

THESE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
UFR des Sciences Fondamentales et Appliquées
Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions – EBI (Poitiers)
Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016

Ecole Doctorale Rosalind Franklin : Energie, Environnement, Biologie-Santé
Secteur de Recherche : Biologie des Populations et Ecologie

Présentée par :
Maud LAFFITTE

**Les écrevisses exotiques envahissantes : vecteurs du
pathogène *Aphanomyces astaci* et impacts chez les
écrevisses autochtones.**

Directeur de Thèse :
Frédéric GRANDJEAN

Soutenue le 20 décembre 2024

Devant la Commission d'Examen

JURY :

Jérôme MOREAU - Université de La Rochelle - PR
Juliette SMITH-RAVIN - Université des Antilles - PR
Karine MONCEAU - Université de La Rochelle - MDC-HDR
Thierry BERGES - Université de Poitiers - PR
Frédéric GRANDJEAN - Université de Poitiers - PR

THESE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
UFR des Sciences Fondamentales et Appliquées
Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions – EBI (Poitiers)
Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016

Ecole Doctorale Rosalind Franklin : Energie, Environnement, Biologie-Santé
Secteur de Recherche : Biologie des Populations et Ecologie

Présentée par :
Maud LAFFITTE

**Les écrevisses exotiques envahissantes : vecteurs du
pathogène *Aphanomyces astaci* et impacts chez les
écrevisses autochtones.**

Directeur de Thèse :
Frédéric GRANDJEAN

Soutenue le 20 décembre 2024

Devant la Commission d'Examen

JURY :

Jérôme MOREAU - Université de La Rochelle - PR
Juliette SMITH-RAVIN - Université des Antilles - PR
Karine MONCEAU - Université de La Rochelle - MDC-HDR
Thierry BERGES - Université de Poitiers - PR
Frédéric GRANDJEAN - Université de Poitiers - PR

Résumé :

Les écosystèmes d'eau douce abritent une biodiversité exceptionnelle par rapport à la surface limitée qu'ils occupent, ce qui les rend particulièrement vulnérables, vis-à-vis de l'introduction d'espèces exotiques. Les écrevisses exotiques envahissantes d'origine américaine en sont le parfait exemple d'autant plus qu'elles sont porteuses saines d'un oomycète pathogène, *Aphanomyces astaci*, impliqués dans de nombreuses épizooties d'écrevisses autochtones en Europe. Cette étude vise à réactualiser l'aire de distribution des populations d'écrevisses nord-américaines en France. La caractérisation de la présence en milieu naturel de l'écrevisse à tâches rouges, *Faxonius rusticus* sur l'Aveyron (non répertoriée en Europe) porteuse d'une souche spécifique d'Aphanomycose est considérée comme fortement préoccupante, car hautement invasive. Cette étude évalue également le rôle de ces écrevisses envahissantes en tant que réservoirs d'*A. astaci*. Nous avons d'abord démontré que *Procambarus clarkii* et *Pacifastacus leniusculus* sont les principaux vecteurs d'*A. astaci* en France, jouant un rôle crucial en tant que réservoirs du pathogène et à l'origine de nombreuses épizooties dans les peuplements d'écrevisses à pattes blanches. Le suivi des prévalences dans le temps révèle également une dynamique spatio-temporelle à l'échelle intrapopulationnelle. La présence de populations sympatriques d'espèces nord-américaines au sein de mêmes stations, a révélé des transferts interspécifiques de souches d '*A. astaci*. Ainsi, une souche fortement virulente (en termes de sporulation et d'effet sur l'hôte naïf) pourrait se propager à l'échelle du territoire par ses transferts interspécifiques. À terme, elle pourrait engendrer de plus forts événements de mortalité au sein des populations d'écrevisses natives. La caractérisation des différentes souches d'*A. astaci* est donc cruciale pour mieux comprendre les dynamiques épidémiques du pathogène dans les écosystèmes. Afin d'améliorer la précision de ces études, de nouveaux microsatellites ont été développés pour détecter la variabilité intragroupe au sein des souches d'*A. astaci*. Ces outils permettent non seulement de différencier les génotypes du pathogène, mais aussi de comprendre l'origine des épidémies et de suivre leur propagation dans les écosystèmes affectés. Il a été montré des populations d'écrevisses natives dites résistantes à des événements de peste, la caractérisation des gènes impliqués dans la réponse immunitaire semble une étape incontournable pour développer des stratégies de conservation plus efficaces. Des efforts en matière de stratégies de gestion des espèces exotiques envahissantes sont également essentiels afin de préserver l'intégrité des écosystèmes aquatiques dans leur ensemble.

Mots-clés : Invasions biologiques, écrevisses, *Aphanomyces astaci*, prévalence, épidémiologie, variabilité génétique

Abstract :

Freshwater ecosystems host an exceptional biodiversity relative to the limited area they occupy, making them particularly vulnerable to the introduction of exotic species. Invasive crayfish species from North America provide a striking example, as they are healthy carriers of a pathogenic oomycete, *Aphanomyces astaci*, which has been responsible for numerous crayfish epizootics among native species in Europe. This study aims to update the distribution range of North American crayfish populations in France. The presence of the Rusty Crayfish (*Faxonius rusticus*) in the Aveyron region (previously unreported in Europe), which carries a specific strain of *Aphanomyces astaci*, is particularly concerning due to its highly invasive nature. This research also assesses the role of invasive crayfish as reservoirs for *A. astaci*. We first demonstrated that *Procambarus clarkii* and *Pacifastacus leniusculus* are the main vectors of *A. astaci* in France, playing a critical role as reservoirs of the pathogen and being responsible for numerous epizootics among white-clawed crayfish populations. Monitoring prevalence over time also revealed a spatiotemporal dynamic at the intrapopulation level. The presence of sympatric populations of North American species in the same locations has shown interspecific transfers of *A. astaci* strains. Consequently, a highly virulent strain (in terms of spore production and its effect on naïve hosts) could spread across the territory through these interspecific transfers, potentially causing higher mortality events among native crayfish populations in the long term. Characterizing different strains of *A. astaci* is therefore crucial to better understand the epidemic dynamics of the pathogen in ecosystems. To enhance the accuracy of these studies, new microsatellites have been developed to detect intra-group variability within *A. astaci* strains. These tools not only allow the differentiation of pathogen genotypes but also help trace the origin of epidemics and track their spread in affected ecosystems. Additionally, some native crayfish populations have shown resistance to plague events, highlighting the importance of identifying the genes involved in immune response as a critical step toward developing more effective conservation strategies. Efforts to improve management strategies for invasive alien species are also essential to preserve the overall integrity of aquatic ecosystems.

Keywords: Biological invasions, crayfish, *Aphanomyces astaci*, prevalence, epidemiology, genetic variability

Remerciements :

Dans un premier temps, je souhaite présenter mes remerciements les plus sincères aux membres de ce jury de thèse, Jérôme MOREAU et Juliette SMITH-RAVIN qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Thierry BERGES et Karine MONCEAU, qui ont accepté d'évaluer mon travail, en tant qu'examinateur.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers Frédéric GRANDJEAN, mon directeur de thèse, pour les nombreuses occasions qui m'ont été offertes de participer à divers projets et pour les multiples opportunités qui m'ont été données durant ces trois années de thèse (participation au congrès IAA, mobilité en Allemagne). Je suis également reconnaissante envers Jean-Marc BERJEAUD, directeur du laboratoire EBI, pour son accueil au sein de l'établissement.

Je tiens aussi à remercier Christine BRAQUART-VARNIER, Géraldine DUBREUIL, Benjamin GOURBAL, Sylvain LA CAMERA d'avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse. Merci pour vos précieux conseils et votre expertise qui ont été très bénéfiques dans la poursuite de ma thèse. Je suis également reconnaissante envers Didier BOUCHON et Frédéric BECK, codirecteurs de l'école doctorale, ainsi que Sophie BERGERONEAU et Vanessa ALBERT pour leur accompagnement au cours de ces trois années. Je suis également reconnaissante envers les financeurs de ma bourse doctorale, la région Nouvelle-Aquitaine et Grand Poitiers, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Vincent, à Louis, à Adeline et à ma mère, pour leur aide précieuse et leurs corrections orthographiques de cette thèse. Vos conseils, votre expertise ont été inestimables. Merci pour le temps que vous y avez consacré.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe EES, pour ces trois dernières années. Je fais d'abord un gros clin d'œil à Carine, merci de m'avoir formée aux différents protocoles du laboratoire, pour avoir essayé de m'aider toutes les fois où j'ai dit « Carine est ce que je peux t'embêter deux minutes », et pour ton accompagnement au quotidien. Merci à toi, Hélène, pour le soin au quotidien que tu apportes aux aquariums, pour ta bienveillance et ta bonne humeur qui illumine le laboratoire. Ensuite, je te suis reconnaissante, Maryline, pour ton enseignement si précieux concernant les dissections d'écrevisses, mais surtout pour ta gentillesse infinie. Je te souhaite de profiter à fond de ta retraite. Ensuite, je remercie Isabelle pour l'animation au laboratoire (des étagères qui volent par exemple), mais je voulais surtout te dire merci pour l'accompagnement des petits jeunes que tu mets un point d'honneur à aiguiller. Un petit mot pour toi aussi Tif, toutes nos discussions voyages m'ont souvent permise

de m'évader et de rêver. Pour finir, je te remercie à toi Alex. Nous aurons partagé pleins de bons moments et, surtout, nous représentons la lignée Lafitte/ Laffitte à Poitiers. Je remercie également Christelle pour ta patience à chaque mission. Je profite de cette occasion pour exprimer ma gratitude envers quelques collègues des autres équipes qui m'ont prêté du matériel. Alors, merci, Benoît et Caroline.

