

INVENTAIRE DE LA POPULATION D'ÉCREVISSE À PATTES BLANCHES SUR L'ORBISE AMONT (CHATEL-MORON ET BARIZEY)



*Contribution à l'étude nationale :
"Utilisation de l'ADN environnemental pour la détection de
l'écrevisse à pattes blanches et de l'agent responsable de la peste
de l'écrevisse en cours d'eau"*



Août 2025



Fédération de Saône-et-Loire pour la
Pêche et la Protection du Milieu Aquatique

123 rue de Barbentane, 71000 MACON
www.peche-saone-et-loire.fr

INVENTAIRE DE LA POPULATION D'ÉCREVISSE À PATTES BLANCHES SUR L'ORBISE AMONT (CHATEL-MORON ET BARIZEY)



*Contribution à l'étude nationale :
"Utilisation de l'ADN environnemental pour la détection de
l'écrevisse à pattes blanches et de l'agent responsable de la peste
de l'écrevisse en cours d'eau"*

Rédaction :
Julien MAUPOUX

Avec la participation de :
Rémy Chassignol

Etude réalisée avec le concours financier de la Fédération Nationale pour la
Pêche en France

Août 2025

Fédération de Saône-et-Loire pour la Pêche
et la Protection du Milieu Aquatique

123 rue de Barbentane, 71000 MACON

Introduction

L'écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*) est la seule écrevisse autochtone présente dans les cours d'eau de Saône-et-Loire. Cette espèce a toutefois connu une très forte régression de ses effectifs, en raison d'une sensibilité marquée aux dégradations physiques des cours d'eau et aux pollutions. Elle ne supporte pas non plus la concurrence avec les écrevisses introduites (écrevisse américaine *Orconectes limosus* et écrevisse signal de Californie *Pacifastacus leniusculus*), qui peuvent être porteuses de la peste des écrevisses (*Aphanomyces astaci*), particulièrement néfaste pour l'écrevisse à pattes blanches.

Aujourd'hui, l'espèce ne subsiste que sur certains ruisseaux, à proximité des sources, secteurs où les cours d'eau présentent encore une bonne qualité physique et une faible pollution. Ces populations restent cependant très menacées, car elles sont généralement réduites, isolées les unes des autres, et exposées à un risque élevé d'assec estival dans le contexte actuel de crise climatique.

Il apparaît donc essentiel de mettre en place des mesures réglementaires et des programmes de conservation pour protéger, voire restaurer, les populations de cette espèce. Toutefois, ces programmes nécessitent des données de suivi fiables. Or, en Saône-et-Loire, les informations disponibles sur la répartition des écrevisses sont hétérogènes et celles concernant l'agent de la peste des écrevisses (*A. astaci*) sont quasi inexistantes. Il est donc indispensable de développer de nouveaux outils, tels que l'ADN environnemental (ADNe), en complément des approches traditionnelles, afin de mieux cibler les actions de conservation.

La Fédération de Saône-et-Loire pour la pêche et la protection du milieu aquatique a donc souhaité s'impliquer dans l'étude nationale « eCray'ON » visant à tester l'utilisation de l'ADNe pour la détection de l'écrevisse à pattes blanches et de l'agent responsable de la peste de l'écrevisse en cours d'eau. Cette étude est portée par SCIMABIO Interface, FISH-PASS, l'Université de Poitiers, l'OFB et de multiples gestionnaires de milieux aquatiques.

La Fédération a ainsi proposé de mettre en œuvre le protocole d'étude sur la population d'écrevisses à pattes blanches implantée sur l'Orbise à Barizey et Chatel-Moron. La participation de la Fédération a consisté à organiser une campagne de prospection nocturne visant à inventorier la population d'écrevisses à pattes blanches présente sur le cours d'eau. Les résultats ont permis de définir les sites de prélèvement d'ADNe selon le protocole de l'étude. La Fédération a ensuite réalisé la campagne d'échantillonnage ADNe. Les analyses et l'interprétation des résultats ont été assurées par SCIMABIO Interface et ses partenaires.

Les résultats de cette campagne d'ADNe sont présentés dans le rapport intitulé « *Utilisation de l'ADN environnemental pour la détection de l'écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*) et de l'agent responsable de la peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) en cours d'eau – Campagne d'échantillonnage octobre 2023* » (FISH-PASS, SCIMABIO Interface, 2023), joint en annexe.

Le présent rapport expose les résultats de la campagne de prospection nocturne ainsi que l'évolution de la population par rapport aux inventaires précédents. Une analyse croisée des données ADNe et des inventaires réalisés est également présentée en conclusion.

Résumé

L'écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*), unique espèce autochtone en Saône-et-Loire, subit un déclin marqué en raison de l'altération de ses habitats, de la pollution, de la concurrence d'espèces invasives et de la peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*). En 2023, la Fédération de Saône-et-Loire pour la pêche et la protection du milieu aquatique a mené, dans le cadre de l'étude nationale « eCray'ON », un inventaire nocturne et un échantillonnage d'ADN environnemental (ADNe) sur l'Orbise, un ruisseau s'écoulant sur les communes de Châtel-Moron et Barizey.

Les résultats indiquent une forte régression de la population d'écrevisse par rapport à 2019, avec un linéaire colonisé passant de 2,5 km à seulement 75 m, limité à la zone de source. Les prélèvements d'ADN environnemental ont permis de détecter la population inventoriée à proximité de la source et ont suggéré l'existence d'une seconde zone de présence potentielle en aval, correspondant soit à une population isolée sur l'Orbise, soit à une population présente sur un affluent. L'étude a également révélé la présence généralisée de la peste des écrevisses (*A. astaci*), ce qui explique probablement la régression observée.

Ces résultats soulignent l'intérêt de l'utilisation de l'ADN environnemental pour évaluer l'état des populations d'écrevisses à pattes blanches, en complément des inventaires classiques.

