



REUNION DE RESTITUTION

Du 15 Janvier 2024

(*visioconférence*)

Développement d'un outil de suivi de l'invasion du Crabe bleu *Callinectes sapidus* en Méditerranée basé sur l'ADN environnemental

RAPPEL DU CONTEXTE: DÉVELOPPEMENT D'UNE EXPERTISE ADN_e SUR LE CRABE BLEU (*CALLINECTES SAPIDUS*) DANS LES ECOSYSTEMES COTIERS

L'objectif ici est d'avoir une méthode de détection précoce du Crabe bleu (CRB) et de mener des suivis dans le temps afin de pouvoir détecter sa présence sur la base de l'ADNe présent de manière « libre » dans l'eau. La détection précoce, comme le suivi/gestion dans les secteurs à enjeux, fait partie du Plan d'Action Régional de lutte contre le Crabe Bleu. Cela est donc établi en application de la stratégie nationale de lutte contre les espèces exotiques envahissantes et de l'intégration du PAR "Crabe bleu" dans la stratégie régionale sur la biodiversité. Le projet a connu deux phases, l'une pour développer un barcode Crabe bleu et s'assurer de sa spécificité, l'autre pour le tester à des concentrations différentes en aquarium, puis en milieu naturel.

Plusieurs personnes et laboratoire ont été impliqués dans le projet.

Pour rappel il existe 2 approches sur ADNe :

- 1/ **métabarcoding** pour détection en général un large nombre d'espèces d'un groupe taxonomiques plus ou moins large ciblé dans l'eau (par exemple les invertébrés, les poissons, les metazoaires).
- 2/ **barcoding**, approche choisie pour chercher spécifiquement le Crabe bleu (*Callinectes sapidus*). Cette méthode a été choisie car (1) elle est potentiellement plus sensible qu'une approche par métabarcoding et (2) elle est moins coûteuse, ne nécessitant pas de passer par l'étape de séquençage de nouvelle génération.

Dans le projet « CrabeeDNA 2020-2021 », le barcode développé fonctionnait seulement sur les tissus de spécimens.

Dans le projet « CrableuDNAInv 2022-2023 » un nouveau barcode situé sur le gène Cytochrome Oxydase 1 est fonctionnel, ainsi qu'un nouveau protocole de laboratoire avec mise au point de qPCR (24 réplicats) avec Sonde spécifique et sensible (10-5 ng/ μ L).

- Testé sur des prélèvements en milieu naturel sur 3 sites (2 à Canet et le port de Pérols) et sur des prélèvements en aquarium. En milieu naturel, on voit que l'on détectait *Callinectes sapidus* sur les 3 sites testés, mais à priori pas de corrélation entre la concentration ADNe et la densité de CRB.

- Même chose en aquarium, même avec une gamme de dilution avec une variabilité importante. A noter que sur la 1ere manipulation en aquarium en 2022, le contrôle négatif en aquarium montre de l'ADNe de l'espèce. Une hypothèse était que l'ADN avait été potentiellement aéroporté. Une seconde manipulation a été mise en place, lors de laquelle les bacs ont été couverts pour éviter une possible contamination par ce biais. Malgré ces précautions, sur la seconde manipulation en 2023, on retrouve dans les témoins négatifs (bac sans crabe) de l'ADN de Crabe bleu. Le témoin négatif en laboratoire étant bien négatif, la contamination a bien lieu sur le lieu de la manipulation.

Concernant la manip sur les 30 sites en Occitanie:

Le Crabe bleu a été détecté partout où il avait été référencé comme présent par Labrunet et coll. 2019 et sur l'ensemble des sites où il y avait déjà eu des captures/observations. Détection par ADNe dans 4 sites avec l'ADNe et non reporté à ce jour (Salonique, Pierre Blanche, Canal du Rhône à Sète, et Canet côté Mer). Sur ces territoires où la remontée d'observation n'avait pas encore faite :

- Sur Salonique, l'information d'observation est arrivée plus tard en saison.

- Idem pour l'étang d'Ingril, les pêcheurs n'ont pas fait remonter l'information à la période de la manipulation, mais la détection a fonctionné. L'information du pêcheur est arrivée plus tardivement. D'où l'intérêt de cette donnée ADNe.

L'expérience est reproductible. Pas de variation prédictible entre la concentration en ADNe et la densité de crabe pour la gamme de densités considérées. Pas de corrélation entre la biomasse et l'intensité de la détection.

Stéphanie Manel précise que sur certains articles, il est écrit qu'il pourrait y avoir plus d'ADNe avec les femelles Crabe bleu gravides, et également chez les juvéniles. Ce qui est également révélé dans la bibliographie sur d'autres espèces.

Par contre on localise plutôt bien le site d'émission, à 100m près (dans la littérature).

