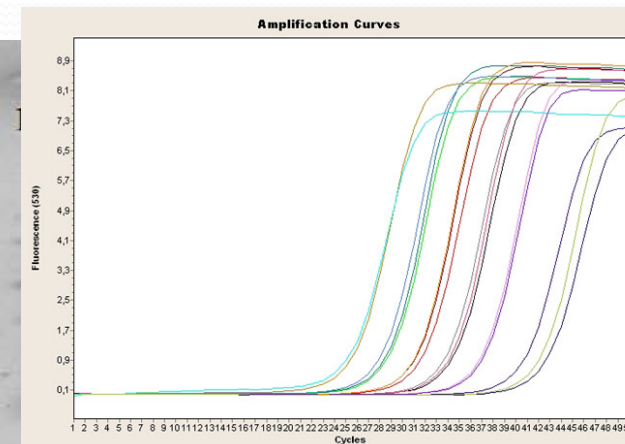
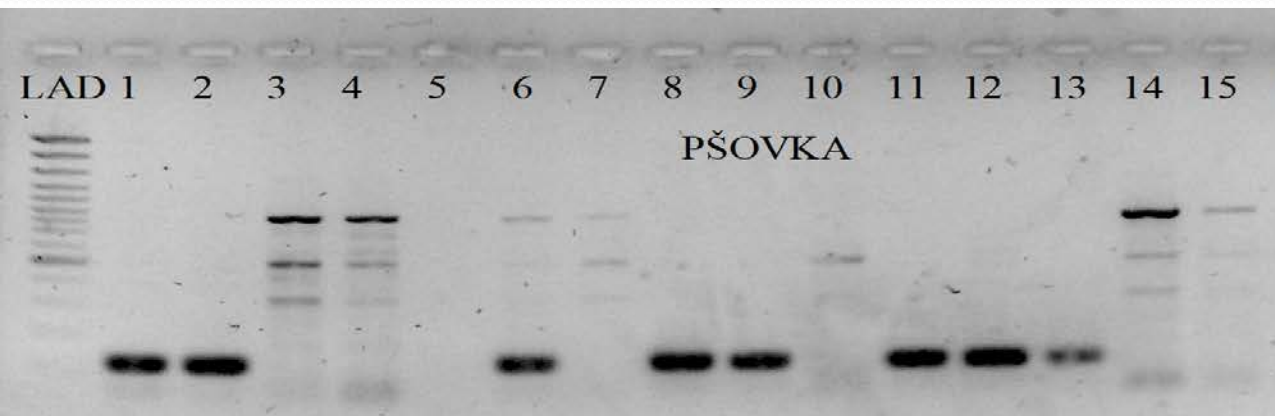
- 8 pour *A. astacus*

- 2 pour *A. torrentium*



Détection d' *A. astaci*

1. Extraction d'ADN à partir d'un morceau de la cuticule abdominale ventrale
2. Amplification (PCR) de l'ADN du pathogène par utilisation d'amorce spécifique (ITS région nucléaire ribosomale) ou PCR quantitative



Détection d' *A. astaci*

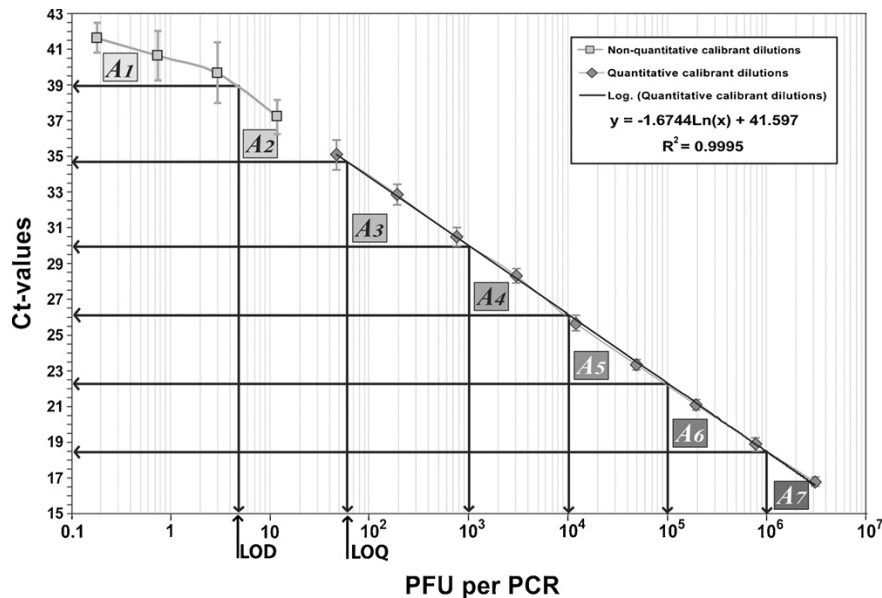
Vol. 07: 113–125, 2011
doi: 10.3354/dao02411

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS
Dis Aquat Org

Published December 6

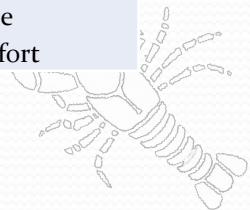
Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan MGB real-time PCR

Eva Kozubíková^{1,*}, Trude Vrålstad^{2,3}, Lenka Filipová^{1,4}, Adam Petrušek¹



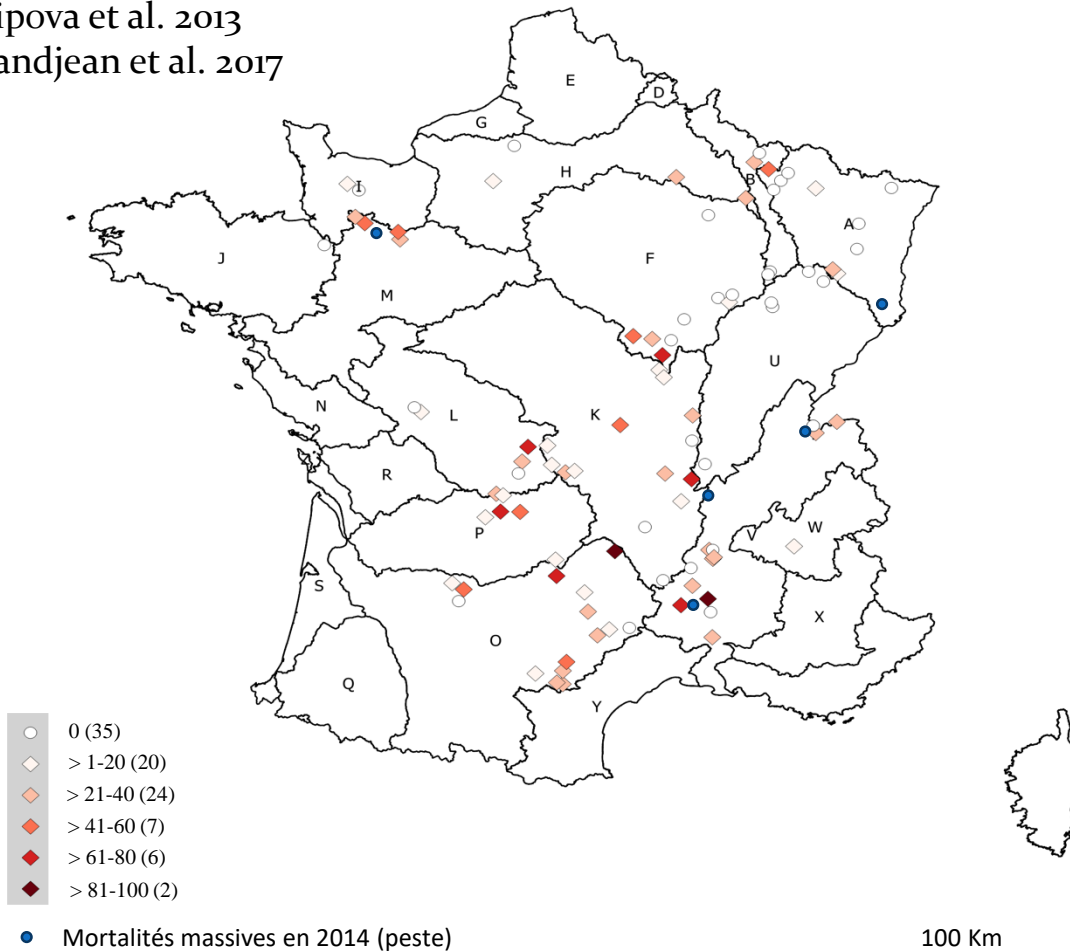
Niveau d'infection	Signification
A0	Négatif
A1	Traces d' <i>A. astaci</i>
A2	Très faible présence
A3	Faible présence
A4	Présence modérée
A5	Haut niveau de présence
A6	Très haut niveau de présence
A7	Niveau de présence exceptionnellement fort