Contexte

L'Orbise est un petit cours d'eau du Chalon nais qui prend sa source à 394 m d'altitude sur la commune de CHATEL-MORON. D'une longueur totale de 21 km, elle se jette dans la Corne à SAINT-REMY. Son bassin versant mesure 84 km² et culmine à 499 m d'altitude. C'est l'un des seuls cours d'eau du bassin de la Corne dont les têtes de bassin sont situées en secteur forestier et prairial, ce qui lui confère une relative bonne qualité. Plus en aval, l'Orbise est marquée par une activité viticole importante (vignobles de Mercurey et de Givry), des zones de grande culture intensive et une pression urbaine relativement forte pour un petit cours d'eau avec pas moins de trois communes de taille moyenne : MERCUREY, DRACY-LE-FORT et GIVRY.

Selon l'Astabase de Bourgogne (SHNA, 2019), des inventaires astacoles réalisés en 2002, 2011 et 2019 avaient permis de recenser la présence de l'écrevisse à pattes blanches sur l'Orbise amont. Avec les épisodes de sécheresses successifs ces dernières années, il semblait judicieux de refaire un inventaire pour confirmer la présence de cette population en 2023.

Méthodologie des inventaires d'écrevisses

La réalisation des inventaires d'écrevisses s'effectue de nuit. En effet, il est difficile d'observer les écrevisses en journée, en raison de leurs faibles déplacements : elles restent cantonnées dans leurs caches, à l'abri des prédateurs et du courant. Ainsi, les observations commencent à la tombée de la nuit, au moment où elles sortent pour se nourrir.

Les prospections nocturnes sont réalisées en binôme. Munie de projecteurs, l'équipe balaie le fond du lit du cours d'eau à la recherche d'individus, qui sont ensuite déterminés à l'espèce.

L'objectif de ces prospections est de recenser les secteurs colonisés en matérialisant sur une carte les zones de présence ou d'absence. Des renseignements complémentaires sur les populations sont notés à titre indicatif : nombre d'individus observés, classes de tailles, éventuelles pathologies.

Les caractéristiques d'habitat (écoulements, substrats, abris, etc.) sont également relevées, de même que les éléments perturbateurs ponctuels (ouvrages transversaux, rejets, etc.) ou plus étendus (dégradation de la ripisylve, occupation du sol, etc.). Les conditions d'observation lors de la prospection sont également consignées. Les classes de taille des individus sont estimées afin d'évaluer l'équilibre des populations.

La prospection a été menée avec du matériel désinfecté (bottes et chaussures) afin d'éviter la dissémination de l'aphanomyose.

Les tronçons inventoriés sont cartographiés, ce qui permet ensuite de connaître le linéaire de cours d'eau colonisé par l'espèce. Les cartes ne sont pas présentées dans ce rapport.

L'inventaire sur l'Orbise a été réalisé au cours de la nuit du 2 au 3 octobre 2023. Les conditions étaient favorables à l'observation des écrevisses : basses eaux, faible turbidité et période d'activité globalement élevée des individus.

Résultats

Les inventaires réalisés en 2019 avaient permis d'observer trois tronçons colonisés par l'écrevisse à pattes blanches dans la partie amont de l'Orbise (voir carte 1). Sur les 240 m prospectés, 87 individus avaient été recensés. En considérant que la population occupait l'espace compris entre ces trois tronçons, le linéaire potentiellement colonisé était estimé à 2,5 km.

En 2023, cinq tronçons situés sur ce linéaire de 2,5 km potentiellement colonisé en 2019 ont été inventoriés, représentant un linéaire total de 675 m. Les écrevisses à pattes blanches n'ont été retrouvées que sur le tronçon le plus amont : sept individus sur un tronçon de 75 m. En amont de ce tronçon, l'Orbise était à sec.

Les inventaires de 2023 mettent ainsi en évidence une forte régression de l'espèce sur ce cours d'eau : le linéaire potentiellement colonisé est passé de 2,5 km à 75 m. Néanmoins, ce résultat doit être relativisé, car l'ensemble du linéaire n'a pas été prospecté et il est possible que de petites populations isolées subsistent entre les différents tronçons inventoriés.

Positionnements des sites de prélèvement ADNe

Conformément à la méthodologie de l'étude ADNe, les sites de prélèvement devaient être positionnés ainsi :

- 1^{ère} station (Orbise 1) : en limite aval de la zone connue de présence de la population d'écrevisses à pattes blanches
- 2^{ème} station (Orbise 2) : à environ 500 m en aval de la 1^{ère} station
- 3^{ème} station (Orbise 3) : à environ 2 km en aval de la 1^{ère} station

Suite à l'inventaire réalisé, les 3 sites ont donc pu être définis. Les coordonnées de chaque site sont indiquées dans le tableau 1 et leur localisation est représentée sur la carte 1.

Tableau 1 : Coordonnées des sites de prélèvements ADNe

Nom des stations	Coordonnées (Lambert 93, en m)	
	X	Y
Orbise 1		
Orbise 2		
Orbise 3		



La localisation exacte des populations d'écrevisse est confidentielle



Carte 1 : Répartition des écrevisses à pattes blanches en 2023, comparaison avec 2019 et localisation des stations de prélèvement ADNe

Principaux résultats obtenus par l'étude ADNe et conclusion par rapport à l'inventaire réalisé

L'étude ADNe a bien permis de détecter l'écrevisse à pattes blanches (*A. pallipes*), espèce cible, à l'aval direct de la population inventoriée (Orbise 1), et également sur la station Orbise 3 située à 2,2 km à l'aval, mais pas sur la station intermédiaire (Orbise 2) située à 500 m. D'après de précédentes études, le signal ADNe des espèces aquatiques et notamment de l'écrevisse à pattes blanches resterait localisé, dévalant au maximum jusqu'à 2 km à l'aval. Ces résultats suggèrent donc que la population d'écrevisses à pattes blanches de l'Orbise pourrait être fragmentée avec une partie à l'amont de la station Orbise 1, effectivement inventoriée en 2023, et une partie plus à l'aval, peut-être sur des tronçons de l'Orbise non inventoriés ou sur des petits affluents.