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer durant ces trois ans. Tout d'abord, je remercie Michaela/Mishka, ton séjour à Poitiers m'a permis de prendre confiance en anglais et de découvrir énormément de choses sur les écrevisses, mais aussi sur la grossesse ! Je remercie également Kathrin, Luka et Lena pour leur accueil à Francfort pendant 1 mois. Cette expérience dans votre laboratoire a été sans conteste l'une des expériences les plus enrichissantes de ma thèse. Je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui se sont impliquées dans les fédérations de pêche et l'OFB, ainsi qu'à celles qui ont mené à bien les campagnes de terrain nécessaires à la réalisation de cette thèse. Un grand merci également aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, vous vous êtes investis et une partie de ma thèse est aussi la vôtre et le fruit de votre travail ! Merci, Brice et Charlotte, pour votre aide précieuse et pour les bons moments passés ensemble au laboratoire et en dehors. Je pense en particulier à toi, Charlotte, et à notre petit week-end entre filles à Prague avec Mishka. Cet événement restera à jamais gravé dans ma mémoire. Je voulais aussi te remercier, Brice, pour ta grande autonomie en biologie moléculaire, qui, j'en suis sûre, t'assurera un bel avenir.

Je poursuis en exprimant ma reconnaissance envers mes collègues/amis doctorants, qui ont partagé avec moi une partie de ces trois années. L'ensemble de nos discussions scientifiques, mais aussi et surtout votre amitié et votre soutien m'ont permis d'évoluer au cours de ces trois années. Je vais d'abord commencer par les « vieux docs », ceux du B35. Je me rappelle encore mon premier jour comme si c'était hier et vos petites têtes de curieux en découvrant qui était la nouvelle doctorante. Je vais commencer par toi, Cécilia, car tu auras été un modèle pour nous tous de persévérance. Au-delà de ça, ta passion pour la recherche, nos discussions sur les possibilités après un doctorat et ton parcours sont une réelle source d'inspiration pour moi ! Merci pour tous les moments, au Bafalou avec Maggy, au resto (beaucoup trop...), à Biosena et les soirées papote. Tes « roh » et « vous êtes trop conventionnels » resteront gravés. Maintenant que tout le monde a soutenu, j'ai hâte de nos réunions annuelles, ornitho et autres ! Ensuite, je souhaite te remercier, Elie, car tu as été mon papa de thèse, toujours un conseil avisé et une astuce à partager, surtout quand il s'agit de cartes, et avec des « super » jeux de mots en bonus. Je te souhaite vraiment que Pictamap cartonne ! Je te remercie à toi aussi, Thomas pour

l'ensemble des discussions sur les écrevisses et tes épopées en Martinique, mais aussi pour tes conseils avisés. Je souhaite également te remercier, Baptiste, pour tous ces moments passés ensemble dans notre bureau, pour toutes tes délicieuses pâtisseries, mais surtout, surtout, pour ta grande bonté, ta bienveillance et ton courage au quotidien. Pour finir, je termine les « vieux docs » avec toi Totor (le jumeau maléfique). Merci pour tous les moments de rigolades et surtout pour les nombreux fonds d'écrans en tout genre qui ont égayé mon bureau. Merci beaucoup pour ce super surnom qui m'aura suivi un moment grâce à toi. Je souhaite également te remercier, Axel, de toujours prendre mes taquineries avec le sourire. Je vais finir ces remerciements des « docs EES » par toi Camille. Ton souffle d'air frais a insufflé une nouvelle énergie dans cette équipe de docs. Je tiens à te remercier pour ton appui tout au long de cette dernière année de thèse qui aura été très précieux pour moi. Tu as été une super amie, à me gronder quand je fais des folies, mais toujours à l'écoute et présente quand il s'agit de raller. Théo, j'ai hâte de te voir évoluer dans ta thèse qui débute à peine et je te souhaite d'en profiter pleinement. J'attends avec impatience nos futures sorties photo et nature en tout genre. Je te remercie également, Sarah, pour nous avoir permis d'adopter un autre petit monstre et pour tes attentions et ta délicatesse très apaisante. Merci à toi aussi, Dimitri, pour ton entrain à chaque partie de tennis et t'être arrêté la fois où tu as trouvé nos chats sur le bord de la route. Je souhaite maintenant remercier les docs de chez SEVE. Tout d'abord, merci à toi, Beubeu, mon frère de thèse. Nous avons entamé notre thèse en même temps et nous la clôturons presque simultanément. Cela a été vraiment agréable de partager ces trois années ensemble. Je souhaite aussi te dire merci Mathias, pour tes nombreux apprentissages essentiels (torchons, nerfs, ...) et tes conseils très avisés en termes de jeux vidéo. Tu es toujours une oreille attentive et un soutien pour tes amis. Un grand merci à toi Lisa, car tu as amené un peu de douceur dans ce monde de brutes. Et je finis par toi ma petite Elo pour te remercier, car au quotidien, tu es un petit soleil pour nous tous. Tu as une volonté de fer, et tu es une femme incroyablement forte. Je sais tout l'investissement dont Camille et toi aviez fait preuve pour ma soutenance et cela me touche énormément. Vous êtes des amies en or. J'ai hâte de nos prochaines sorties entre girls, à faire du sport, des balades, ou du shopping...

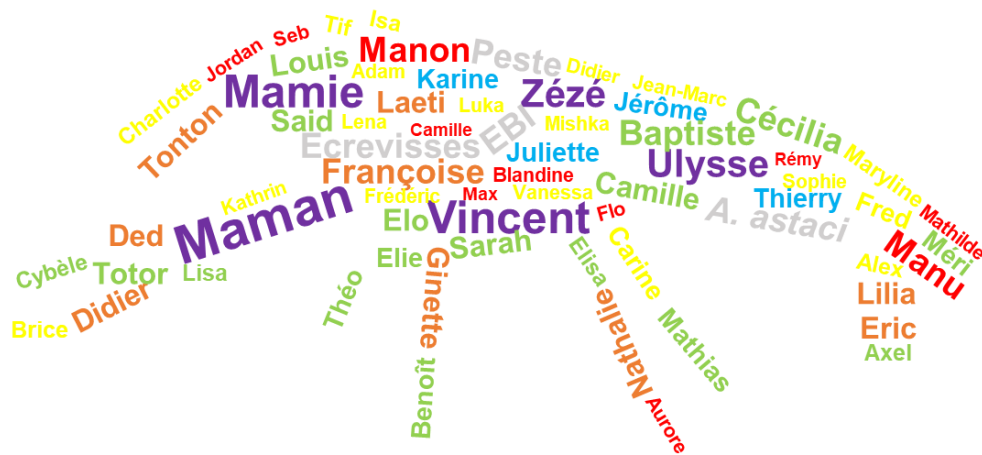
Ensuite, je souhaite remercier mes deux acolytes du bureau des ATER, Said et Louis. Vous êtes vraiment d'un soutien sans failles au quotidien. Merci beaucoup de m'avoir soutenue, épaulée et conseillée lors de cette dernière année. Je suis trop contente de pouvoir partager cette première année d'ATER avec vous deux. Said, cela fait plus de deux ans que l'on partage le bureau et c'est génial de voir l'évolution de tes projets. Loulou Paillette, je souhaite te remercier pour toutes les fois où tu me fais rire avec imitations de termites quotidiennes, tes

prononciations de muffin et ton grain de folie. Merci d'être comme un grand frère et de m'avoir tant épaulée cette année. Par contre, les garçons, si vous pouvez laisser ma plante tranquille, cela serait génial. Je souhaite également remercier Méri et Elisa. Lors de votre Postdoc au labo, nous avons partagé de nombreuses discussions sur la poursuite de notre carrière et nos doutes.