Table 1 : Tableau récapitulatif des différents niveaux d'infection, (Vrålstad *et al.*, 2009)



Taux d'infestation chez *P. leniusculus* en France

Filipova et al. 2013
Grandjean et al. 2017



Echantillonnage :
- 89 populations
- 1030 individus

55 populations infestées sur
89 . (1030)

Niveaux d'infestation :

A1	134 individus
A2	143
A3	54
A4	4
A5	3

Les taux d'infestation varient de 0 % à 100 %

Pas corrélation entre taux d'infestation et distance géographique

La peste des écrevisses

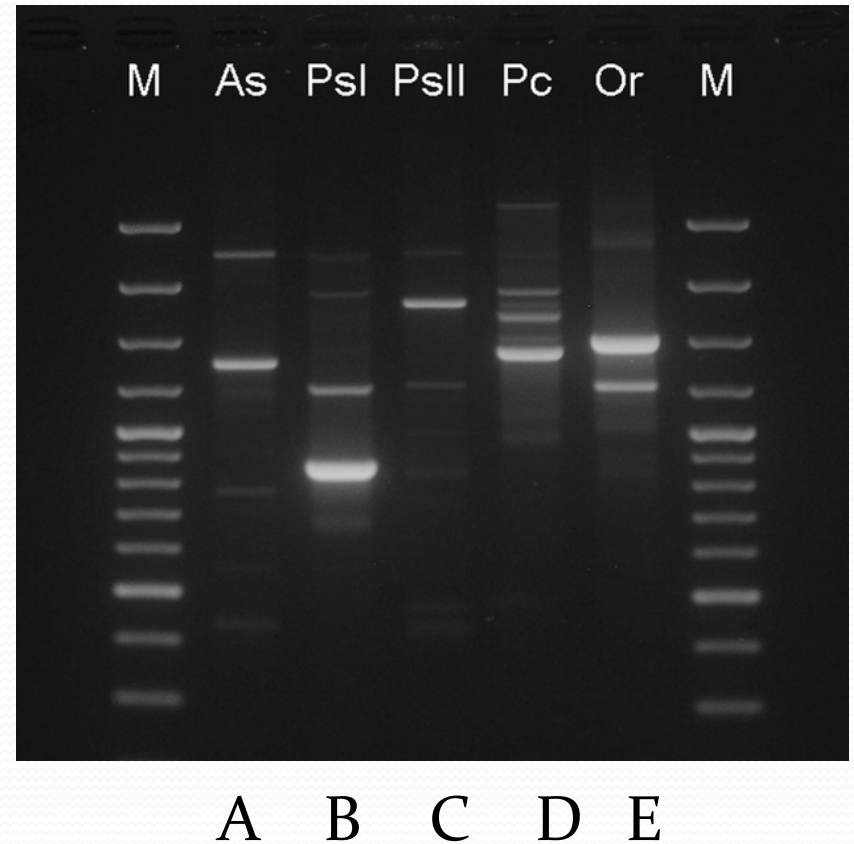
- *Pacifastacus infectées par la peste*



Aphanomyces astaci

5 groupes définis par RAPD :

A (*A. astacus*, hôte de base inconnu,
B et C (*P. leniusculus*),
D (*P. clarkii*),
E (*O. limosus*)