Aucun signal ADNe n'a été détecté pour les 3 espèces d'écrevisses invasives recherchées.

Enfin, le signal ADNe de l'agent responsable de la peste de l'écrevisse a été détecté sur l'ensemble des 3 stations échantillonnées. Il serait intéressant d'étendre l'échantillonnage encore plus à l'amont afin de pouvoir déterminer si la co-détection de l'écrevisse à pattes blanches et d'*A. astaci* correspond à une cohabitation ou bien si les écrevisses à pattes blanches sont plutôt réparties plus à l'amont sur des zones qui pourraient être indemnes de l'agent pathogène (soit tout à l'amont de l'Orbise, soit sur des petits affluents).

Les résultats montrent une cohérence globale entre les deux méthodes pour le diagnostic de régression et de fragmentation des populations d'*A. pallipes* sur l'Orbise. L'ADNe apporte un éclairage complémentaire précieux, notamment par la détection d'une seconde zone de présence potentielle en aval et par l'identification généralisée du pathogène *A. astaci*.

Enfin, l'étude ADNe apporte un nouvel éclairage sur les causes de la régression de la population d'écrevisse sur l'Orbise. Alors que la mise en assec de multiples tronçons amont paraissait être le principal facteur expliquant la très forte régression de l'espèce, la présence de la peste de l'écrevisse démontrée par l'étude ADNe est aussi désormais clairement un facteur explicatif.

Conclusion

Les inventaires menés en 2023 sur l'Orbise indiquent une forte régression de la population d'écrevisses à pattes blanches par rapport à 2019. Les résultats obtenus grâce à l'ADN environnemental complètent ce constat en révélant la présence potentielle d'un second noyau en aval de la population inventoriée ou sur un affluent et en mettant en évidence la contamination généralisée par l'agent de la peste de l'écrevisse. Alors que la régression de la population semblait être liée aux assec de l'Orbise, l'étude ADNe a mis en avant la présence de la peste des écrevisses qui apparaît comme un facteur explicatif supplémentaire.

Le croisement des méthodes de prospection et d'ADNe constitue un outil précieux pour renforcer le suivi des populations d'écrevisses et engager des actions de conservation ciblées, afin de préserver les derniers noyaux de population encore présents sur le bassin versant.

Annexe

Rapport « Utilisation de l'ADN environnemental pour la détection de l'écrevisse à pattes blanches (Austropotamobius pallipes) et de l'agent responsable de la peste de l'écrevisse (Aphanomyces astaci) en cours d'eau – Campagne d'échantillonnage octobre 2023 » (FISH-PASS, SCIMABIO Interface, 2023)



Utilisation de l'ADN environnemental pour la détection de l'écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*) et de l'agent responsable de la peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) en cours d'eau
Campagne d'échantillonnage Octobre 2023



Pôle thématique ADNe SCIMABIO-Interface/Fish-Pass
Valentin Vasselon (SCIMABIO-Interface)
Eloïse Duval (Fish-Pass)
Décembre 2023

Rédaction et relecture du rapport :

Eloïse Duval (FishPass) et Valentin Vasselon (SCIMABIO-Interface)

Maître d'ouvrage de l'étude :

Fédération de Saône-et-Loire pour la Pêche et la Protection du Milieu Aquatique (FD71)

Dossier suivi par :

Rémy Chassignol

Sommaire

1	Contexte	3
2	Objectifs de l'étude	3
3	Matériel et méthodes	4
3.1	L'ADN environnemental	4
3.1.1	Principe général de la ddPCR	5
3.1.2	Stratégie et protocole d'échantillonnage	6
3.2	Analyses de biologie moléculaire	8
3.2.1	Extraction de l'ADN total	8
3.2.2	Suivis spécifiques par ddPCR	8
4	Résultats	9
4.1	Description des stations d'échantillonnage	9
4.2	Validation des échantillons et des concentrations d'ADN extrait	9
4.3	Détection spécifique par ddPCR	10
4.3.1	Validation des données	10
4.3.2	Résultats de détection par ddPCR	10
5	Conclusions et perspectives	12
6	Bibliographie	13
7	Fiches terrain	15

1 Contexte

L'écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*) est l'une des 3 espèces d'écrevisses autochtones retrouvées dans les cours d'eau d'Europe de l'Ouest. Elle peut occuper des habitats diversifiés, mais on la retrouve principalement dans les petits cours d'eau en tête de bassin versant, là où les pressions sont généralement les moins importantes.

En effet, au cours de la dernière décennie, les populations d'écrevisses à pattes blanches ont fortement décliné, plusieurs facteurs pouvant être mis en avant pour expliquer ce phénomène (Alonso et al., 2000; Dunn et al., 2009) :

- La dégradation des milieux aquatiques, à la fois en termes de réduction des habitats (dégradation des berges) et de la qualité de l'eau (états écologique et chimique) ;
- L'introduction d'espèces d'écrevisses non indigènes (allochtones) envahissantes, plus agressives et compétitives (habitat, ressources) que les espèces autochtones ;
- L'apparition de maladies, souvent liée à l'introduction d'espèces allochtones, comme la peste de l'écrevisse causée par l'oomycète *Aphanomyces astaci*.

De ce fait, l'écrevisse à pattes blanches est classée « en danger » sur la liste rouge mondiale de l'UICN depuis 2010 (Füreder et al., 2010) et « vulnérable » de manière générale en France métropolitaine (MNHN & OFB, 2003). L'espèce fait l'objet de mesures réglementaires de protection (habitat, pêche, transport) et différents programmes de conservation sont mis en place par les gestionnaires, notamment un plan national d'actions décliné au niveau régional.