À présent je souhaite remercier mes proches qui ont été d'un soutien sans failles au cours de ces trois années de thèse, mais aussi au cours de mes 5 années d'études qui ont précédé et mes années lycée. Je vais d'abord remercier mes copines du lycée, Mathilde, Blandine, Camille, Aurélie, Aurélie, Maylis, Jehanne, Lucie, Océane et Amandine. Chaque fois qu'on se retrouve, c'est comme si on était encore au lycée toutes ensemble. Ensuite, je souhaite remercier mes amis rencontrés à l'université de Perpignan, Aurore, Remy, Max, Flo, Nico, Marion, Elie. Je garde en mémoire tous nos moments au cours de ces années ainsi que votre venue à Poitiers (malgré la pluie), à Pardies Pietat pour mes 25 ans et en Guyane avec toi Rémy. Je souhaite également remercier la team IMHE. Nos années passées ensemble en master ont renforcé notre lien et je suis toujours très heureuse quand on a l'occasion de se revoir autour d'un verre à Montpellier. Une petite pensée pour vous, Seb et Jordan, car je sais que vous êtes actuellement dans la même galère que moi. Je souhaite aussi vous remercier, Adeline et PH, nos super voisins toujours partant pour ce faire un repas et partager des bons moments. Vous êtes rentrés dans nos vies et même si un jour nous partons de Poitiers, vous serez toujours les bienvenus chez nous ! À présent, je souhaite remercier mes deux merveilleuses amies, je sais que je ne le dis pas souvent, mais vous êtes des piliers pour moi. Tout d'abord, je commence par toi Manu. Je me rappelle encore notre première rencontre en L1. Qui aurait cru qu'on en serait là aujourd'hui ? J'ai été très heureuse de te voir évoluer, et je me réjouis de t'avoir comme amie aujourd'hui. Alors, merci pour tout ça. Ensuite, je voulais te remercier, toi, Manon, car tu auras été un vrai modèle pour moi depuis notre rencontre il y a 5 ans maintenant. Merci pour toutes nos soirées de popote au téléphone, supplément tramontane parfois, qui m'a permis de décompresser. Merci pour tous tes conseils, ton écoute et tes retours d'expérience qui m'ont été très utiles, tu es une amie extraordinaire. J'ai tellement hâte de pouvoir venir en vacances et voir ton nouveau cocon à toi et Mako et Junzo.

Je tiens également à m'adresser à ma famille. Pour commencer, je remercie du plus profond de mon cœur Françoise et Ded, pour avoir toujours été un lien dans la famille. Merci d'avoir toujours suivi les péripéties de mes études et de veiller si bien sur moi. Je remercie également mon père. Ton retour dans ma vie durant ma thèse m'a permis de clôturer un livre et d'en commencer un nouveau, celui de ma vie d'adulte. Je remercie également Didier, Natalie, Laeti et Eric pour votre accueil au sein de la famille Lasserre. Je termine par la partie Bonnacaze

Pour finir, et parce que cette thèse est écrite dans l'hémolymphe de beaucoup trop d'écrevisses, je tiens à les remercier et leur fais un clin d'œil, car ce sont les stars de cette thèse.



Abbreviations:

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de Longueur de Fragments Amplifiés)

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNmt : Acide Désoxyribonucléique mitochondriale

ADNg : Acide Désoxyribonucléique génomique

ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomal

ANOVA : Analysis of Variance

CRU : Crustine

CTRL: Contrôle

DO : Densité optique

EEE : Espèce Exotique Envahissante

EF1 : Eukaryotic translation elongation Factor 1 alpha (Facteur d'élongation de la traduction Eucaryote 1 alpha)

GC : Cellules Granulaires

HC : Cellules Hyalines

HPT : L'organe hématopoïétiques

HSP : Heat Shock Protein (Protéine de Choc Thermique)

INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel

ITS : Internal Transcribed Spacer (Espaceur Transcrit Interne)

LB : Luria Broth

LSU : Grande Sous-Unité ribosomique mitochondriale

OFB : Office Français de la Biodiversité

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns (Motifs Moléculaires Associés aux agents Pathogènes)

PBS : Phosphate Buffered Saline (Solution Saline tamponnée au Phosphate)

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en Chaîne par Polymérase)

PFU : Unité Formant des Plaques

PPO : Prophénoloxdase

PO : Phénoloxdase

POP : Polluants Organiques Persistants

PRR : Pattern Recognition Receptors (Récepteurs de Reconnaissance de Motifs)

PTU : Phenylthiourea

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase quantitative)

RAPD-PCR : Random Amplified Polymorphism DNA (Amplification Aléatoire de l'ADN Polymorphe par Réaction en Chaîne de la Polymérase)

ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces Réactives de l'Oxygène)

SGC : Cellules Semi-Granulaires

SSR : Single Sequence Repeats (Répétitions d'une Séquence Unique)

SSU : Petite Sous-Unité ribosomique mitochondriale

UICN : l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature

Bestiaire des espèces d'écrevisses :

Les écrevisses autochtones



White-Clawed crayfish
L'écrevisse à pattes blanches
Austropotamobius pallipes



Stone crayfish
L'écrevisse des torrents
Austropotamobius torrentium



Noble crayfish
L'écrevisse à pattes rouges
Astacus astacus

Les écrevisses invasives historiques



Signal crayfish
L'écrevisse de Californie
Pacifastacus leniusculus



Louisiana crayfish
L'écrevisse de Louisiane
Procambarus clarkii



Spiny-cheek crayfish
L'écrevisse Américaine
Faxonius limosus

Les nouvelles écrevisses invasives



Kentucky river crayfish
L'écrevisse juvénile
Faxonius juvenilis



Marbled crayfish
L'écrevisse marbrée
Procambarus virginalis



Northern crayfish
L'écrevisse à pinces bleues
Faxonius virilis



Rusty crayfish
L'écrevisse à taches rouges
Faxonius rusticus



Calico crayfish
L'écrevisse calico
Faxonius immunis

Table des matières :

I-	Les invasions biologiques dans les milieux aquatiques d'eau douce.....	1
a)	Stratégie d'invasion des espèces exotiques envahissantes	1
b)	Impacts écologiques des espèces envahissantes aquatiques	3
c)	Impacts économiques des espèces envahissantes aquatiques	6
d)	Parallèle entre les invasions biologiques et le parasitisme.....	9
II-	Impact des écrevisses exotiques envahissantes en Europe.....	13
a)	Généralités sur les écrevisses	14
b)	Impact des écrevisses envahissantes sur la chaîne trophique.....	16
c)	Impact sur les écrevisses autochtones	17
d)	Vecteur de maladie	20
III-	<i>Aphanomyces astaci</i> , un pathogène envahissant responsable de la peste de l'écrevisse	21
a)	Classification des oomycètes et du genre <i>Aphanomyces</i>	22
b)	Historique de l'introduction de <i>Aphanomyces astaci</i> en Europe	23
c)	Cycle de vie du pathogène.....	23
d)	Susceptibilité et tolérance des espèces hôtes.....	25
e)	Transmission dans l'environnement.....	27
	Objectifs de la thèse :	29
	Chapitre 1 :	31
	<i>Faxonius rusticus</i> , l'écrevisse à taches rouges, une nouvelle menace au sein des écosystèmes d'eaux douces en France	31
	Chapitre 2 :	51
	Prévalence de <i>Aphanomyces astaci</i> dans les populations d'écrevisses invasives en France et implication dans les épizooties d'écrevisse à pattes blanches.....	51
a)	Prévalence de <i>Aphanomyces astaci</i> dans les populations d'écrevisses de Louisiane dans l'ouest de la France : quel est le risque pour l'écrevisse autochtone à pattes blanches ?	56
b)	Évolution des taux de prévalences d' <i>Aphanomyces astaci</i> dans les populations d'écrevisse signal, <i>Pacifastacus leniusculus</i>	68

Chapitre 3 :	73
Transferts interspécifiques d' <i>Aphanomyces astaci</i> entre espèces cooccurrentes.....	73
a) Diversité et distribution de <i>Aphanomyces astaci</i> dans un point chaud européen d'introduction d'écrevisses ornementales.....	76
b) Transmissions interspécifiques d' <i>Aphanomyces astaci</i> au sein de populations mixtes comprenant deux espèces d'écrevisse <i>Faxonius rusticus</i> et <i>Pacifastacus leniusculus</i>	89
Chapitre 4 :	95
Diversité intragroupe génétique chez <i>Aphanomyces astaci</i>	95
Chapitre 5 :	117
Réponse immunitaire de l'écrevisse <i>Astacus astacus</i> en réponse à une infection	117
Discussion :	135
Prologue :	137
I- Contrôler les nouvelles introductions d'écrevisses en France	138
II- La prévalence de <i>Aphanomyces astaci</i> dans les populations d'écrevisses envahissantes	146
III- Suivis épidémiologiques de <i>Aphanomyces astaci</i>	151
IV- Caractériser la réponse immunitaire des écrevisses.	154
Conclusion :	157
Bibliographie.....	159

Table des figures et des tableaux :

Introduction

Figure 1 : Schéma des étapes du processus d'invasion biologique, le transport, l'introduction, l'établissement et la dispersion ainsi que les barrières que doit franchir une espèce pour s'implanter sur un nouveau territoire et les mesures de conservation à mettre en place.