Répétitivité sur Canet et Thau en 2020, 2021, 2022 et 2023.

Sur l'Or : détecté en 2022 mais pas 2023. Potentiel effet densité / hétérogénéité de l'habitat.

=> intéressant **si l'on détecte plus lors de la période des femelles gravides.**

Sur la reproductibilité de la méthode : Privilégier une embarcation stable, mais possible en dernier recours un canoë. Si on est plus lent, le transect sera plus court et la donnée in fine potentiellement plus localisée.

- A vérifier sur la période de l'année si la détection est variable (= saisonnalité).

- Des modèles d'occupation multi-échelles (site/filtre/qPCR) ont été développés et ont montré qu'il était intéressant de travailler :

1/ sur différents sites d'une même localité, surtout quand elle est hétérogène en termes d'habitats (plusieurs secteurs à contrôler et à des périodes à cibler)

2/ à partir de deux échantillons (2 filtres nécessaires au minimum par site = 2 réplicats)

3/ avec au moins 11 qPCR pour s'assurer du résultat et éviter un biais de détection

L'étude a tenté de prendre en compte la variabilité environnementale : teneur en vase, salinité / lumière, hydrodynamisme. Ce sont les paramètres retrouvés dans le rapport CHAMILA (Menu et al. 2019), récoltés entre les années 2012 et 2017, et moyennés. C'est une façon d'étudier tous les facteurs qui pourraient expliquer la présence du crabe et/ou interférer sur la manipulation (voir les corrélations).

Aux résultats, il apparaît que les variables environnementales sont très discriminantes d'une lagune à l'autre mais cela reste encore perfectible pour que ce soit plus représentatif d'une réalité (cf l'ACP dans les résultats avec les regroupements des lagunes par type qui ne sont pas forcément très représentatifs de ce que les gestionnaires connaissent). Cependant, cette espèce ayant été trouvée au final un peu partout, il est peu probable qu'il y ait un effet de l'habitat expliquant la présence du crabe dans certaines lagunes et non dans d'autres.

Retour sur la mise en œuvre de la méthode par l'équipe projet en fonction des questions:

- la filtration par les pompes dans le milieu ne permet pas de distinguer l'ADNe selon un stade de développement du crabe bleu ou un sexe - donc pas de différence entre ADNe issu de larve, gamète ou ADNe libre présent dans l'eau à une faible profondeur. Cela peut être des morceaux de larves > 200 µm retenus dans le filtre. *(Pour rappel à Canet l'OOB a pu observer en juin une augmentation de larves dans l'étang, et recueillir avec des filets Manta de nombreuses zoé de crabe bleu - l'UPVD a fait des ratios taille/poids sur les crabes bleus et a clairement vu des distinctions liées au déplacement/présence des individus dans l'étang : les mâles plus présents au printemps et avec de plus fortes températures et salinités que les femelles grainées. G. Marchessaux a rappelé les optimums de salinité de cette espèce: 18 à 20 g/L ; Tolère une gamme de 5 à 65 g/L, avec des mortalités à compter de 50 g/L.*
- la méthode permet bien une détection précoce mais ne permet pas de donner d'information de densité plus ou moins forte de Crabe bleu dans le milieu.
- Il peut il y avoir des faux positifs en cas de contamination lors de l'utilisation du protocole. Toutes les mesures ont été prises sur le terrain pour éviter cela via l'utilisation de filtres & tubes neufs, en manipulant avec des gants, et en évitant des embarcations ayant servi à la pêche au Crabe bleu. En laboratoire lors des extractions d'ADN et lors des amplifications (qPCR), des témoins négatifs étaient toujours inclus et se sont bien avérés à chaque fois négatifs.
- La méthode est a priori utilisable quel que soit le type de site : lagunaire et proche côtier. Des pompages avec pompes immergées et manipulés par des plongeurs peuvent être déployés pour travailler en milieu profond.
- La corrélation biomasse/quantité d'ADN amplifié ne fonctionne pas ici. Dans la littérature, il n'y a pas vraiment de consensus avec parfois une absence de corrélation (notamment chez une espèce de poisson), parfois une corrélation retrouvée notamment chez l'étoile de mer *Acanthaster planci*, en phase d'explosion démographique mais pas avant.

- Le couplage modélisation et étude ADNe est extrêmement intéressant, permettant de donner un support statistique aux méthodes déployées.