Ces programmes nécessitent d'avoir des données de suivi robustes. Malheureusement, les données disponibles quant à la distribution de *A. pallipes* et des espèces affectant son écologie (écrevisses allochtones, agent de la peste *A. astaci*) sont souvent hétérogènes, voire inexistantes dans certains cours d'eau de France métropolitaine.

Le manque de données spatiales et temporelles provient de la difficulté de mise en place des protocoles de détection des écrevisses (comptages nocturnes, piégeage) et de la peste (suivi d'écrevisses infectées, observation microscopique...). Leur application sur les cours d'eau requiert des moyens humains et financiers importants, ce qui limite le nombre de suivis réalisables. De plus, les biais associés à certaines approches (échantillonnage, technique) donnent souvent une image incomplète de l'état des populations.

2 Objectifs de l'étude

La présente étude vise à répondre à plusieurs objectifs :

- Utiliser les approches de biologie moléculaire utilisant l'ADN environnemental pour caractériser la présence de *A. pallipes* et *A. astaci* sur des stations en rivière sur le secteur d'étude de la FD71. L'absence de *A. pallipes* étant souvent associée à la présence d'espèces d'écrevisses allochtones, il est aussi proposé dans cette étude de caractériser la présence de l'écrevisse signal (*Pacifastacus leniusculus*), de l'écrevisse américaine (*Faxonius limosus*) et de l'écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*).

- Définir les limites de détection spatiale du signal ADNe sur les cours d'eau en contexte local, ce afin de renseigner la FD71 sur les limites opérationnelles de l'approche et d'aider à la construction de cahiers des charges mieux adaptés lors de mise en place d'études ADNe.
- Intégrer la FD71 dans des actions de développement opérationnel des approches ADNe en collaboration avec l'Office Français de la Biodiversité (OFB) et l'Université de Poitiers *via* l'intégration des échantillons de cette étude dans le projet national « eCray'on » (voir note technique correspondante).

3 Matériel et méthodes

3.1 L'ADN environnemental

L'ADN environnemental (ADNe) peut être défini comme l'ADN total pouvant être extrait à partir d'un échantillon environnemental (eau, biofilm, sol, air...) sans avoir à isoler au préalable les individus qui vivent dans le milieu (Taberlet et al., 2012). Pour les milieux aquatiques, comme les lacs et les rivières, l'ADNe extrait à partir d'un échantillon d'eau intègre à la fois l'ADN des microorganismes vivant dans l'eau (bactéries, microalgues, champignons...), mais aussi l'ADN libéré par les macroorganismes au contact du milieu sous différentes formes (Figure 1; Pawlowski et al., 2020). En fonction des matrices environnementales échantillonnées (eau, biofilm, sédiment) et des techniques déployées en laboratoire, il est possible de réaliser des inventaires de diversité ou le suivi d'espèces d'intérêt grâce à l'ADN des individus retrouvés dans l'environnement.

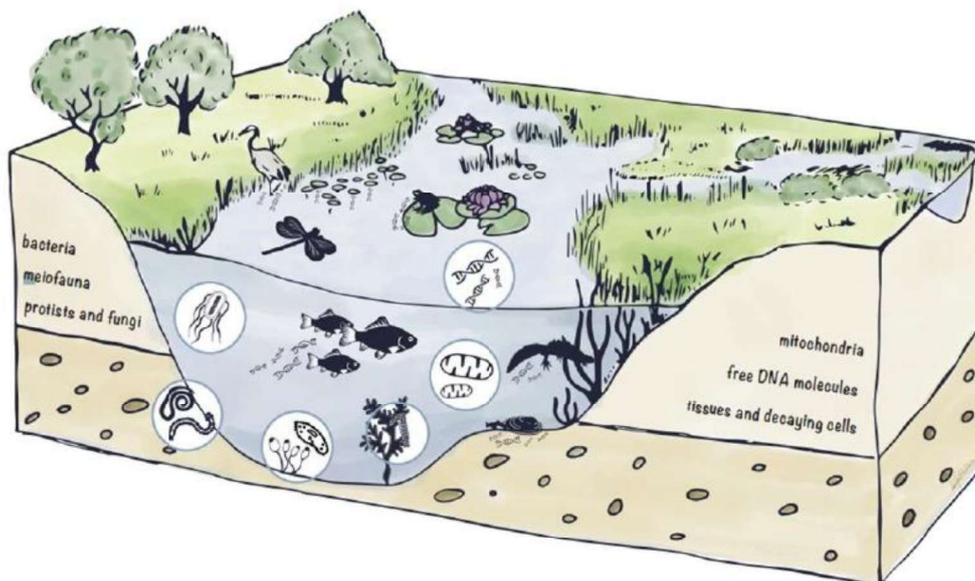


Figure 1 : Origine et forme de l'ADN environnemental dans les milieux aquatiques (Pawlowski et al., 2020)

Les écrevisses relarguent généralement très peu d'ADN dans leur environnement, conséquence de leur organisme comprenant un exosquelette composé majoritairement de chitine qui laisse très peu de place pour l'excrétion de mucus (Dougherty et al., 2016). De plus, les écrevisses à pattes blanches sont souvent présentes en très faibles densités, ce qui amoindrit d'autant plus l'intensité du signal ADNe. Une étude menée par Baudry et al. (2023) a néanmoins montré qu'en

échantillonnant en période favorable (au cours de l'été), une détection jusqu'à 2km en aval de la population source était possible lorsque la densité de la population est suffisamment importante. Cette période correspond à une période d'activité accrue des individus (e.g. prédation) ainsi qu'à la période de mue, ce qui permet un plus grand relargage d'ADN dans l'eau. De plus, la plupart des rivières ont des niveaux d'eau bas avec de faibles vitesses de courant en période d'étiage, ce qui limite la dilution du signal dans l'eau et sa diffusion sur de grandes distances, augmentant ainsi les chances de détection de l'espèce à l'échelle de la station.