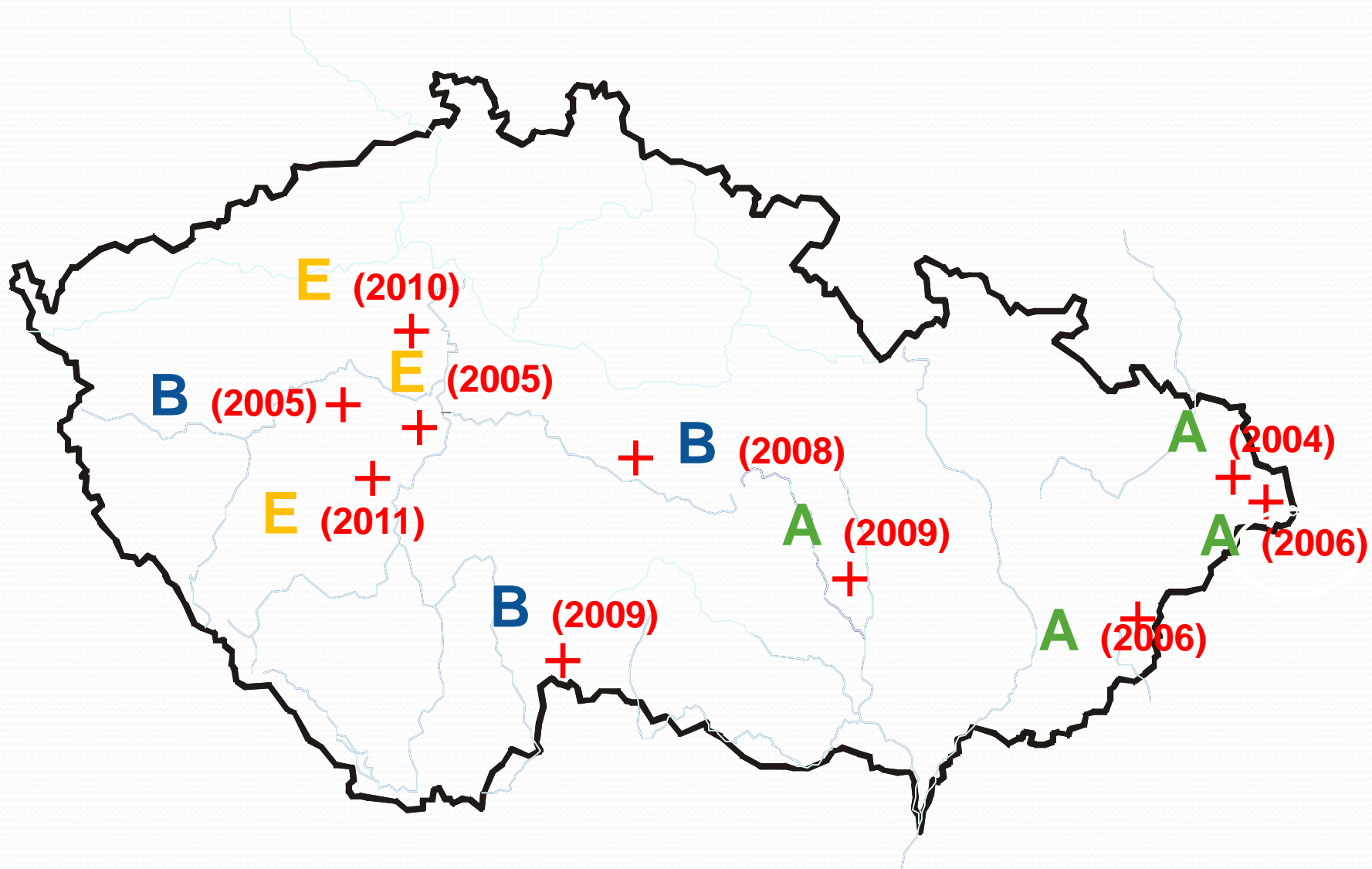
Profil RAPD pour les 5 souches décrites

Nouveau marqueur moléculaire : microsatellites

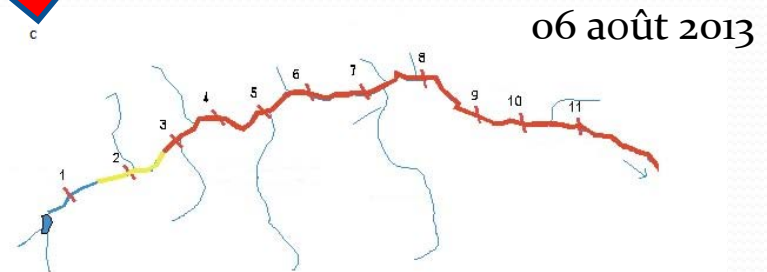
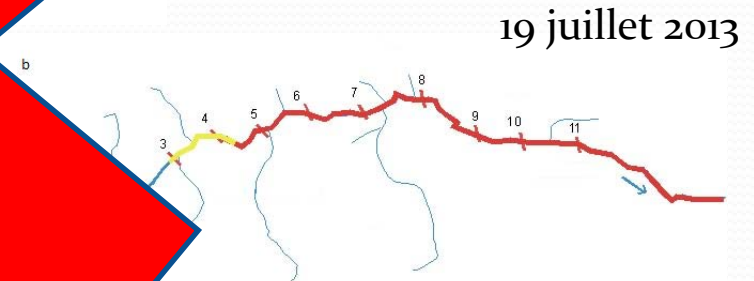
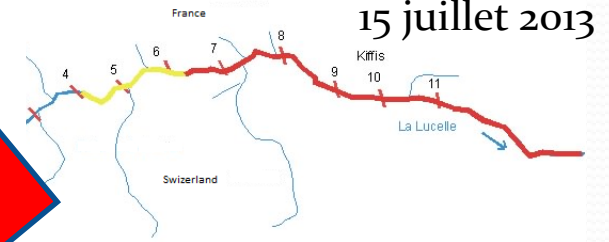
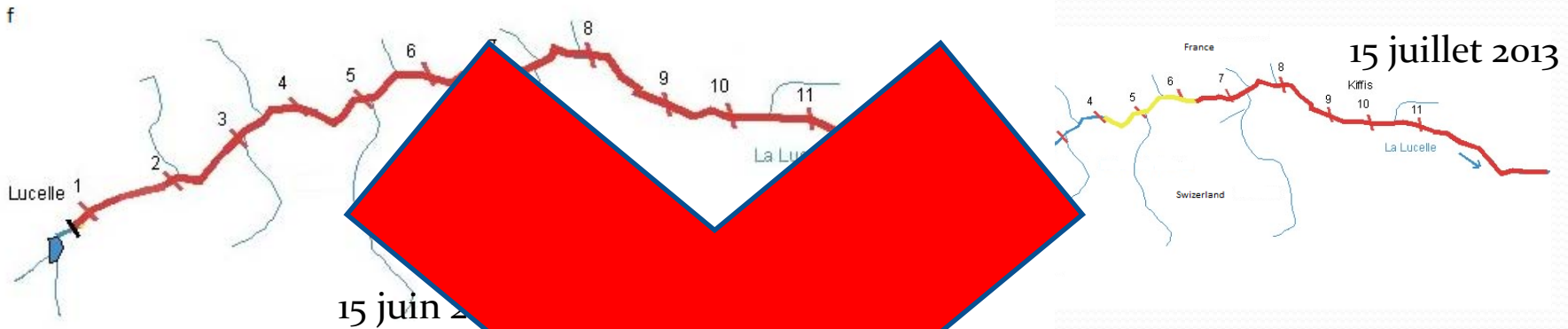
Repeat Motif	Group of <i>A. astaci</i>						Outbreak	<i>A. frigidophilus</i>	<i>A. repetans</i>	<i>Saprolegnia sp</i>	<i>S. parasitica</i>	<i>S. ferax</i>	<i>S. australis</i>
	A ₁	A ₂	B	C	D	E							
AT ₉	97	97	99/101	101	101	99	99/101	97/197	77/197	99/107	197	-	109
AT ₈	160	160	142	154	138	150	142/150	160/182	160	120/160	-	-	130/138
CA ₈	85	85	85	85	85	85	85	-	-	-	-	-	-
TA ₈	103	103	87	87	131	87/89	87	-	-	-	-	-	-
AT ₈	-	-	95	95	95	95	95	-	-	-	-	-	-
CGA ₈	157	157	148	148	148	148/157	148	-	-	-	-	-	-
TA ₈	207	207	215	191	203	207	205/215	113/167	-	139/175	139	-	-
GTC ₈	240	240	240	240	240	240	240	-	-	-	-	-	-
AT ₇	180	180	164/168	164/168	180	168/182	164	-	-	-	-	-	-
AT ₇	142	142	132	132	142	132/142	132/138	-	-	-	-	-	-
CA ₇	212	212	212/214	212/214	214	212/214	212/214	-	-	-	-	-	-
CA ₆	226/240	-	226/240	226	234	234/240	226	-	-	-	-	-	-
TG ₁₀	194	194	202	202	194	194/202	202	-	-	-	-	-	-
TG ₆	246	246	248	248	250	248	248	248	248	-	248	248	-

Combinaison de 9 microsatellites pour la discrimination des souches
Grandjean et al. 2014

Epidémiologie des mortalités dues à la peste en Rép. Tchèque



Peste de l'écrevisse : La Lucelle (68) 2014



vers une résistance des populations natives ?

Diseases of Aquatic Organisms

DAO 102:129-136 (2012) - doi:10.3354/dao02547

Differing virulence of *Aphanomyces astaci* isolates and elevated resistance of noble crayfish *Astacus astacus* against crayfish plague

J. Makkonen^{1,*}, J. Jussila¹, R. Kortet², A. Vainikka², H. Kokko¹

¹Department of Biology, University of Eastern Finland, 70211 Kuopio, Finland

²Department of Biology, University of Eastern Finland, 80101 Joensuu, Finland

Vol. 103: 157–169, 2013
doi: 10.3354/dao02567

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS
Dis Aquat Org

Published March 26

Aphanomyces astaci in wild crayfish populations in Slovenia: first report of persistent infection in a stone crayfish *Austropotamobius torrentium* population

Darja Kušar¹, Al Vrezec², Matjaž Ocepek¹, Vlasta Jencič^{3,*}

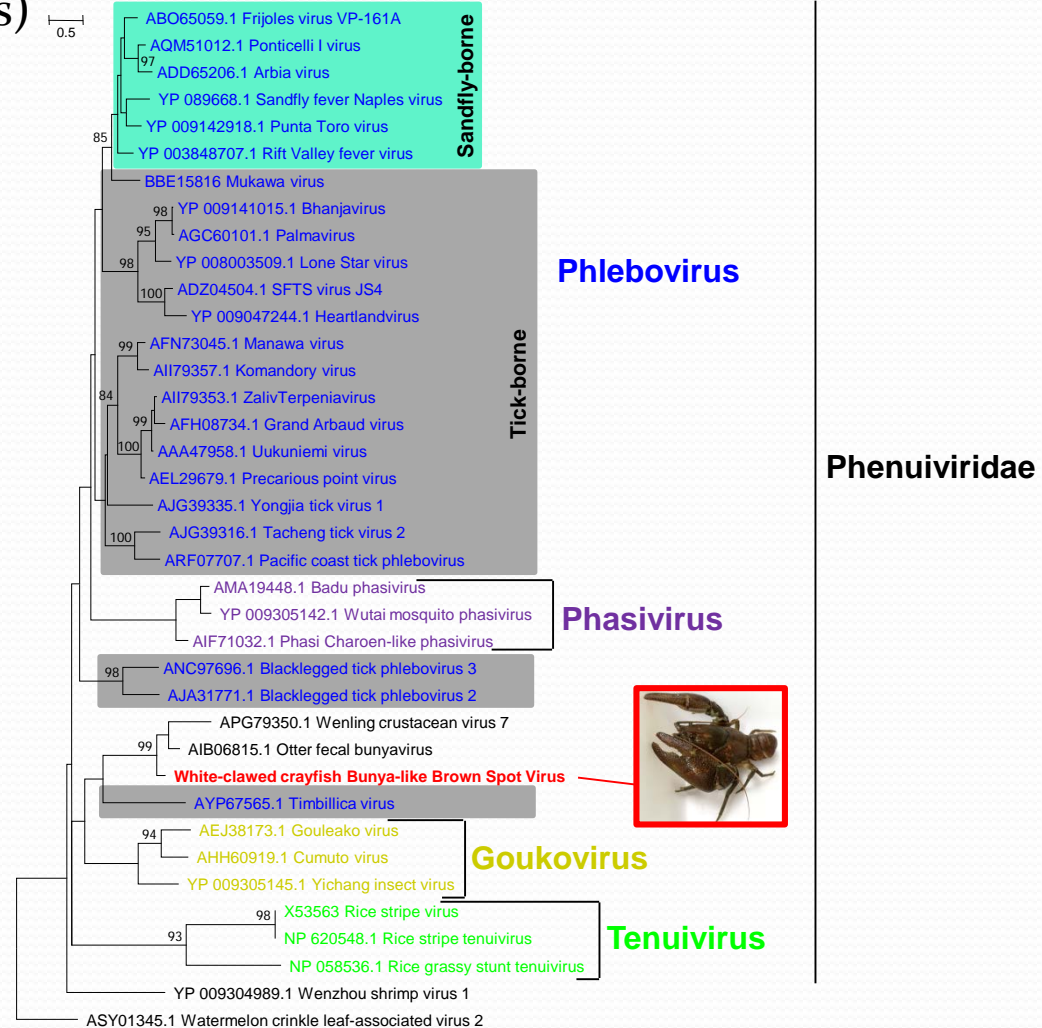
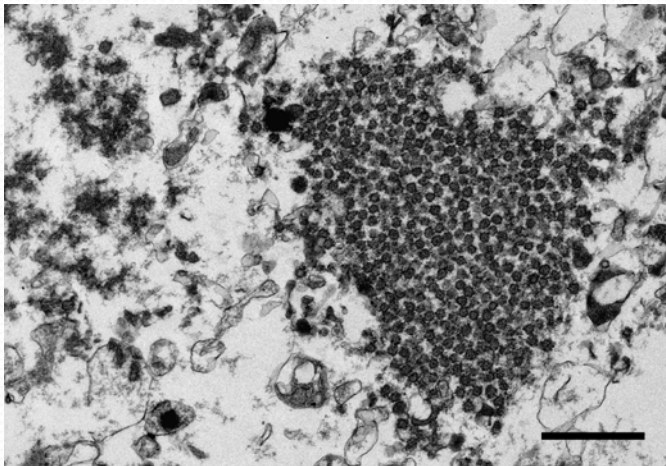
¹Institute of Microbiology and Parasitology, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, 1115 Ljubljana, Slovenia