Intervention sur le terrain / précision de la méthode

- La technique n'est pas complexe à mettre en œuvre mais il faut à minima dispenser une petite formation auprès des gestionnaires de site pour qu'ils prennent en main le matériel et le protocole s'ils souhaitent surveiller leur site à l'occasion d'un échantillonnage. Sinon prévoir une prestation dans un projet (formation continue proposée par l'EPHE).
- Connaître l'implication possible des gestionnaires sur le terrain revient à se demander quel objectif soutenu derrière, le temps dédié et sa justification en local (quel avis des élus des structures syndicales).
- Pour le matériel : il s'agit d'achat de pompes légères, et de filtres spécifiques pour l'ADNe et prévoir le coût des analyses dans une entreprise pour cette prestation telle que Spygen ou d'une autre structure. Le coût de l'analyse peut être assez variable, environ 10 euros l'extraction (sans compter le prix du filtre à analyser) et entre 50 à 100 euros par échantillon pour l'analyse d'un type d'ADNe. C'est plus cher si pas mal d'espèces à surveiller en même temps (metabarcoding).
- L'ADNe est détectable à une dilution forte (10⁻⁵ ng/μL)

Opportunité de déployer ce suivi pour d'autres espèces que *Callinectes sapidus*

- Rappel que le metabarcoding reste assez large sur les groupes d'espèces d'invertébrés, comparé au barcoding qui est plus spécifique comme ici pour *Callinectes*. Seulement 30% des espèces sont dans les BDD sur lesquelles s'appuyer pour le metabarcoding (à noter que SPYGEN a développé un marqueur génétique pour les crustacés qui détecte du Crabe bleu, utile si l'on souhaite travailler en multi espèces, mais probablement moins sensible que celui qui a été développé dans l'étude de l'EPHE). L'EPHE envisage de le tester dans leurs projets à venir. D'autre part la base de données est en cours de développement.
- Stéphanie M. : La génétique des populations à partir d'ADNe se développe. L'EPHE l'a fait sur le rouget avec des marqueurs qui permettant de distinguer les types de populations. L'EPHE a collaboré avec Banyuls sur les échantillons de tissus d'invertébrés potentiellement associés avec le Crabe bleu, et mettre en évidence la spécificité du barcode développé.
- Si nous voulions faire une détection pour anticiper toute arrivée de *Portunis segnis* (l'autre Crabe bleu) sur nos côtes, il faudrait soit développer un barcode, soit employer une autre technique. Une autre solution de suivi de l'ADNe différente du barcoding ou metabarcoding existe pour cibler plusieurs espèces en même temps : système de sonde qui combine des marqueurs génétiques de quelques espèces recherchées. Le résultat restant précis.

Impacts sur l'écosystème / la biodiversité :

- Rappel des études sont en cours à l'OOB : sur le contenu stomacal du Crabe bleu à Canet et sur son impact sur les coquillages. Abra est un bivalve dont la population a chuté depuis l'arrivée du crabe, alors que d'autres bivalves plus gros et avec coquille plus solide, semblent être moins impactés.
- Pascal Romans : nous avons pu voir en aquarium que le Crabe bleu parvient encore à ouvrir de jeunes huîtres en rongant leur coquille (de taille 7-8 cm environ mais pas plus grandes).
- Sur Salses-Leucate, a priori pas encore d'impact connu dans les tables conchylicoles. A noter qu'un projet NassCrab24 commence sur Canet et Salses-Leucate pour tester des nasses dans les graus - mais actuellement il n'y a pas de capture du Crabe bleu à la nasse dans les tables conchylicoles. Il serait intéressant de vérifier avec l'ADNe autour et dans les graus de Salses-Leucate si le Crabe est bien présent et qu'il passe à proximité des nasses nouvellement testées (avoir une réponse si elles n'attrapent pas de crabes).
- En Italie, l'impact sur les palourdes est important dans la lagune de Venise.

Conclusions : perspectives / mise en œuvre et déploiement pour la suite

- Ne pas hésiter à se rapprocher de l'équipe projet DREAL Occitanie/EPHE-CEFE CNRS si sur certains territoires la volonté est de mettre en place un déploiement de ce type de méthode de détection précoce. Voir le temps à y consacrer sur le terrain en fonction du nombre de points potentiels à réaliser pour mettre en place une surveillance (qui fait également partie des objectifs du PAR Crabe bleu et de la stratégie nationale de lutte contre les espèces envahissantes du point de vue de la détection précoces d'EEE).
- A voir en fonction des fonds disponibles sur la biodiversité en 2024 - attendre les retours de la DREAL à ce sujet.
- Rappel que l'intérêt est de pouvoir aussi détecter à des lieux et des périodes où le Crabe bleu n'est pas encore visible dans les filets de pêche (ex en sortie de sa léthargie hivernale début mars), et vérifier sa présence dans certains secteurs des lagunes, en proche côtier, estuaires, dans les périodes de migration (arrivée au grau depuis la mer, rapprochement vers les cours d'eau pour sa reproduction...). Intéressant aussi sur des secteurs où il n'y a pas d'observateurs/ou de pêcheurs.
- Intérêt de surveiller des secteurs à enjeux économiques, comme les espaces conchylicoles en lagune ou proche côtier : qu'en pensent les professionnels de la conchyliculture ?
- Un projet peut être mis en place en mutualisant des moyens à l'échelle des régions et de plusieurs territoires qui souhaiteraient s'engager sur une surveillance avec cet outil. Le Pôle-relais lagunes peut appuyer le montage de ce dossier et prévoir un achat de matériel à prêter à plusieurs structures. Cela nécessite de connaître les gestionnaires

de sites potentiellement intéressés par ce type de démarche et faire le point sur les secteurs qu'ils souhaiteraient suivre.