La période courant d'Octobre à Novembre est également propice à la détection de l'espèce, car il s'agit de la période d'accouplement et de ponte. Toutefois, le risque d'évènement hydrologique intense sur cette période augmente, ce qui peut bloquer la mise en place d'une campagne d'échantillonnage de l'ADN.

3.1.1 Principe général de la ddPCR

Afin de maximiser les chances de détecter le signal ADNe potentiellement relargué par *A. pallipes* dans l'eau, potentiellement présent en très faible quantité, l'approche de détection ciblée d'ADN par dPCR (Digital PCR) a été privilégiée.

La dPCR est une technique de biologie moléculaire qui permet de cibler et d'amplifier une région génétique propre à une espèce via l'utilisation d'amorces et de sondes génétiques fluorescentes spécifiques (Doi et al., 2015; Figure 2). A partir d'un échantillon d'ADNe, il est donc possible de détecter et de quantifier par fluorescence le nombre de copies du gène spécifique ciblé dans un échantillon d'eau. Les nouvelles technologies de dPCR comme la ddPCR QX600 (Droplet Digital PCR, Biorad) offrent même la possibilité de co-détecter en une seule analyse jusqu'à 6 signaux de fluorescence dans un échantillon ADNe, donc jusqu'à 6 espèces distinctes. Cette technologie est parfaitement adaptée à des suivis multispécifiques.

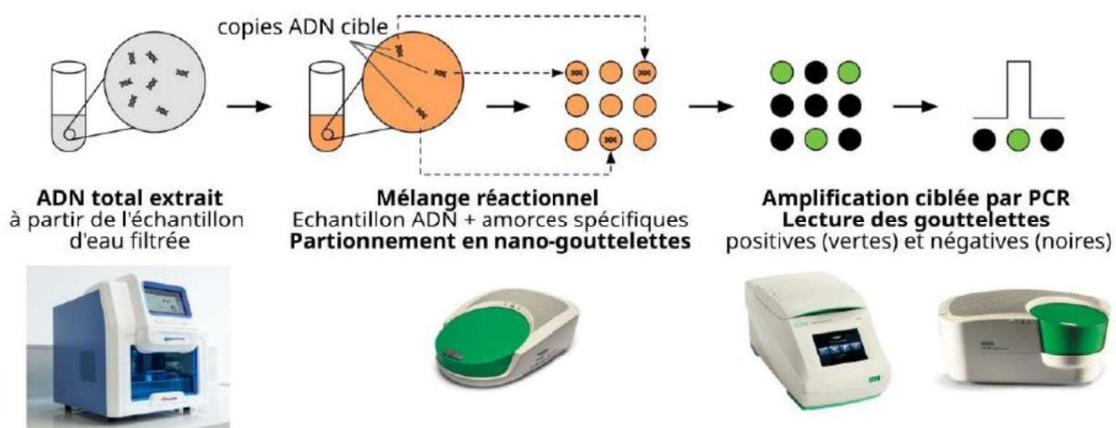


Figure 2. Schéma de fonctionnement de la ddPCR et appareils associés (automate d'extraction, générateur de gouttelettes, thermocycleur et lecteur de gouttelettes), modifié à partir de Mojarro et al. (2017).

Grâce à cette approche de biologie moléculaire, les signaux ADNe de 5 espèces d'intérêt ont pu être suivis dans cette étude : *A. pallipes*, *P. leniusculus*, *P. clarkii*, *F. limosus* et l'agent de la peste *A. astaci*.

3.1.2 Stratégie et protocole d'échantillonnage

Le choix des stations pour la détection de l'écrevisse à pattes blanches par approche ADNe a été effectué en concertation avec la FD71. **3 stations ont été retenues** sur l'Orbise (Figure 3). La station FD71_1 a été choisie car connue historiquement pour abriter une population de *A. pallipes*.



Figure 3 : Carte illustrant la localisation des 3 sites échantillonnés. Fond de carte : ©OpenStreetMap

3.1.2.1 Caractérisation des stations échantillonnées

Pour chaque station échantillonnée, une fiche descriptive a été complétée sur le terrain par la FD71 lors de la mise en place de l'échantillonnage.

En parallèle, un testeur multi-paramètres portatif HANNA HI 98129 déjà calibré a été fourni à la FD71 par SCIMABIO afin de mesurer le pH, la température, la conductivité ainsi que la valeur de TDS (Total Dissolved Solid) dans l'eau. Bien qu'une mesure absolue serait plus précise avec une sonde multi-paramètres, la précision du testeur permet d'avoir une bonne estimation de ces paramètres de terrain.

3.1.2.2 Echantillonnage eau de rivière

Des échantillons ADNe correspondant à des prélèvements d'eau filtrée ont été collectés par la FD71 en 3 réplicas sur chaque station en suivant le protocole fourni avec le matériel d'échantillonnage. Les grandes étapes sont rappelées brièvement (Figure 4) :

- 4 prélèvements d'eau de 500 mL ont été réalisés dans la mesure du possible à 5-20 cm de profondeur à différents endroits de la station pour couvrir la largeur de la rivière. Les prélèvements ont ensuite été mélangés dans un bidon décontaminé pour atteindre un volume total d'eau de 2L.
- L'eau a ensuite été filtrée sur des capsules « Sterivex » de porosité 0.45µm à l'aide d'une seringue 60 mL, ce jusqu'à ce que la filtration ne soit plus possible à cause du colmatage du filtre (entre 200 et 2000 mL selon la turbidité de l'eau).

- Une fois la filtration terminée, l'eau résiduelle a été expulsée du « Sterivex » en faisant une chasse d'air avec la seringue, puis 2mL de solution de préservation MC1 ont été ajoutés à l'échantillon filtré pour le préserver. Les échantillons ont ensuite été maintenus à température ambiante ou à 4°C jusqu'à extraction de l'ADN en laboratoire.

3 échantillons d'eau filtrée ont été obtenus par station et envoyés à SCIMABIO pour analyse.



Figure 3 : Illustration des étapes de prélèvement, de filtration et de préservation des échantillons d'eau filtrée (capsule Sterivex).