²National Institute of Biology, 1000 Ljubljana, Slovenia

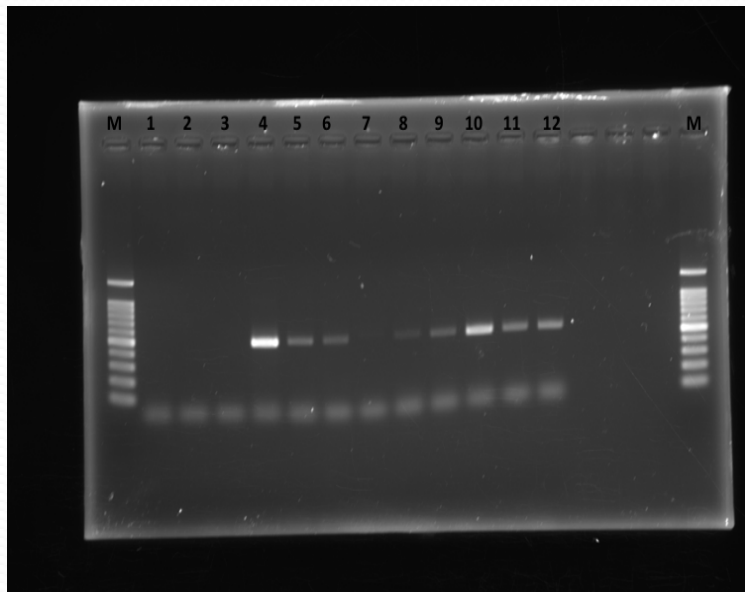
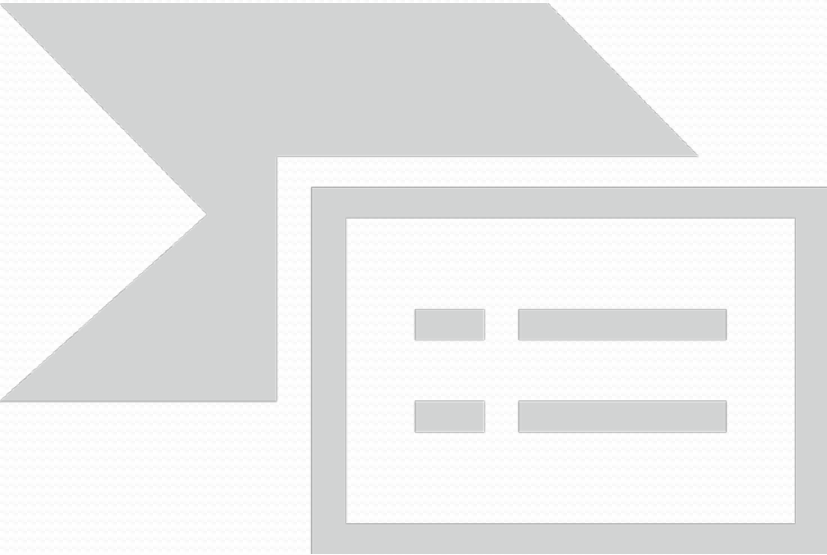
Nouvel agent pathogène : virus à ARN

Mortalité en 2017 sur la Bonneille (Doubs)