Figure 2 : Liste des 33 espèces présentant un score de risque très élevé. Les espèces sont regroupées par groupes taxonomiques.

Figure 3: Évolution du nombre d'articles scientifiques sur les espèces exotiques envahissantes dans le milieu aquatique.

Figure 4 : Les coûts économiques en US\$ associés aux 10 genres d'espèces aquatiques envahissantes majeures issues de la base de données InvaCost.

Figure 5 : Le coût total des écrevisses envahissantes en US\$ et les différents secteurs impactés par ces espèces.

Figure 6 : Phylogénie de la superfamille des Astacoidea.

Figure 7: Distribution des cinq espèces autochtones en Europe et leur aire de répartition présumée

Figure 8 : Le succès invasif des Écrevisses exotiques envahissantes dû à des traits d'histoire de vie avantageux.

Figure 9 : Les différents groupes de pathogènes décrits dans la littérature comme capables d'infecter les écrevisses.

Figure 10 : Cladogramme du genre *Aphanomyces* basé sur l'ARN ribosomique 5.8S représentant les trois lignées en fonction de leurs interactions.

Figure 11 : Cycle de vie d'*A. astaci*.

Tableau 1 : Espèces envahissantes réservoirs, vecteurs et parasites appartenant à la liste des « 100 espèces les plus envahissantes au monde » d'après l'UICN.

Tableau 2 : Les espèces exotiques envahissantes en Europe, distribution et source de l'introduction.

Tableau 3 : Susceptibilité et tolérance des espèces à la peste de l'écrevisse.

Chapitre 1 :

Figure 12: Évolution de la dispersion des écrevisses exotiques envahissantes en France de 1977 à aujourd'hui.

Chapitre 2 :

Figure 13 : Méthode de détection et quantification des niveaux d'infection par *A. astaci*.

Figure 14 : Évolution des prévalences détectées de *A. astaci* dans les populations de *P. leniusculus* ré-échantillonnées en 2021/2022.

Table 4: Prévalence d'*A. astaci* dans populations de *P. leniusculus*.

Chapitre 3 :

Figure 15 : composition allélique issue des neuf loci microsatellites pour les 4 spécimens de *P. leniusculus* et *F. rusticus*, pour les génotypes de référence, dont le génotype SSR-Rust nouvellement décrit par Panteleit et al. (2019).

Figure 16: Profils des QPCR génotypages réalisés à partir des spécimens *P. leniusculus* et *F. rusticus* infectés sur le cours d'eau d'Inières.

Chapitre 4 :

Figure 17: Les méthodes de caractérisation génétique des souches de *A. astaci*

Figure 18 : Analyses phylogénétiques des séquences de sous-unité ribosomique mitochondriales d'*A. astaci*.

Tableau 5: Tableau récapitulatif de la diversité génétique au sein du genre *A. astaci*.

Chapitre 5 :

Figure 19 : Design expérimental de l'infection de *A. astacus* par la bactérie Gram négatif *C. freundii*.

Figure 20 : Probabilité de survie (en %) des écrevisses *A. astacus* lors d'une infection par *C. freundii* au cours du temps.

Figure 21: Le nombre total d'hémocytes (THC) présenté pour chaque temps de la cinétique d'infection par *C. freundii*.

Figure 22 : Activité de l'enzyme phénoloxydase dans les hémocytes et le plasma de *A. astacus* lors d'une infection par *C. freundii* au cours du temps.

Figure 23 : Expression différentielle des gènes de l'immunité de *A. astacus* au cours du temps lors d'une infection par *C. freundii*.

Discussion :

Figure 24: Exemple de quelques articles publiés cette été concernant *P. clarkii* dans divers articles de presse entre Juin et Aout 2024.

Figure 25 : Distribution des génotypes *Aphanomyces astaci* en Europe.

Figure 26 : Histogrammes des scores attribués aux paramètres mesurés pour chaque souche réalisé par Francesconi et al., en 2024 associé au génotypes décrit dans notre étude .

Introduction

I- Les invasions biologiques dans les milieux aquatiques d'eau douce

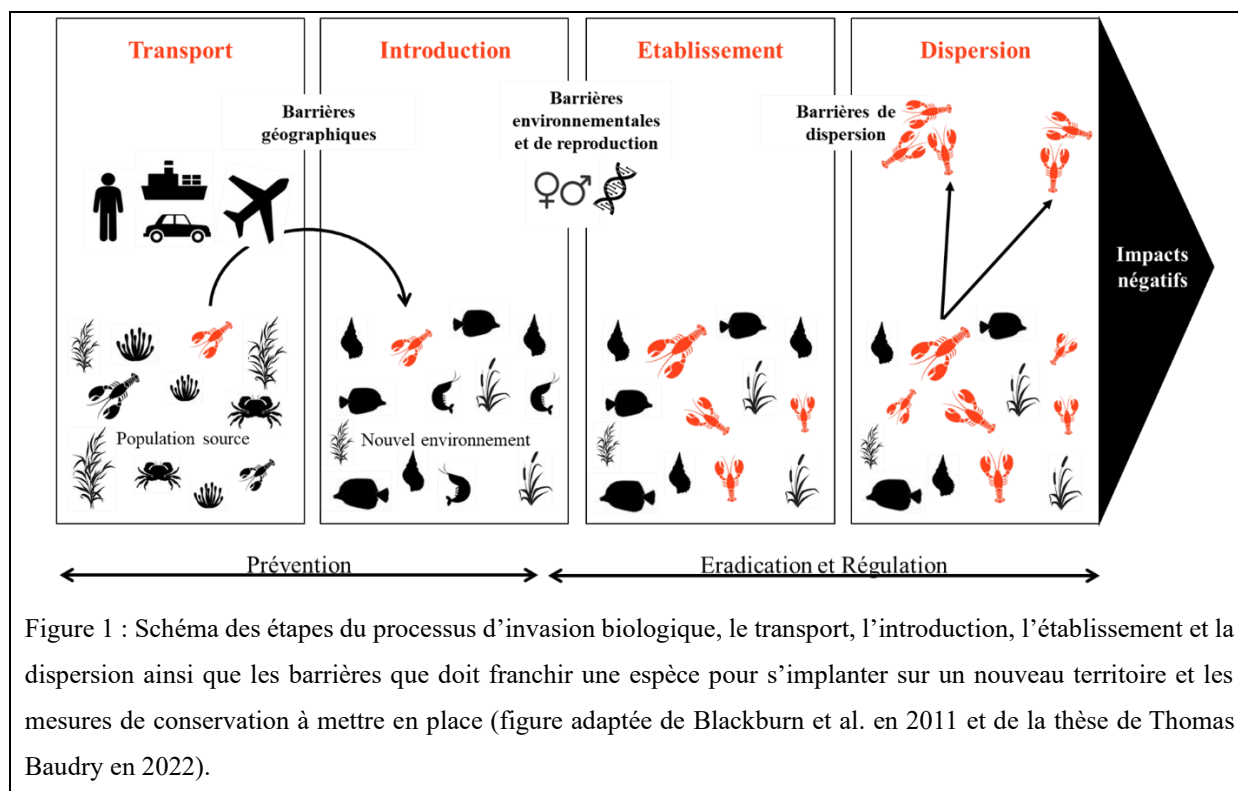
Les écosystèmes d'eau douce occupent une superficie de moins de 1% de la surface de la Terre. Cependant, ils regroupent environ 10% des espèces connues, dont 30% des vertébrés (Strayer & Dudgeon, 2010). Cette concentration exceptionnelle de biodiversité rend les écosystèmes d'eau douce particulièrement vulnérables aux pressions anthropiques croissantes. L'augmentation exponentielle des activités humaines depuis la révolution industrielle a très largement impacté les écosystèmes et les espèces, entraînant une perte globale de biodiversité (environ 68% de 1970 à 2016) (WWF, 2020). Les causes multifactorielles de cette diminution sont la surexploitation des ressources, la pollution, la modification des habitats, le changement climatique ou encore l'introduction d'espèces exotiques envahissantes (EEEs) et de leurs pathogènes associés. Les invasions biologiques, résultant de l'introduction d'espèces exotiques animales ou végétales, sont la 4^{ème} cause de diminution de la biodiversité et représentent un défi environnemental majeur (Flood et al., 2020). La distribution des espèces évolue constamment, mais ce phénomène est amplifié en raison des activités anthropiques qui conduisent à la translocation de nombreuses espèces. Les invasions biologiques sont un exemple de ces changements de distributions et sont l'une des principales sources de « nouveautés écologiques » dans les écosystèmes (Hobbs et al., 2009). Ce terme est utilisé pour décrire des systèmes écologiques nouvellement créés avec peu/pas d'histoire de coévolution et souvent soumis à des changements écologiques ou évolutifs rapides (Hobbs et al., 2009). Ces EEEs sont souvent à l'origine de catastrophes écologiques (Pintor et al., 2008; Souty-Grosset et al., 2016; van Kuijk et al., 2021). Les écosystèmes aquatiques d'eau douce sont particulièrement impactés par l'introduction de nouvelles espèces, car, par surface, ils possèdent la plus grande biodiversité par rapport aux écosystèmes marins et terrestres (Dudgeon et al., 2006).