3.1.2.3 Echantillonnage biofilm aquatique (ADNe)

Les prélèvements de biofilm ont été réalisés sur chaque station en un seul réplica de terrain en suivant le protocole standardisé pour les suivis ADNe diatomées en biofilm (CEN/TR 17245:2019) résumé dans le protocole terrain envoyé à la FD71. Les étapes principales sont les suivantes (Figure 5) :

- Au moins 5 substrats durs (e.g. pierres, galets) ont été prélevés dans la rivière pour obtenir une surface totale cumulée à prélever d'au moins 100 cm².
- Les substrats ont ensuite été posés sur la berge afin de les laisser égoutter quelques minutes, les biofilms orientés vers le haut pour éviter de les contaminer avec de la terre.
- Le biofilm a été frotté énergiquement de la surface des substrats à l'aide d'une brosse à dents puis projeté dans une cuvette contenant un peu d'éthanol 95%. Les biofilms des 5 substrats sont récupérés dans la même cuvette.
- Une fois le prélèvement terminé, le biofilm contenu dans la cuvette a été transféré de la cuvette dans un tube Falcon de 50 mL à hauteur de 15-20 mL, puis le tube a été complété à 50 mL avec de l'éthanol 95% pour atteindre une concentration finale d'éthanol supérieure à 70%.
- Les échantillons de biofilms préservés à l'éthanol ont été conservés à température ambiante ou au frais sur le terrain avant d'être stockés à 4°C jusqu'à extraction de l'ADN en laboratoire.

1 échantillon de biofilm a été obtenu par station et envoyé à SCIMABIO pour analyse.



Figure 5 : Illustration des étapes de prélèvement du biofilm aquatique (périphyton) : égouttage des 5 substrats sur la berge, collecte du biofilm dans la cuvette et échantillons finalisés préservés dans l'éthanol.

3.2 Analyses de biologie moléculaire

3.2.1 Extraction de l'ADN total

Les extractions d'ADN total à partir des échantillons d'eau filtrée (Sterivex) ont été réalisées en laboratoire de biologie moléculaire avec le kit d'extraction « NucleoMag Water » (Macherey-Nagel) et les extractions à partir des échantillons de biofilm avec le kit « Nucleomag Microbiome » (Macherey-Nagel). Des contrôles négatifs ont été intégrés lors des expériences d'extraction pour valider la qualité des résultats obtenus et évaluer l'absence de contamination des échantillons environnementaux.

La qualité et la quantité d'ADN total extrait ont ensuite été mesurées au spectrophotomètre NanoDrop™ One/OneC (ThermoFisher). Les résultats sont rendus en concentration d'ADN par μL d'extrait et présentés à titre indicatif dans la Table 2.

3.2.2 Suivis spécifiques par ddPCR

L'analyse ddPCR a été réalisée par SCIMABIO sur les extraits ADN obtenus pour les échantillons d'eau filtrée et de biofilm. La technologie permettant une quantification absolue sans variabilité, 1 seul réplica technique est nécessaire par échantillon ADN étudié. Toutefois, si la profondeur d'analyse ne répond pas aux critères de satisfaction de la technologie ddPCR, les échantillons peuvent être analysés plusieurs fois jusqu'à atteindre un niveau de qualité satisfaisant permettant leur interprétation écologique. Des échantillons contrôles (positif, négatif) ont été intégrés dans chaque

analyse pour valider la qualité des résultats et évaluer la présence potentielle de contamination des échantillons.

Dans le cadre de cette étude il a été proposé de co-détecter le signal ADNe de 5 espèces via la technologie ddPCR (Bio-rad) : *A. pallipes*, *P. leniusculus*, *P. clarkii*, *F. limosus* et l'agent de la peste *A. astaci*. Le logiciel QX Manager™ (Bio-rad) a été utilisé pour analyser les données de ddPCR. Grâce aux différents témoins négatifs (terrain, extraction, ddPCR), un signal de fluorescence dit basal a été défini pour permettre la validation des détections positives.

Les résultats bruts par échantillon correspondent à un nombre de gouttelettes fluorescentes dites positives pour chaque espèce ramené au nombre total de gouttelettes générées pour l'échantillon. Pour chaque station, la stabilité du signal ADNe détecté par filtration d'eau a été évaluée en comparant les résultats des 3 réplicas, puis les 3 résultats ont été cumulés. Les résultats présentés sont corrigés afin de présenter un nombre de copie de gène de l'espèce ciblée est déterminé par µL d'extrait ADN puis converti en nombre de copies par litre d'eau filtrée.

4 Résultats

4.1 Description des stations d'échantillonnage

L'ensemble des prélèvements a pu être réalisé par la FD71 lors de la campagne de terrain du 03 Octobre 2023. Les conditions d'écoulement sur les différentes stations ont permis les prélèvements et filtration d'eau pour la recherche d'ADNe dans de bonnes conditions et les échantillons réceptionnés étaient en bon état.

Les fiches terrain associées aux échantillonnages sont jointes à ce rapport. La localisation GPS des stations étudiées ainsi que les principales variables physico-chimiques mesurées sont rappelées dans la Table 1.

Table 1 : Description et mesures physicochimiques des stations étudiées.

Code station	Ref structure	Coordonnée X	Coordonnée Y	Température de l'eau (°C)	pH	Conductivité à 25°C (µS)	TDS (ppm)
FD71_1	Orbise1		La localisation exacte des populations d'écrevisses est confidentielle	14,8	7,66	198	100
FD71_2	Orbise2			15,7	7,45	265	121
FD71_3	Orbise3			17,5	7,77	342	171

4.2 Validation des échantillons et des concentrations d'ADN extrait

Pour les échantillons d'eau filtrée, les volumes sont répétables entre les réplicas de chaque station, mais variables d'une station à une autre en fonction de la vitesse de colmatage (Table 2). Les volumes filtrés par échantillon sont compris entre 360mL et 840mL, volumes jugés suffisants pour la mise en place de l'extraction de l'ADN total et l'amplification par ddPCR avec un volume total filtré par station >500mL. Pour les échantillons de biofilm, les conditions de préservation dans l'éthanol ont été respectées et les extractions ont été réalisées pour l'ensemble des échantillons collectés.