- Le protocole terrain étant transférable pour une surveillance en routine, une formation serait intégrée dans l'enveloppe du projet. Si ce sont les gestionnaires qui mettent en place (suivant leur temps dédié/disponible). Sinon voir la possibilité d'intégrer un prestataire pour la globalité d'un suivi.
- L'EPHE-CEFE CNRS porte des projets de R&D, mais ne réalise pas de suivi en routine comme un prestataire. Un projet de développement de l'outil de détection pour *Callinectes sapidus*, intégrant d'autres espèces à rechercher dans le milieu, est envisageable et sur des milieux différents. L'adaptation et l'évolution du protocole pour intégrer des notions de profondeurs différentes, un gradient d'eau douce (spatialisation des points de détection dans une lagune ou en proche côtier) peut s'imaginer pour vérifier si l'ADNe est détectable à certains endroits d'un site plutôt qu'à d'autres et travailler sur la temporalité.

Références :

Menu, Marion, Sandrine Vaz, Touria Bajjouk, Valerie Derolez, Annie Fiandrino, Anais Giraud, Patrick Grillas, et Vincent Ouisse. 2019. « Rapport final du projet CHAMILA (Cartographie des habitats en milieu lagunaire méditerranéen) », novembre. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00593/70545/>.

Annexe – PARTICIPANTS (présentiel et visio)

Amilhat Elsa – Université de Perpignan CEFREM
Argiro Fanny - Gipreb
Barré Nathalie – CEN Occitanie Pôle-relais lagunes méditerranéennes
Bascoul Léa – Université de Perpignan Via Domitia
Befeld Silke - SNPN
Bellezza Rémi - CC La Domitienne
Benharrat Karima – Mysis
Bergeron Kevin – Esterel Côte d'Azur Agglomération
Bernery Camille – IUCN
Boyer thomas – Observatoire océanologique Banyuls
Cases Ludovic – SYMBO
Constantin Pauline – CPIE BT
Cornil Laetitia – DREAL Occitanie
Cros Cyril – Collectivité de Corse
Cuilleret Anne-line – SMCG
Danielou Romain-Nathan – CEN Occitanie
De Basquiat Muriel – DREAL Corse
Delrieu Erwan – EPHE-CEFE CNRS

Denis Françoise – MNHN
Dentan Margot - Université Panthéon Sorbonne
Dhollande Lou - CEFE SYMBO
Faucon Gwenaëlle –Maison de la Nature Ville de Lattes
Gaborit-Loret Aude – CAHM
Grange Marie - FCEN
Grisel Raphaël – Gipreb
Héritier David - Esterel Côte d'Azur Agglomération
Hourdez Stéphane – Observatoire Océanologique de Banyuls
Jabouin Coraline – OFB
Jarraya Marion – Université de Perpignan Via Domitia
Jean Pauline –ARBE PACA
Kirra ?
Lascève Matthieu - TPM
Lang Iris – CEN Occitanie
Lombardini Katia – Tour du Valat/Pôle-relais lagunes méditerranéennes
Mailheau Marie – SM RIVAGE
Manas Nicolas – PNR de la Narbonnaise en Méd.
Manel Stéphanie – EPHE-CEFE CNRS
Marchessaux Guillaume – Université de Palerme
Marguet Elina – CPIE BT
Marobin Delphine – PNR de Camargue
Nutti Mattei Laetitia - OEC
Mauclert Virginie – Tour du Valat/Pôle-relais lagunes méditerranéennes
Mayot Nicolas – Gipreb
Miaud Claude – EPHE- CEFE CNRS
Cottalorda Jean-Michel – Université de Nice CNRS -ECOSEAS
Michez Noémie – PNMGL-OFB
Mivière Roland – SMBVR
Navarre Sandrine – EPTB Lez
Nicolas Justine – CEN Occitanie
Patrissi Michela – Cepralmar
Perignon Adeline – CRCM
Requirand Florent – Ville d Aigues-Mortes
Romans Pascal – Observatoire Océanologique de Banyuls
Sablain Vincent – EPTB Lez
Sargian Peggy – OFB
Serranito Bruno – MNHN
Souloumiac Audrey - Institut Ecocitoyen
Tchilinguirian Julien –Métropole Aix Marseille Provence
Toscano Julia – Esterel Côte d'Azur Agglomération