a) Stratégie d'invasion des espèces exotiques envahissantes

Le processus d'invasion d'un nouvel environnement par une espèce suit en général le schéma décrit par Blackburn et al, (2011) (Figure 1). Tout d'abord, intentionnellement ou involontairement, l'homme est souvent responsable de l'introduction d'une espèce sur un nouveau territoire. Son intervention facilite le franchissement des barrières géographiques, notamment par le biais du transport maritime, l'aquaculture, ou encore le commerce des animaux de compagnie (García-Berthou et al., 2005; Jussila et al., 2021; Renault et al., 2022). L'espèce exotique nouvellement introduite est alors confrontée à un nouvel écosystème et doit s'adapter aux paramètres physico-chimiques et climatiques, mais aussi aux communautés



d'espèces natives présentes (Blackburn et al., 2011). L'établissement de l'espèce au sein de cet environnement dépend alors de sa capacité à faire face à ces nouvelles conditions tout en poursuivant son cycle de vie et en se reproduisant. Lorsque l'espèce est établie, elle peut alors proliférer et accroître sa densité de population, puis entamer une phase de dispersion afin de coloniser d'autres territoires (Blackburn et al., 2011).



Certains traits d'histoire de vie, comme la croissance et la reproduction, jouent un rôle clef dans le succès d'une invasion biologique (Souty-Grosset et al., 2015). Par exemple, certaines espèces engendrent une progéniture nombreuse et investissent peu dans les soins maternels (stratégie de reproduction dite « r ») alors que d'autres produisent peu de descendants et investissent dans leur survie (stratégie de reproduction dite « K »). La stratégie « r » est en général plus favorable à l'établissement d'une espèce envahissante (Facon et al., 2006), bien que la stratégie K puisse être compétitive. Le succès invasif d'une espèce dépend du milieu d'accueil et des organismes qui le peuplent. Une espèce envahissante confrontée à une niche occupée ne s'établira durablement qu'en étant plus compétitive que les espèces autochtones (Facon et al., 2006). L'absence de prédateur et un régime alimentaire de type omnivore sont aussi des facteurs clés dans les invasions biologiques (Souty-Grosset et al., 2015 ; Renault et al., 2023). L'introduction d'espèces et leur établissement ont souvent un fort impact sur les



écosystèmes (Flood et al., 2020), notamment par le biais de la compétition avec les espèces indigènes pour les ressources et les habitats, ou encore par l'introduction de pathogènes (Souty-Grosset et al., 2016). Cela peut engendrer une diminution de la biodiversité locale, à travers la dégradation des habitats et la perturbation des chaînes alimentaires (WWF, 2020). De nombreuses études ont montré que les invasions biologiques dans les écosystèmes aquatiques touchaient une grande variété de groupes taxonomiques, allant des plantes aux animaux, tels que les reptiles, les poissons, les amphibiens et les crustacés (Simberloff et al., 2013; Strayer, 2010). À terme, une espèce envahissante peut également avoir des conséquences économiques, affectant par exemple la pêche, le tourisme et les infrastructures aquatiques (Souty-Grosset et al., 2016). Avec une augmentation constante des épisodes d'invasions et des coûts associés, il est essentiel de mettre en place des stratégies de gestion qui incluent des mesures de prévention, la détection précoce des introductions et l'éradication ou la régulation des populations établies ainsi que la restauration des habitats affectés.

b) Impacts écologiques des espèces envahissantes aquatiques

Les invasions biologiques représentent l'un des principaux défis écologiques auxquels les écosystèmes aquatiques sont confrontés (WWF, 2020). Les impacts écologiques dans les milieux aquatiques sont vastes et variés, affectant la biodiversité, les cycles biogéochimiques, ainsi que la structure et le fonctionnement des écosystèmes. Ce phénomène constitue une menace majeure pour la santé des écosystèmes aquatiques, et par extension, pour les services écosystémiques qu'ils fournissent à l'humanité (Ferreira et al., 2023; Flood et al., 2020; Simberloff et al., 2013). Les espèces envahissantes ont des impacts profonds sur les écosystèmes aquatiques qu'elles colonisent, perturbant à la fois la structure physique du milieu, mais aussi la chaîne trophique (Flood et al., 2020; Simberloff et al., 2013), si bien que certaines méthodologies ont été développées pour mesurer le potentiel impact des espèces envahissantes.

Tout d'abord, l'introduction de nouvelles espèces peut modifier profondément les habitats aquatiques et altérer la structure physique de ceux-ci. En modifiant les caractéristiques physiques, chimiques ou biologiques d'un écosystème, elles peuvent rendre l'environnement moins favorable pour les espèces autochtones, tout en facilitant leur propre expansion (Strayer, 2010). Par le biais du milieu, ces altérations impactent indirectement les espèces autochtones, affectant leur cycle de vie, pouvant entraînant leur disparition. Les plantes aquatiques envahissantes, comme par exemple, *Myriophyllum heterophyllum*, sont des espèces qui ont un fort impact sur les paramètres physico-chimiques du milieu (Gross et al., 2020). Originaire d'Amérique du Nord, cette plante aquatique à feuilles persistantes a envahi de nombreux plans



d'eau en Europe. Elle forme des tapis denses à la surface de l'eau, bloquant la lumière, limitant la photosynthèse des plantes submergées, ce qui réduit le renouvellement de l'oxygène dissous. De plus, en raison de sa croissance rapide, la plante produit une grande biomasse qui entraîne une accumulation de matière organique dans les sédiments (Gross et al., 2020). Cette accumulation de matière organique peut à son tour provoquer une diminution des niveaux d'oxygène dissous dans l'eau, créant des conditions hypoxiques ou anoxiques, défavorables à d'autres espèces. Le processus de décomposition peut également augmenter la libération de nutriments, tels que l'azote et le phosphore, et ainsi favoriser l'eutrophisation du milieu (Hussner et al., 2017). L'eutrophisation, à son tour, entraîne des proliférations d'algues nocives, qui exacerbent davantage les problèmes d'oxygénation et déstabilisent les écosystèmes aquatiques. À terme, leur développement réduit la diversité des plantes aquatiques locales, appauvrit les écosystèmes (Moody & Les, 2007) et affecte les communautés d'invertébrés et de poissons. De plus, les changements dans la structure de l'habitat peuvent entraîner la disparition des zones de reproduction, de nourrissage et de refuge pour les espèces locales, perturbant ainsi les cycles de vie de nombreuses espèces aquatiques. Par exemple, les herbiers marins sont envahis par une graminée *Spartina alterniflora*, une plante halophyte introduite dans plusieurs estuaires à travers le monde. Cette plante modifie la structure des vasières en créant des zones émergées où l'eau stagnante favorise l'accumulation de sédiments, ce qui conduit à la perte d'habitat pour les oiseaux migrateurs et les poissons qui dépendent de ces zones intertidales (Neira et al., 2006).