- Symptômes identiques à la peste
- Tests aphanomycose négatifs



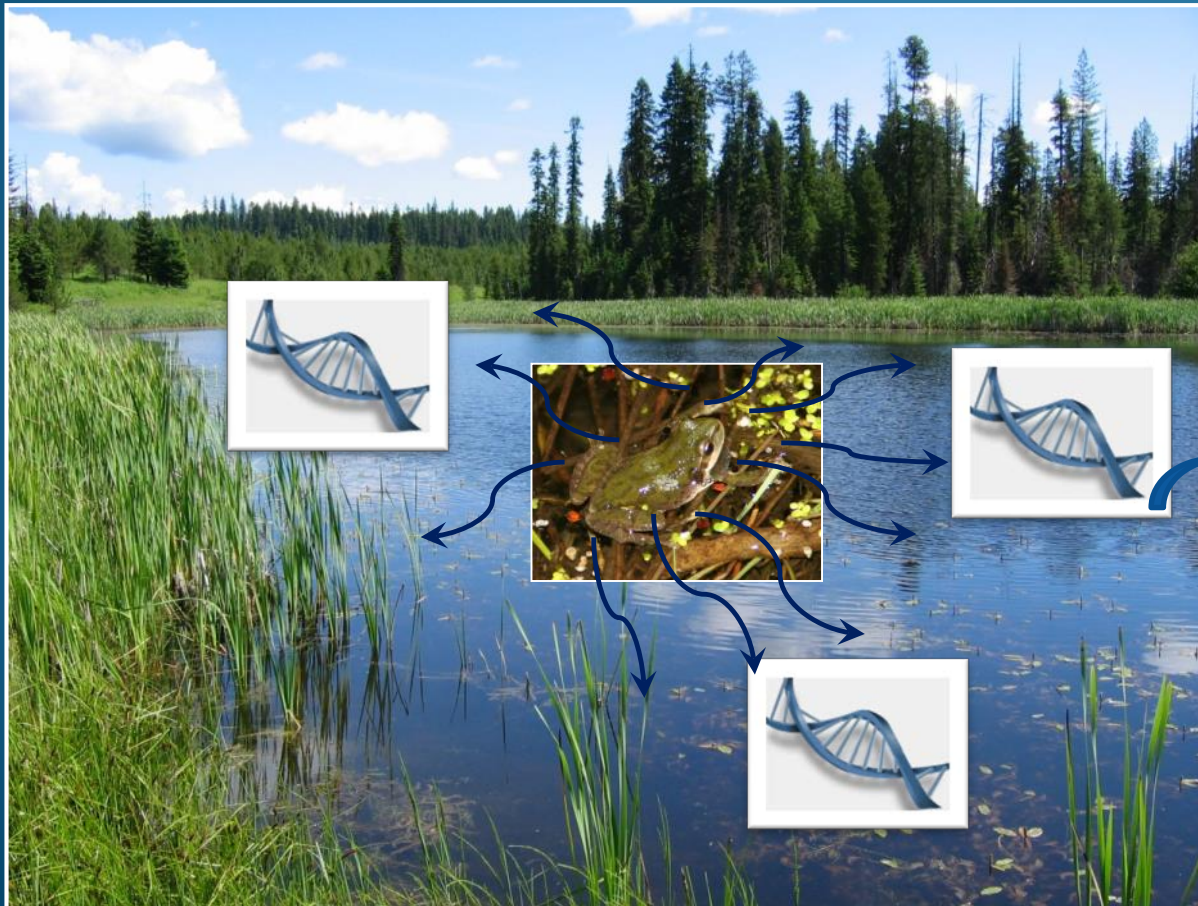
Nouvel agent pathogène : virus à ARN



Mise au point d'une méthode de détection par PCR

ADN environnement : nouvelle méthodologie d'inventaire et de monitoring

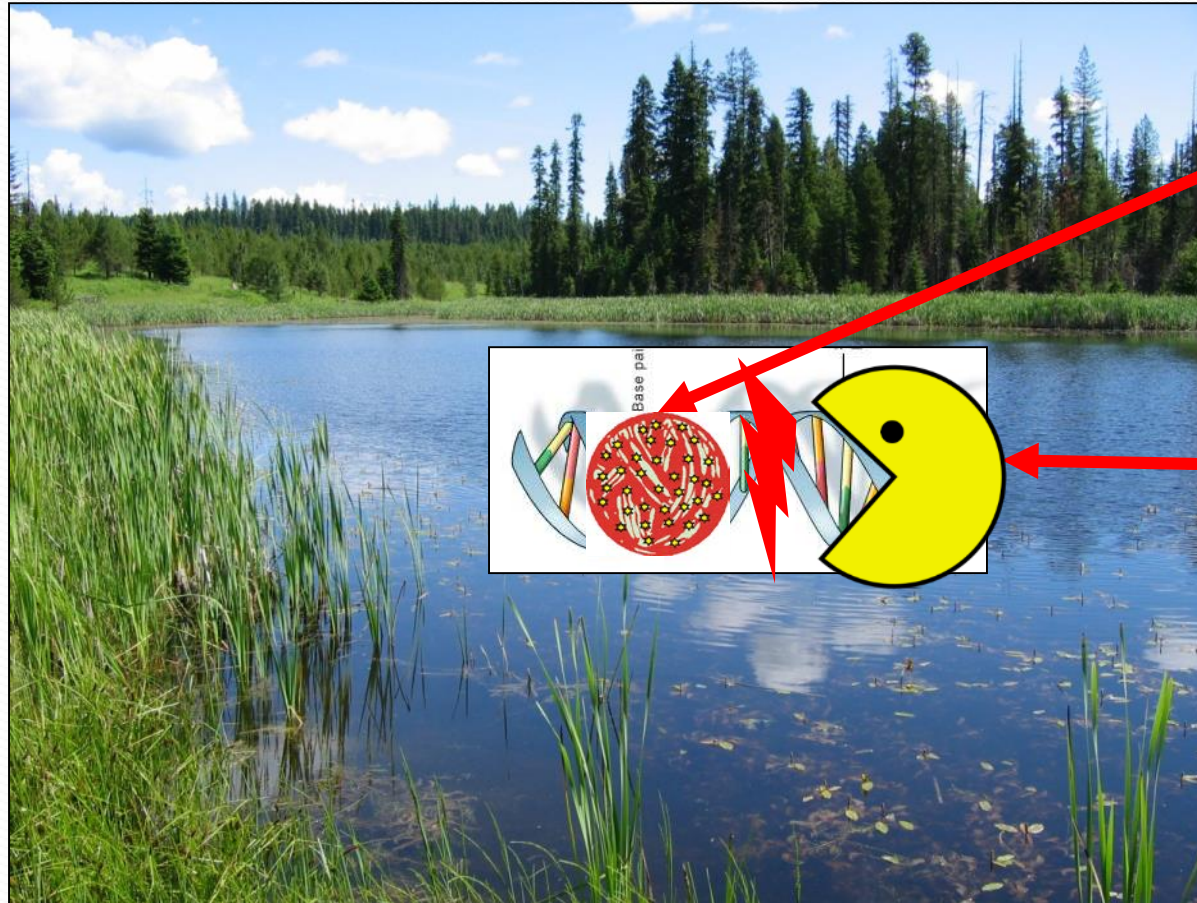
Définition



L'ADN environnemental (ADNe) est défini comme l'ADN pouvant être extrait à partir d'échantillons environnementaux, tels que l'eau, le sol ou les fèces, sans avoir besoin d'isoler au préalable des organismes cibles.



ADN dans l'environnement aquatique



UV

endonucleases/
exonucleases

Fragment d'ADN de 100 bp peut persister entre 2 – 3 semaines
(Dejean et al. 2011)

Première publication

biology
letters

Population genetics

Biol. Lett.

doi:10.1098/rsbl.2008.0118

Published online

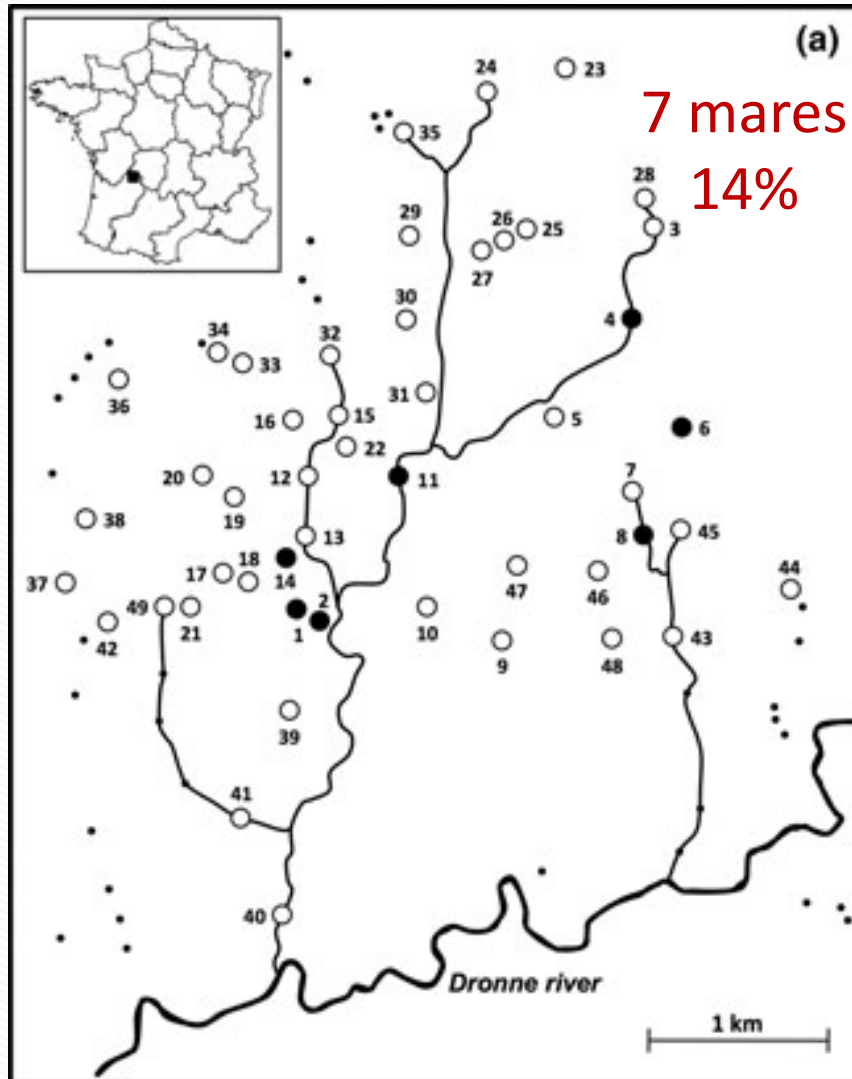
Species detection using environmental DNA from water samples

Gentile Francesco Ficetola^{1,2,*}, Claude Miaud²,
François Pompanon¹ and Pierre Taberlet¹