Les concentrations d'ADN total extrait à partir des échantillons d'eau filtrée et des biofilms sont supérieures à 10 ng/μL pour l'ensemble des échantillons traités, ce qui représente une quantité correcte pour des analyses ddPCR. Les témoins négatifs d'extraction n'ont pas permis de mettre en évidence de contamination. Par principe, ils ont été analysés en ddPCR pour valider l'absence de contamination.

Table 2 : Concentrations d'ADN obtenues après étape d'extraction pour chaque échantillon d'eau filtrée et de biofilm. Le volume d'eau filtré sur le terrain est rappelé à titre indicatif pour les filtres sterivex.

Code station	Ref structure	Type	Code terrain	Code laboratoire	Volume filtré (mL)	[ADN total extrait] (ng/μL)
FD71_1	Orbise1	Eau filtrée (Sterivex)	A	FD71_F225	370	81,5
			B	FD71_F226	360	71,7
			C	FD71_F227	360	60,0
		Biofilm	-	FD71_B228	-	22,3
FD71_2	Orbise2	Eau filtrée (Sterivex)	A	FD71_F229	840	31,3
			B	FD71_F230	780	35,6
			C	FD71_F231	840	26,7
		Biofilm	-	FD71_B232	-	20,5
FD71_3	Orbise3	Eau filtrée (Sterivex)	A	FD71_F233	360	41,0
			B	FD71_F234	370	28,9
			C	FD71_F235	360	27,5
		Biofilm	-	FD71_B236	-	17,1

4.3 Détection spécifique par ddPCR

4.3.1 Validation des données

Un contrôle qualité des runs de ddPCR a été réalisé pour s'assurer qu'un nombre suffisant de gouttelettes soit obtenu pour chaque station (>10 000) et ainsi permettre une profondeur d'analyse suffisante. Lorsque ce nombre n'était pas atteint, les échantillons concernés sont réanalysés jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant de gouttelettes.

Le témoin de terrain, d'extraction et ddPCR ont tous donné des résultats négatifs pour l'amplification de l'ADN de *A. pallipes*, *A. astaci*, *F. limosus*, *P. clarkii* et *P. leniusculus*. Des témoins positifs constitués d'extrait ADN de tissu ou de culture pour les 5 espèces recherchées ont donné des résultats positifs, validant la mise en place de l'approche ddPCR. Ces échantillons ont servi de témoins afin d'identifier le seuil de discrimination des gouttelettes positives et négatives.

4.3.2 Résultats de détection par ddPCR

Les résultats de la détection de *A. pallipes*, *A. astaci*, *F. limosus*, *P. clarkii* et *P. leniusculus* par ddPCR à partir des extraits ADN obtenus sur les échantillons d'eau filtrée et de biofilm sont présentés dans la Table 3.

Table 3 : Résultats de l'amplification ciblée de l'ADN de *A. pallipes*, *A. astaci*, *F. limosus*, *P. clarkii* et *P. leniusculus* par ddPCR à partir des échantillons d'eau filtrée et de biofilm.

Code site	Type	<i>A. astaci</i>		<i>A. pallipes</i>		<i>F. limosus</i>		<i>P. clarkii</i>		<i>P. leniusculus</i>	
		Copies d'ADN*	Replicas positifs	Copies d'ADN*	Replicas positifs	Copies d'ADN*	Replicas positifs	Copies d'ADN*	Replicas positifs	Copies d'ADN*	Replicas positifs
FD71_1	Eau filtrée	9,71E+02	2/3	1,46E+03	3/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3
	Biofilm	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1
FD71_2	Eau filtrée	1,82E+03	3/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3
	Biofilm	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1
FD71_3	Eau filtrée	1,42E+03	3/3	8,50E+02	3/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3
	Biofilm	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1

*Les résultats pour l'eau filtrée sont présentés en nombre de copies d'ADN cible par litre d'eau filtrée et en nombre de copies d'ADN cible par μL de réaction pour les échantillons de biofilm.

➤ Signal ADNe *Austropotomabius pallipes*

Le signal ADNe de l'écrevisse à pattes blanches a été détecté à partir des échantillons d'eau filtrée sur les stations FD71_1 et FD71_3, mais pas sur FD71_2 (Table 3). Les signaux détectés sont répétables sur l'ensemble des réplicas de terrain de ces 2 stations. Ces résultats confirment la présence d'individus à l'amont de la station FD71_1, dont le signal n'est plus détecté 500m à l'aval, bien que les volumes filtrés sur FD71_2 aient été plus importants (Table 2). Il semble plus probable que le signal ADNe détecté sur la station FD71_3 provienne d'une population de *A. pallipes* située sur des petits affluents localisés entre les stations FD71_2 et FD71_3, non répertoriés sur la couche cours d'eau (Figure 6).

➤ Signal ADNe *Aphanomyces astaci*

Le signal ADNe de l'agent de la peste *A. astaci* a été détecté à partir des échantillons d'eau filtrée sur les 3 stations échantillonnées (Table 3). Le signal est moyennement répétable sur FD71_1, et très répétable sur FD71_2 et FD71_3, ce qui suggère que le pathogène est présent sur la partie aval du secteur étudié. Cette suspicion de présence pourra être confirmée lors de la mise en place de l'approche ADNe en qPCR dans le cadre du projet eCray'on.

➤ Signaux ADNe des espèces d'écrevisse invasives *Faxonius limosus*, *Procambarus clarkii* et *Pacifastacus leniusculus*

Aucun signal ADNe n'a été détecté pour les 3 espèces d'écrevisses invasives testées, et ce quelle que soit la méthode de prélèvement utilisée (eau filtrée ou biofilm, Table 3).