Ensuite, au-delà de modifier les paramètres physico-chimiques de l'environnement, les EEEs perturbent la chaîne trophique en étant en compétition directe avec les espèces indigènes pour des ressources limitées, telles que la nourriture ou l'espace (Strayer, 2010). Cette compétition peut avoir des effets dévastateurs sur les populations locales. Par exemple, la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*), originaire de la mer Caspienne et de la mer Noire, a été introduite dans les Grands Lacs en Amérique du Nord. Cette espèce filtre de grandes quantités de phytoplanctons, réduisant ainsi la disponibilité de cette ressource pour les espèces indigènes, notamment les poissons et les mollusques locaux (Strayer, 2009). Cette diminution des ressources alimentaires a conduit à des déclinés importants des populations de certaines espèces de poissons, modifiant ainsi les réseaux trophiques de ces écosystèmes. La tortue de Floride (*Trachemys scripta elegans*) est une autre espèce envahissante emblématique des écosystèmes d'eau douce. Originaire du sud des États-Unis, cette tortue a été largement introduite à travers le monde via le commerce des animaux de compagnie, et a rapidement colonisé de nombreux plans d'eau en Europe, en Asie et en Amérique du Sud (Cadi & Joly, 2004). Elle est par exemple

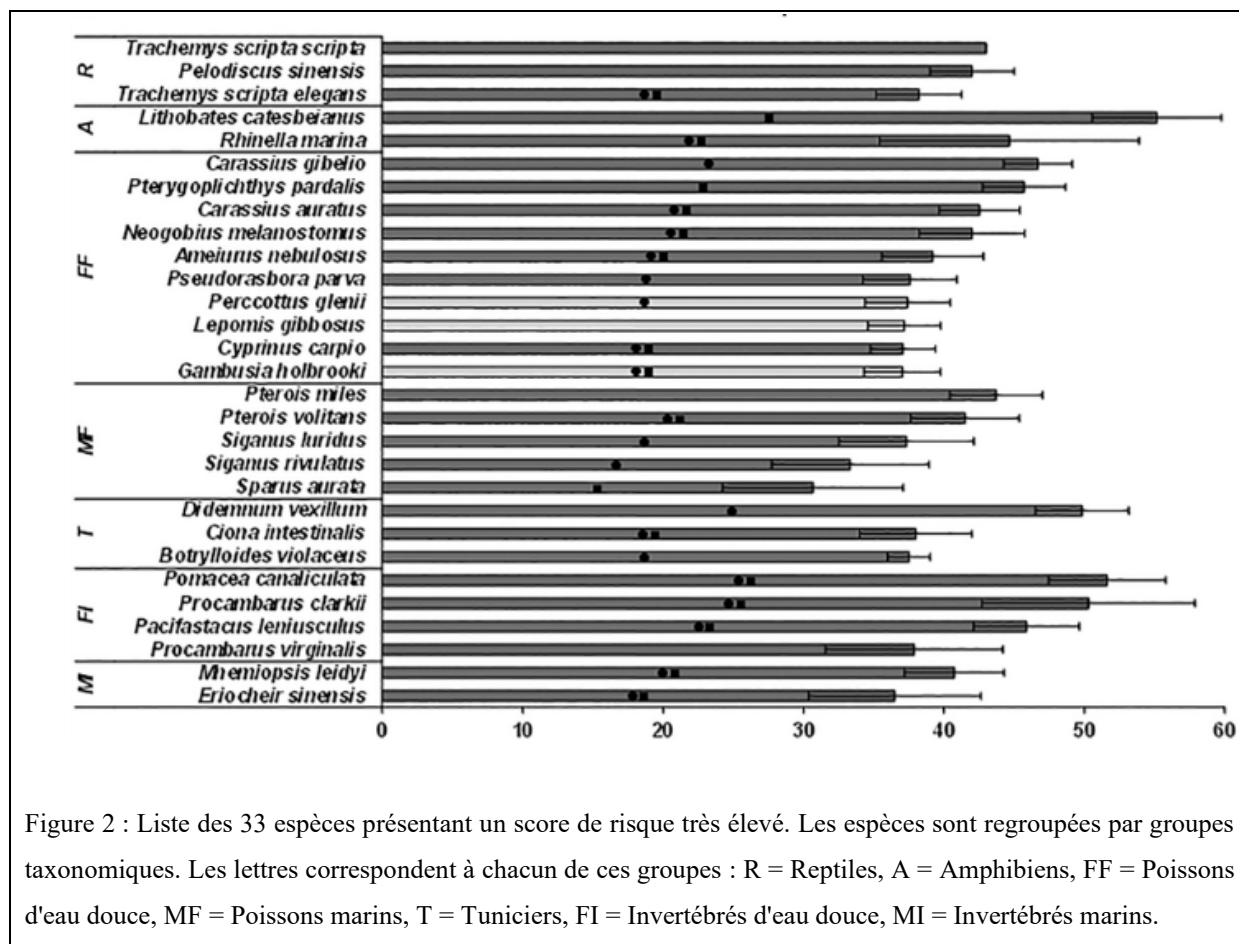


en compétition pour les ressources alimentaires avec la cistude d'Europe (*Emys orbicularis*), déjà menacée par les activités anthropiques. En raison de sa taille, de son comportement opportuniste et de son adaptabilité, la tortue de Floride est souvent plus compétitive que les espèces locales, notamment pour l'accès à la nourriture, aux sites de ponte et aux abris (Cadi et Joly, 2004).

Pour évaluer les risques que représentent les EEEs pour les espèces et écosystèmes aquatiques natifs, et pour soutenir la prise de décision de gestion, une méthodologie a été développée. Celle-ci attribue un score permettant de mesurer la menace posée par chaque espèce, appelée « Aquatic Species Invasiveness Screening Kit » (Figure 2) (Vilizzi et al., 2021). Cet outil, applicable à de nombreux groupes de taxons aquatiques (plantes et animaux), permet ainsi de classer les espèces en catégories (risque élevé, moyen ou faible), en tenant compte de divers facteurs (région, climat, type de système aquatique...). Cet outil a permis de tester 819 espèces parmi 15 groupes taxonomiques et 33 espèces ont été identifiées comme présentant un risque « très élevé » de devenir envahissantes (Figure 2). Parmi ces espèces sont notamment regroupés des poissons d'eau douce, comme la carpe, la tortue de Floride, mais aussi trois espèces d'écrevisses envahissantes *Pacifastacus leniusculus*, *Procambarus clarkii* et *Procambarus virginalis* (Vilizzi et al., 2021).

Ainsi, dans les écosystèmes d'eau douce, les invasions biologiques peuvent avoir des effets profonds et durables sur la biodiversité et les processus écologiques. La gestion et la prévention des invasions nécessitent une compréhension approfondie de la source de l'introduction, des caractéristiques de l'espèce et des impacts écologiques sur le milieu et ses communautés, ainsi que des efforts coordonnés à l'échelle locale et internationale.





c) Impacts économiques des espèces envahissantes aquatiques

Les écosystèmes aquatiques sont essentiels, car ils fournissent de nombreux services, comme les ressources alimentaires, les loisirs et la protection contre les intempéries (Flood et al., 2020; Ferreira et al., 2023). Les invasions biologiques dans le milieu aquatique menacent ces écosystèmes en entraînant une perte de biodiversité qui affecte également les services écosystémiques rendus par le milieu. Le nombre d'espèces exotiques envahissantes ne cesse d'augmenter dans diverses régions. Selon les projections, le nombre d'espèces exotiques établies devrait croître de 36 % au cours des trente prochaines années (Seebens et al., 2021). Les EEEs sont responsables de dommages économiques conséquents à l'échelle mondiale. Ces introductions entraînent des pertes financières directes (consommation de culture, altération des infrastructures), indirectes (impact sur le tourisme, la pêche ...) et les frais de gestion des écosystèmes associés à ces introductions. Depuis le début du 21^e siècle, de nombreuses études scientifiques ont tenté de quantifier les coûts engendrés par les espèces exotiques envahissantes, afin de souligner l'importance de prévenir leur introduction (Lovell et al., 2006; Souty-Grosset et al., 2016; Jussila et al., 2021; Cuthbert et al., 2021; Jiang et al., 2022). La prise de conscience



croissante des conséquences écologiques et économiques liées à l'introduction d'espèces aquatiques envahissantes s'est accompagnée d'une augmentation notable du nombre de publications scientifiques sur ce sujet (Figure 3). Au cours des dernières décennies, les chercheurs se sont de plus en plus penchés sur l'impact de ces espèces, générant une littérature abondante qui explore leurs effets sur les écosystèmes, les espèces indigènes, ainsi que les stratégies de gestion et de prévention.