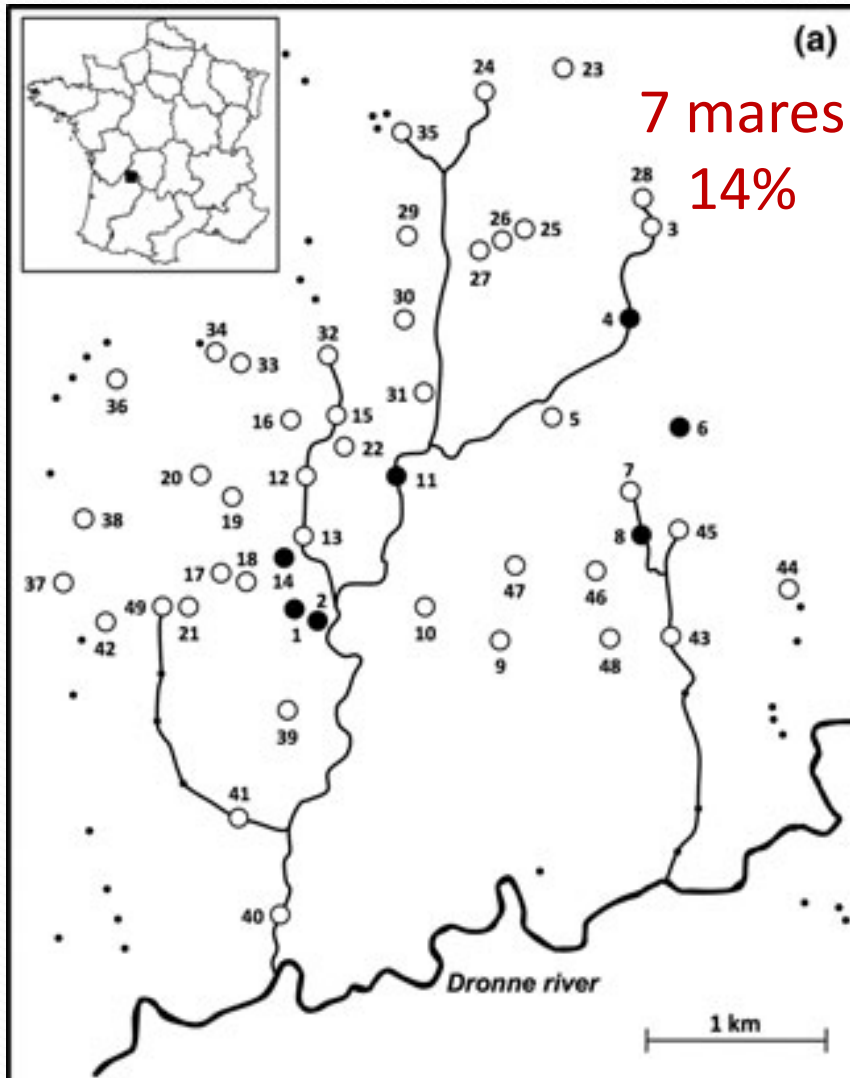
Grenouille taureau (Dejean et al. 2012)

Inventaire classique

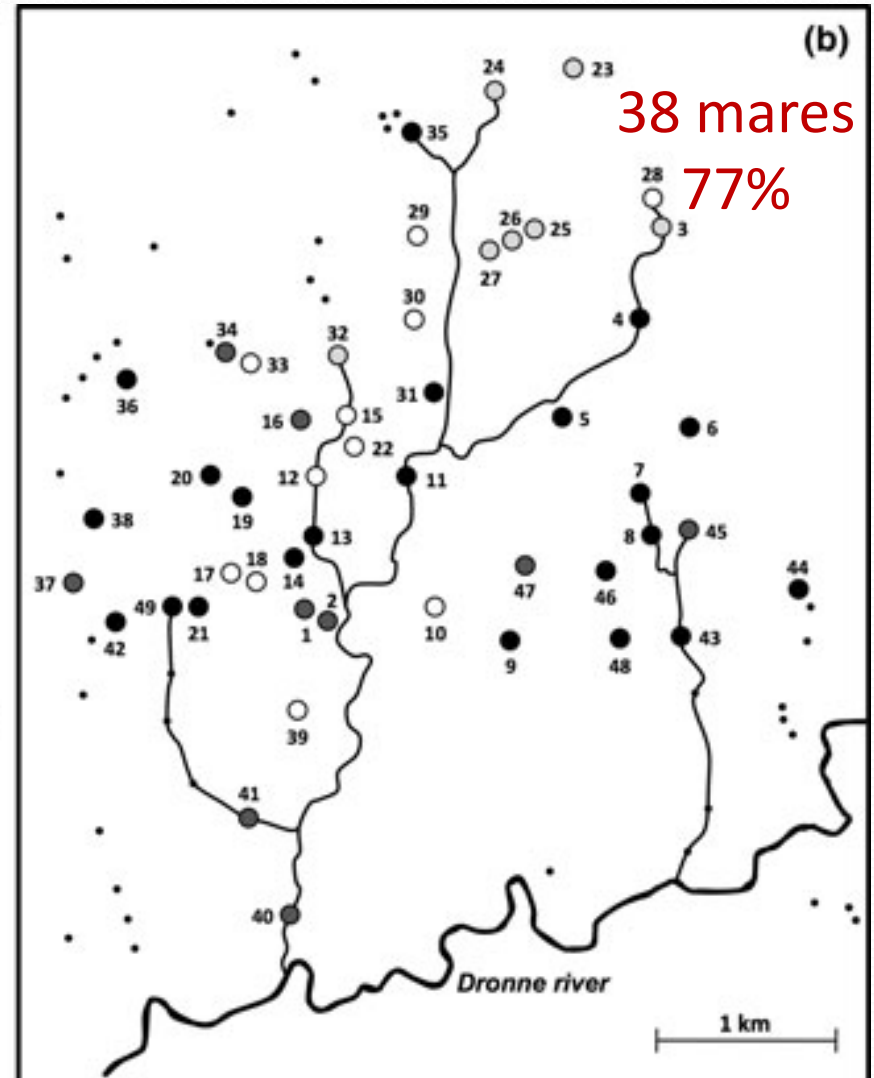


Grenouille taureau (Dejean et al. 2012)

Inventaire classique



Détection par ADN env



ADNe dans les milieux aquatiques

- Poissons marins (Thomsen et al. 2012)
- Mammifères marins (Foote et al. 2012)
- Gastéropodes (Goldberg et al. 2013)
- Python (Piaggio et al. 2013)
- Truite (Wilcox et al. 2013)
- Saumon (Laramie 2013)
- Odonates et Chironomes (Doi et al. 2017)

Avantages de L'ADN env ou ADNe

- Inventaire non destructif (pas de capture, pas de dégradation d'habitat)
- Forte sensibilité – plus forte probabilité de détection
- Détection Multi-espèces (+ pathogènes)
- Plus pratique, pas de transport d'appareil de capture
- Pas de demande de permission de capture



ADNe pour la détection d'écrevisses

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

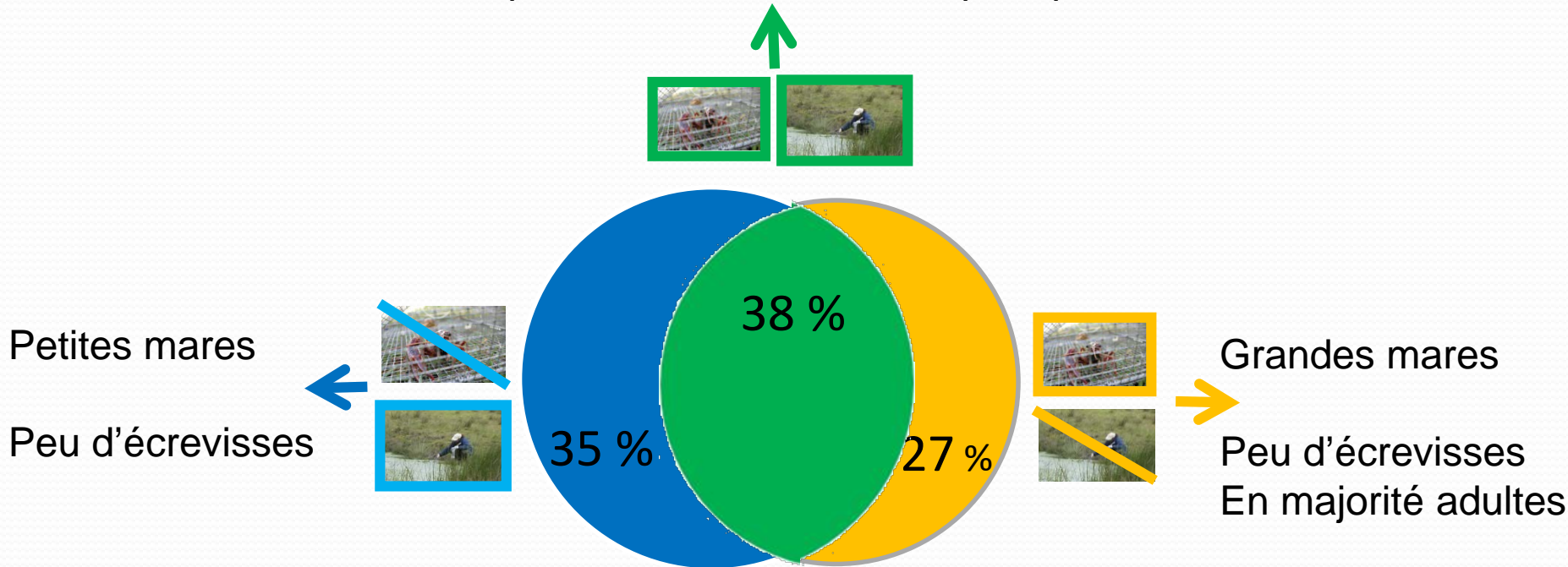
- 24 h
- Nombre de nasses : 1 pour 10 m de rive
- CPUE (Catch Per Unit Effort)
- 2 classes de taille