Aucun signal ADNe n'a été détecté pour l'écrevisse à pattes blanches ni pour l'agent de la peste dans les échantillons de biofilm et ce même lorsque les échantillons d'eau filtrée étaient positifs. L'absence de détection de ces espèces par les échantillons de biofilm suggère que le biofilm n'est pas une matrice adaptée à la détection de leur signal ADNe.



Figure 6. Détection par dddPCR des 4 espèces d'écrevisses (*Austropotamobius pallipes*, *Faxonius limosus*, *Procambarus clarkii* et *Pacifastacus leniusculus*) et de la peste (*Aphanomyces astaci*) à partir des échantillons d'eau filtrée. Fond de carte : ©OpenStreetMap

5 Conclusions et perspectives

Les résultats obtenus permettent de valider la mise en place des approches ADNe par ddPCR sur le territoire de la FD71 pour le suivi spécifique ADNe de *A. pallipes*, *A. astaci*, *F. limosus*, *P. clarkii* et *P. leniusculus*.

L'écrevisse à pattes blanches (*A. pallipes*), espèce cible de cette étude a bien été détectée à l'aval direct de la population historique (FD71_1), et également sur la station FD71_3 située à 2,2km à l'aval, mais pas sur la station intermédiaire (FD71_2) située à 500m. D'après de précédentes études, le signal ADNe des espèces aquatiques et notamment de l'écrevisse à pattes blanches resterait localisé, dévalant au maximum jusqu'à 2km à l'aval (Wacker et al., 2019; Van Driessche et al., 2023; Baudry et al., 2023). Ces résultats suggèrent donc que la population d'écrevisses à pattes blanches de l'Orbise pourrait être fragmentée avec une partie à l'amont de FD71_1 et une partie plus à l'aval, peut-être sur les petits affluents non répertoriés.

Aucun signal ADNe n'a été détecté pour les 3 espèces d'écrevisses invasives recherchées. Cependant, le signal ADNe de l'agent responsable de la peste de l'écrevisse a été détecté sur l'ensemble des 3 stations échantillonnées. Il serait intéressant d'étendre l'échantillonnage encore plus à l'amont afin de pouvoir déterminer si la co-détection de l'écrevisse à pattes blanches et d'*A. astaci* correspond à une cohabitation bien si les écrevisses à pattes blanches sont plutôt réparties plus à l'amont sur des zones qui pourraient être indemnes de l'agent pathogène (soit à l'amont tout à l'amont de l'Orbise ou sur les petits affluents).

Les échantillons ADNe (eau filtrée et biofilm) seront analysés par approches métabarcoding (inventaire de diversité décapodes) et qPCR (détection spécifique *A. pallipes* et *A. astaci*) dans le

cadre du projet « eCray'on ». Les résultats en qPCR permettront de compléter les informations obtenues en ddPCR sur la détection de *A. pallipes* et *A. astaci*, ce qui permettra d'affiner les hypothèses émises quant à la distribution de ces espèces sur le bassin versant. Ces données seront obtenues au cours du 1^{er} semestre 2024 et communiquées à la FD71 afin d'ajuster la méthodologie de terrain à adopter lors de la campagne d'échantillonnage 2024. De plus, les données collectées dans le cadre de l'étude avec la FD71 seront intégrées dans une analyse à l'échelle nationale afin de fournir des recommandations sur l'utilisation des approches ADNe pour le suivi de l'écrevisse à pattes blanches en cours d'eau.

6 Bibliographie

Alonso, F., Temiño, C., & Diéguez-Urbeondo, J. (2000). Status of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), in Spain: Distribution and legislation. *Bulletin Français de La Pêche et de La Pisciculture*, 356, 31-53.

Baudry, T., Laffitte, M., Noizat, C., Delaunay, C., Ricou, G., Vasselon, V., & Grandjean, F. (2023). Influence of distance from source population and seasonality in eDNA detection of white-clawed crayfish, through qPCR and ddPCR assays. *Environmental DNA*, edn3.435.

Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. *PLOS ONE*, 10(3), e0122763.

Dougherty, M. M., Larson, E. R., Renshaw, M. A., Gantz, C. A., Egan, S. P., Erickson, D. M., & Lodge, D. M. (2016). Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *Journal of Applied Ecology*, 53(3), 722-732.

Dunn, J. C., McClymont, H. E., Christmas, M., & Dunn, A. M. (2009). Competition and parasitism in the native White Clawed Crayfish *Austropotamobius pallipes* and the invasive Signal Crayfish *Pacifastacus leniusculus* in the UK. *Biological Invasions*, 11(2), 315-324.

Füreder, L., Gheradi, F., Holdich, D., Reynolds, J., Sibley, P., & Souty-Grosset, C. (2010). *Austropotamobius pallipes*: Füreder, L., Gherardi, F., Holdich, D., Reynolds, J., Sibley, P. & Souty-Grosset, C.: The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T2430A9438817 [Data set].

MNHN, & OFB. (2003). *Fiche de Austropotamobius pallipes (Lereboullet, 1858)*. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN).

Mojarro, A., Hachey, J., Bailey, R., Brown, M., & Doebler, R. (2017, mars 21). *Nucleic Acid Extraction and Sequencing from Low-Biomass Synthetic Mars Analog Soils*. Lunar & Planetary Science XLVIII, Woodlands, Texas.

Pawlowski, J., Apothéoz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 29(22), 4258-4264.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA: ENVIRONMENTAL DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789-1793.

Van Driessche, C., Everts, T., Neyrinck, S., & Brys, R. (2023). Experimental assessment of downstream environmental DNA patterns under variable fish biomass and river discharge rates. *Environmental DNA*, 5(1), 102-116.

Wacker, S., Fossøy, F., Larsen, B. M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., & Karlsson, S. (2019). Downstream transport and seasonal variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) eDNA concentration. *Environmental DNA*, 1(1), 64-73.