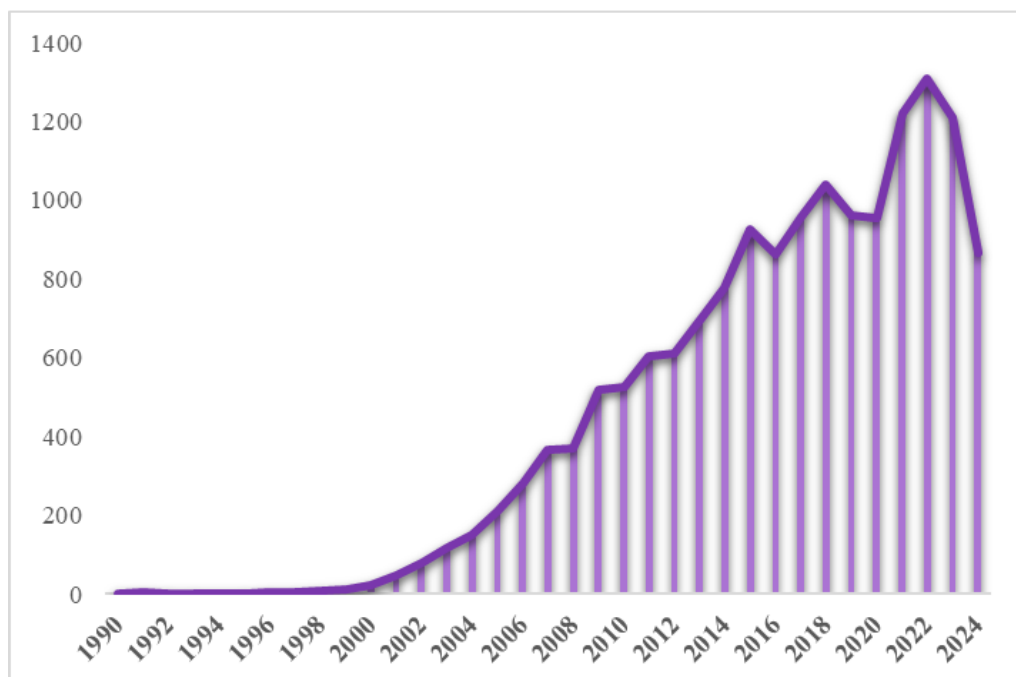
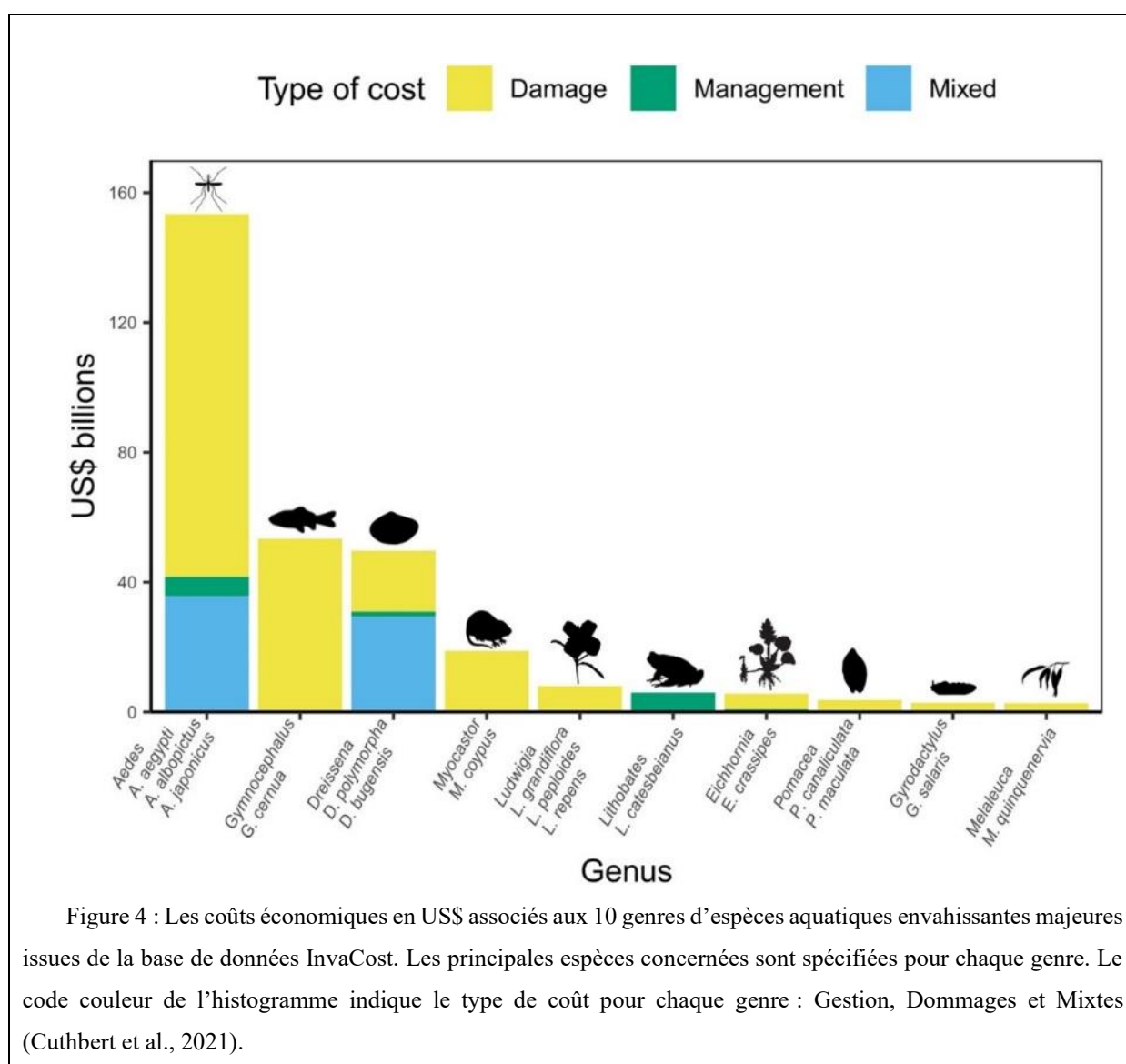


Figure 3: Évolution du nombre d'articles scientifiques sur les espèces exotiques envahissantes dans le milieu aquatique. Ce graphique a été réalisé en dénombrant les articles publiés dans google scholar pour chaque année depuis 1990 jusqu'au 14 septembre 2024. L'année n'étant pas encore achevée, l'ensemble des articles publiés cette année ne sont pas comptabilisés en 2024.

Il est extrêmement difficile d'évaluer les dépenses liées à ces EEEs, car les impacts peuvent être plus ou moins visibles. Les coûts associés aux espèces aquatiques sont généralement moins compris que ceux des espèces terrestres. Cependant, les estimations indiquent des chiffres élevés (Cuthbert et al., 2021; Lovell et al., 2006). Par exemple, les coûts globaux associés aux EEEs aquatiques ont été estimés autour des 345 milliards de dollars américains, d'après la base de données InvaCost (Cuthbert et al., 2021; Diagne et al., 2020). Celle-ci regroupe et standardise les coûts économiques associés aux EEEs dans le monde (Diagne et al., 2020). L'ensemble des données utilisées par Cuthbert et al., 2021 regroupent des coûts associés à des espèces aquatiques et semi-aquatiques. Cette étude a ainsi révélé que les coûts liés aux espèces



envahissantes sont inégaux en fonction des groupes taxonomiques, et que la majorité (62%) de ces coûts sont associés aux invertébrés. Leur analyse a permis de mettre en avant que, parmi les 10 genres présentant des dépenses les plus documentées, les moustiques du genre *Aedes* sont de loin le clade semi-aquatique qui entraîne le plus de frais, estimés à 304 milliards de dollars) (Figure 4). À l'échelle mondiale, le moustique est un vecteur de nombreux pathogènes qui causent plus d'un milliard d'infections (Campbell-Lendrum et al., 2015), ce qui entraîne des frais de santé et de gestion importants. Dans une moindre mesure, les grémilles, les moules, les ragondins et les jussies sont les autres taxons envahissants pour lesquels des dépenses conséquentes ont été documentées (Figure 4).



Il est cependant important de préciser que l'ensemble de ces coûts sont probablement très largement sous-évalués. En effet, l'étude des EEEs est une science relativement récente, moins de 30 ans (Figure 3) ; or ces introductions ont débuté il y a plusieurs siècles. L'industrialisation et la mondialisation ont cependant amplifié ce phénomène, avec l'augmentation des échanges à large échelle (Cuthbert et al., 2021). Le manque de connaissances des impacts écologiques et économiques de ces espèces dans certaines régions du monde, participe à sous-évaluer les coûts associés aux EEEs aquatiques (Cuthbert et al., 2021). En effet, ces coûts sont répartis inégalement à travers le monde. Ils sont particulièrement élevés en Amérique du Nord (166 milliards \$US) et en Asie (45 milliards \$US). À l'inverse la base de données InvaCost ne recense aucun coût lié aux EEEs aquatiques pour de nombreuses régions, en particulier en Afrique. Ce manque d'information est une lacune importante dans l'estimation des coûts engendrés par les EEEs à l'échelle mondiale. Par exemple, l'Afrique du Sud est un pays connu pour avoir subi de nombreuses introductions d'invertébrés et de poissons dans divers environnements d'eau douce, estuariens et marins, entraînant de nombreux impacts sur l'Homme (Cuthbert et al., 2021; Robinson et al., 2020). Les coûts engendrés par ces introductions ont cependant été trop peu documentés.