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

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)

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



Figure 1 : Filtration d'eau pour l'analyse ADNe

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



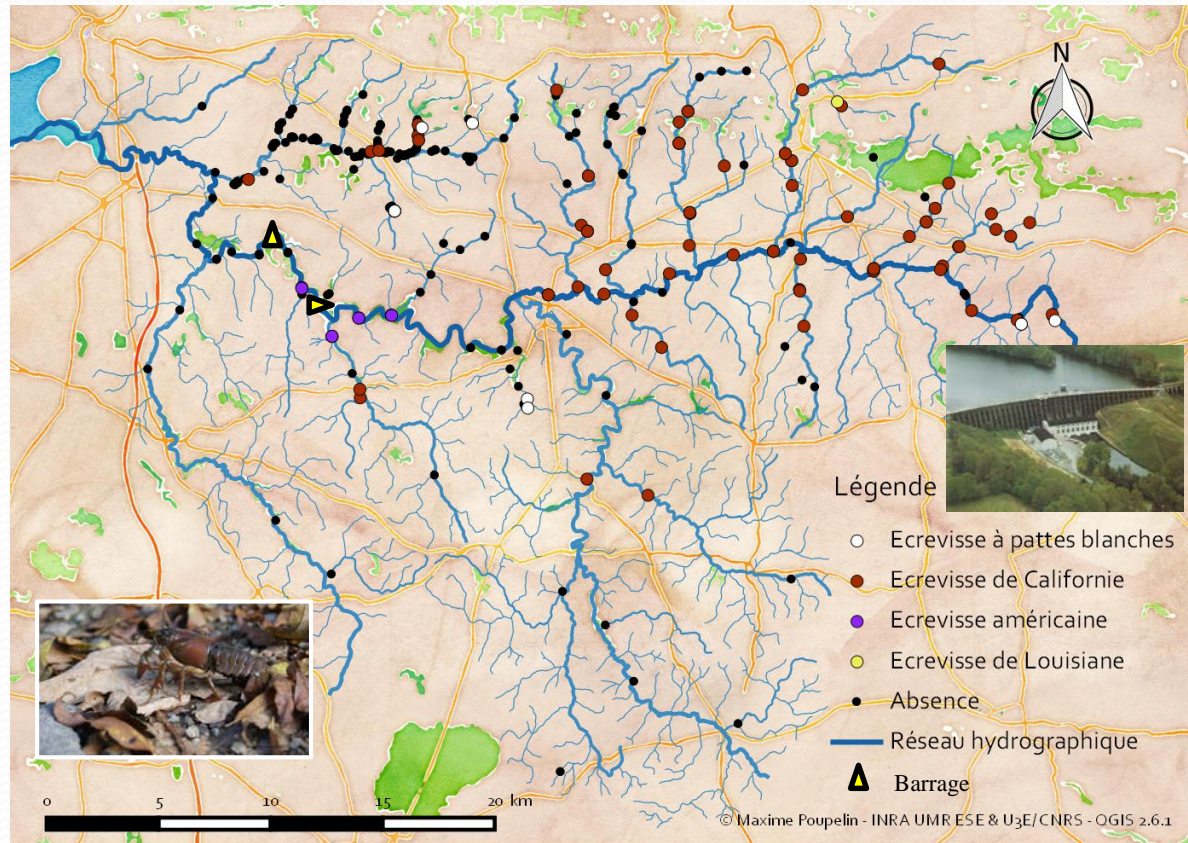
Tableau 1 : Résultats de la détection de l'Ecrevisse à pattes blanches par l'ADN environnemental (approche spécifique) sur les 9 sites étudiés

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 ?

- 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

- Analyses des taux d'infestation des populations de *Pacifastacus* et des prélèvements d'eau



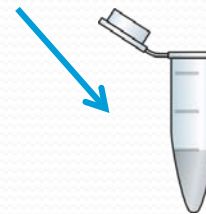
Prélèvement d'eau (500 ml X4)

Filtration

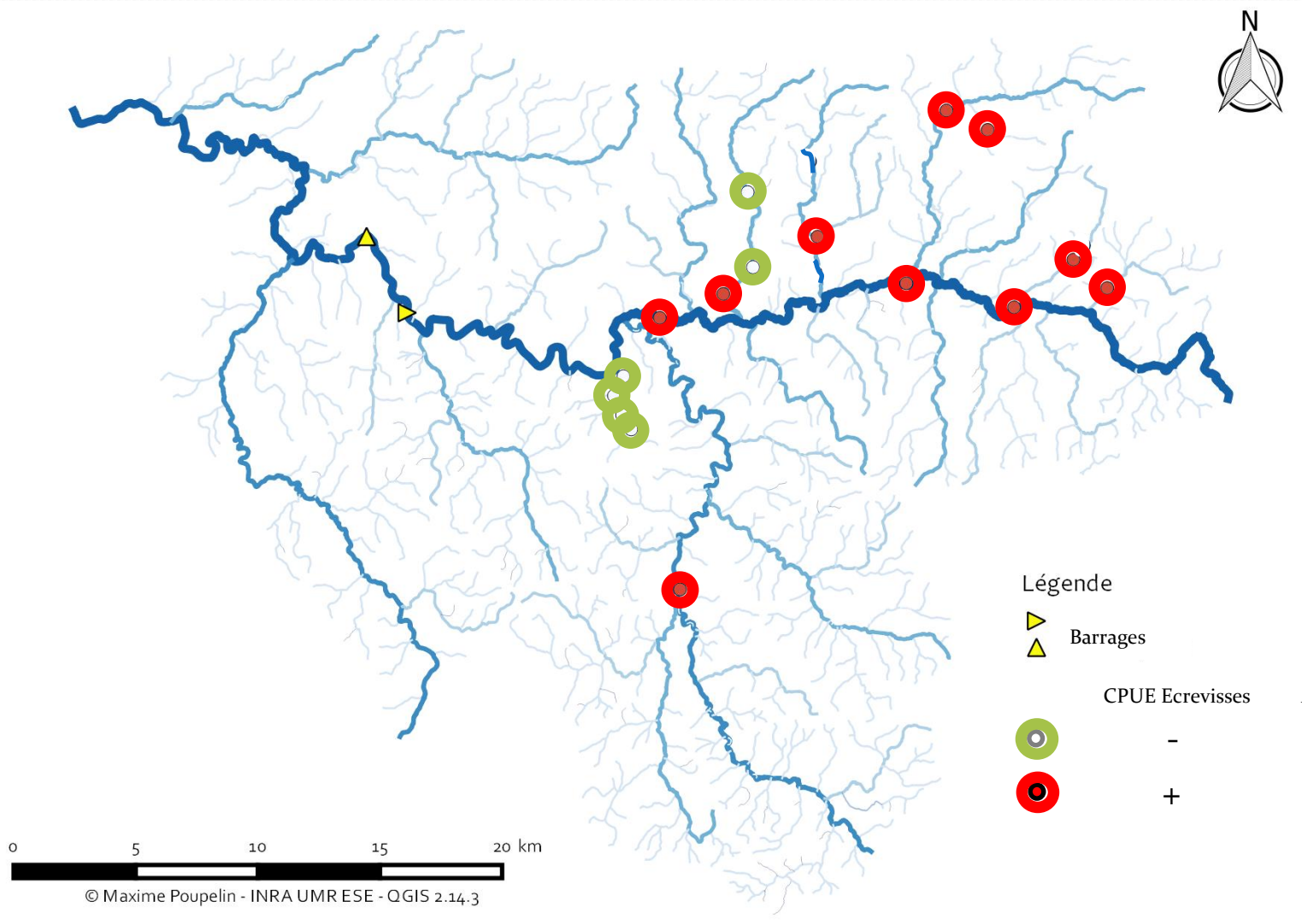


Support de filtration
NALGENE

Membrane
filtrante en nitrate
cellulose, maille
0,45µm



Extraction d'ADN
(CTAB)



Conclusions

- Très bonne efficacité (peste) mais variable (écrevisse)
- Effet de la saison sur l'efficacité de la détection
- Effet de la distance du prélèvement par rapport à la station écrevisse 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

Caractéristiques des habitats à écrevisses à pattes blanches

Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems (2009) 394-395, 01
© ONEMA, 2010
DOI: 10.1051/kmae/2009021

<http://www.kmae-journal.org>

Opinion paper

Current ideas on methodological approaches in European crayfish conservation and restocking procedures

C. Souty-Grosset⁽¹⁾, J.D. Reynolds⁽²⁾



26

59 tentatives de
repeuplement



33

Objectif : déterminer des bio-indicateurs de la présence d'écrevisse à pattes blanches en vue de sélectionner des sites pour le repeuplement

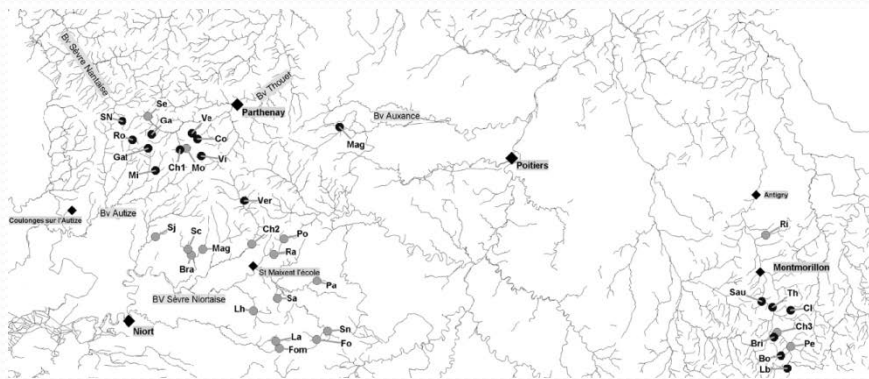
1. Caractéristiques des habitats à écrevisses à pattes blanches

Hydrobiologia
DOI 10.1007/s10750-011-0717-1

SHORT RESEARCH NOTE

Use of Ephemeroptera as bioindicators of the occurrence of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*)

Frédéric Grandjean · Joelle Jandry · Elodie Bardon ·
Aurore Coignet · Marie-Cécile Trouilhé · Bernard Parinet ·
Catherine Souty-Grosset · Michel Brulin



- Richesse spécifique 4-8 espèces d'éphéméroptères
- Espèce(s) de la famille des Leptophlebiidae

Ecological Indicators 46 (2014) 560–565



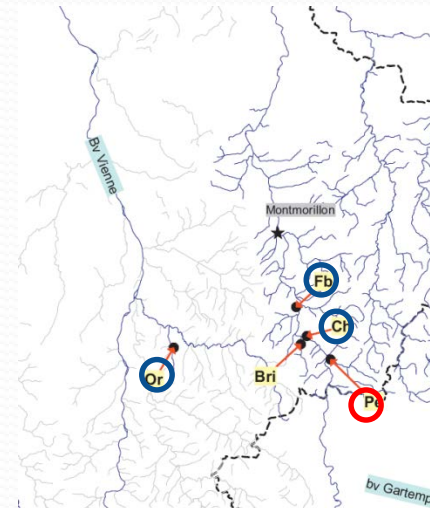
Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Indicators

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecolind

Ephemeroptera communities as bioindicators of the suitability of headwater streams for restocking with white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*

Joelle Jandry^a, Michel Brulin^b, Bernard Parinet^a, Frédéric Grandjean^{c,*}



Brook	Introduced number	Male	Female
Ru du Peu	133	60	73
Font-Bignoux	187	75	112
Ru de Chambon	86	37	49
Oranville	90	41	49



Préconisations

- Présence de Leptophlebiidae (cours d'eau l > 1m)
- Richesse en éphéméroptères de 4-8 espèces
- Vérifier l'absence de peste par ADN env
- Vérifier l'absence d'écrevisses exotiques par ADN env et nasses

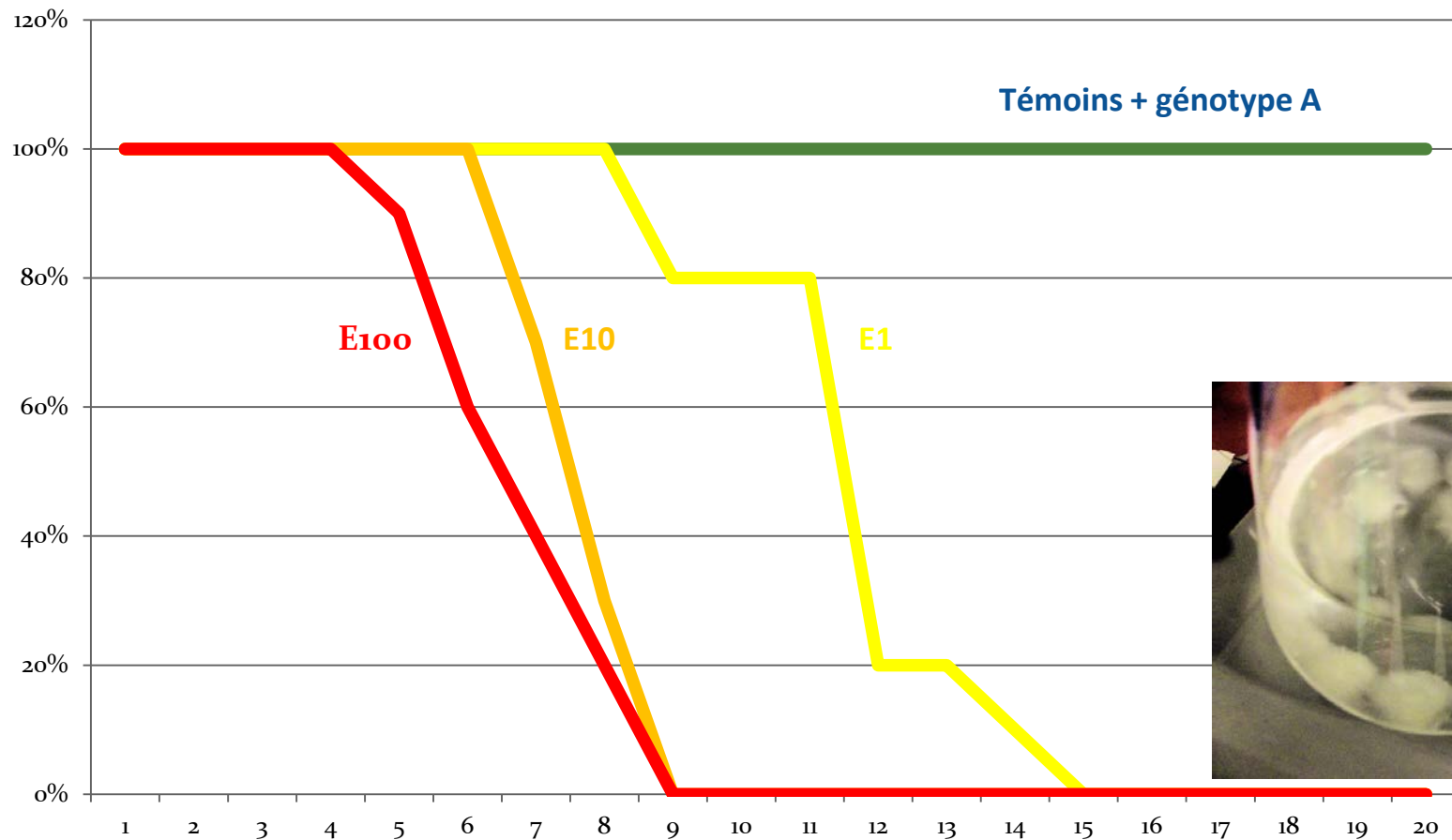


Merci de votre attention

Evolution de la mortalité

Pour les groupes A et E

Taux de survie



- Pas de mortalité observée après 60 jours pour la souche Al₇ (A) (idem pour témoins négatifs)