Les parasites contribuent à complexifier encore davantage l'estimation de leurs coûts économiques et écologiques. En effet, les EEEs introduisent avec elles leurs pathobiomes lorsqu'elles sont transloquées. Elles peuvent également être infectées dans les écosystèmes d'introduction. Ces deux événements peuvent amplifier les impacts négatifs des EEEs sur la biodiversité (Torchin et al., 2003). Le cas des moustiques du genre *Aedes* est un exemple majeur, car ces espèces envahissantes agissent également comme vecteurs de parasites, tels que la dengue et le chikungunya, entraînant des frais sanitaires et de gestion considérables (Campbell-Lendrum et al., 2015). Ainsi, la prise en compte des parasites dans l'étude des EEEs est essentielle pour améliorer l'estimation des coûts, en particulier dans les zones géographiques sous-étudiées.

d) Parallèle entre les invasions biologiques et le parasitisme

Il existe des similitudes entre l'introduction d'une nouvelle espèce dans un environnement et la colonisation d'un hôte par un parasite (Blackburn et al., 2011; Dunn & Hatcher, 2015). Les parasites sont des organismes qui diminuent la fitness de son hôte en l'infectant. C'est-à-dire sa capacité à survivre et à se reproduire. En effet, en puisant dans les ressources de l'hôte, en déclenchant une réponse immunitaire ou en altérant ses fonctions biologiques, les parasites peuvent réduire le succès reproducteur et sa longévité de leurs hôtes. Les parasites incluent à la



fois les microparasites (virus, bactéries, protozoaires, champignons) et les macroparasites (helminthes, arthropodes) (Méthot & Alizon, 2014). Les parasites représentent une biomasse considérable et constituent environ 40 % de la biodiversité totale sur Terre, ce qui en fait l'un des modes de vie les plus réussis (Poulin et Morand, 2000 ; Hatcher et Dunn, 2011). Comme les espèces envahissantes introduites, les parasites modifient les interactions biotiques et abiotiques du milieu. Parfois, ils ont un rôle clef au cours des invasions biologiques, car ils modifient les rapports de force et les interactions entre les espèces envahissantes et natives (Dunn et al., 2012). Par exemple, la liste des 100 espèces les plus envahissantes du monde regroupe, 6 espèces envahissantes réservoir de pathogènes, 7 espèces de parasites responsables de maladies infectieuses dans la faune sauvage et une espèce vectrice de maladie parasitaire (Tableau 1) (Simberloff & Rejmanek, 2019).

L'introduction d'une nouvelle espèce dans un écosystème est souvent source de modifications dans les combinaisons hôtes-parasite du milieu. Tout d'abord, l'espèce introduite peut devenir une nouvelle source d'hôtes potentielle pour les parasites présents dans cet environnement. Ainsi, l'espèce peut alors avoir un rôle de réservoir et favoriser le phénomène de rétro-transmission du parasite d'un hôte invasif à l'hôte natif (Dunn & Hatcher, 2015). Par exemple, la cicadelle de la vigne, *Erythroneura elegantula* est une espèce d'insecte infecté par le parasitoïde *Anagrus epos*. L'espèce invasive *Erythroneura variabilis*, agit comme réservoir pour le parasitoïde qui attaque préférentiellement l'hôte natif et favorise l'espèce introduite (Settle & Wilson, 1990 ; Dunn & Hatcher, 2015). À l'inverse certaines espèces sont introduites avec leurs pathogènes. Dans ces cas, elles peuvent tirer avantage de leur pathobiome, en causant des dégâts importants aux espèces locales (Daly et al., 2023). Dans le contexte des invasions biologiques, ce phénomène est qualifié d'«arme biologique» et offre ainsi un avantage compétitif à l'envahisseur (Daly et al., 2023). Par exemple, le virus de la variole de l'écureuil a été introduit au Royaume-Uni en même temps que l'écureuil gris envahissant, *Sciurus carolinensis*. Ce virus, bénin pour l'espèce d'origine, est par contre mortel pour l'écureuil rouge natif, *S. vulgaris*, accélérant ainsi le remplacement de l'espèce locale par celle introduite (Strauss et al., 2012; Tompkins et al., 2003). De manière similaire, *Aphanomyces astaci*, l'agent causal de « la peste des écrevisses », semble être un avantage dans la dispersion des écrevisses envahissantes en Europe (Soderhall all and Cerenius, 1998 Dieguez-Uribeondo, 2006). Ce pathogène a décimé de nombreuses populations d'écrevisses autochtones et continu d'être une menace pour celles restantes (Caprioli et al., 2018; Collas et al., 2016; Laffitte et al., 2023; Mirimin et al., 2022; Mojžišová et al., 2020).



Tableau 1 : Espèces envahissantes réservoirs, vecteurs et parasites appartenant à la liste des « 100 espèces les plus envahissantes au monde » d'après l'UICN (adapté de (Dunn & Hatcher, 2015)).

Espèce	Groupe taxonomique	Maladie associée	Impact sur la faune	Origine	Mécanisme de propagation
Parasite envahissant					
<i>Aphanomyces astaci</i>	Oomycètes	La peste de l'écrevisse	Déclin des populations d'écrevisses autochtones en Europe	Amérique du Nord	Aquaculture et trafic d'animaux d'ornement
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Champignon	La chytridiomycose	Déclin des amphibiens.	Asie de l'Est	Aquaculture
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Champignon	Le chancre du châtaignier	Mortalité massive des châtaigniers	Japon	Pépinières et propagation locale par spores aériennes.
<i>Ophiostoma ulmi</i>	Champignon	La graphiose de l'orme	Mortalité massive des ormes	Probablement d'Asie	Commerce du bois et propagation locale par coléoptères.
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Champignon	Le champignon du cinnamome	Déclin des plantes ligneuses natives	Asie	L'agriculture et la sylviculture.
<i>Plasmodium relictum</i>	Protiste	Le paludisme aviaire	Extinction d'oiseaux endémiques	Afrique	Introductions d'oiseaux
<i>Morbillivirus</i>	Virus	La peste bovine	Mortalité massive de bétail domestique et d'ongulés sauvages	Asie centrale	Ongulés sauvages et transmission du bétail domestique à forte densité
Espèces envahissantes réservoir					
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite arc-en-ciel)	Poisson	La maladie des tourbillons	Réservoir pour <i>Myxobolus cerebralis</i> , causant la maladie des tourbillons chez les poissons sauvages	Amérique du Nord	La pêche sportive et l'aquaculture
<i>Sciurus carolinensis</i> (écureuil gris)	Mammifère	Le virus de la variole de l'écureuil	Compétition avec l'écureuil rouge et transmission du virus de la variole de l'écureuil	<i>Sciurus carolinensis</i>	Ornement et production de fourrures
<i>Lithobates catesbeianus</i> (grenouille taureau américaine)	Amphibien	La chytridiomycose	Réservoir pour la chytridiomycose, causant des déclin massifs d'amphibiens	Amérique du Nord	Alimentation et lutte biologique.
<i>Sturnus vulgaris</i> (étourneau sansonnet)	Oiseau	Le paludisme aviaire/ La psittacose	Réservoir pour des maladies comme <i>Plasmodium relictum</i> et <i>Chlamydia psittaci</i> , affectant les oiseaux et les humains	Afrique, Asie et Europe	Lutte biologique, activité anthropique
<i>Gambusia affinis</i> (gambusie)	Poisson	Les helminthiases	Réservoir d'helminthes	Amérique du Nord	Lutte biologique, aquariophilie
<i>Uta stansburiana</i> (petite mangouste indienne)	Mammifère	La rage	Réservoir de la rage	Inde	Lutte biologique
Vecteur envahissant					
<i>Anopheles quadrimaculatus</i> (moustique)	Insecte	Le paludisme	Vecteur du paludisme et du virus du Nil occidental	Amérique du Nord	Activités anthropiques, réchauffement climatique

D'autre part, plutôt que d'introduire ou d'acquérir des parasites, les espèces envahissantes peuvent perdre leurs parasites au cours de l'invasion (Torchin et al., 2003). L'étude de 26 espèces hôtes de différents taxons de Torchin et al, (2003), a permis de démontrer que le nombre d'espèces de parasites trouvées dans les populations autochtones est deux fois plus important que celui des populations exotiques (Torchin et al., 2003). Ce « relâchement de parasites » peut être un avantage compétitif pour l'hôte introduit dans une nouvelle aire. En effet, les



interactions avec des parasites régulent parfois certaines espèces dans leur environnement d'origine. Libérées du parasitisme dans le nouveau milieu, les espèces envahissantes peuvent alors plus facilement être plus efficace dans la compétition pour les ressources et ainsi favoriser leur établissement et leur dispersion durables (Dunn & Hatcher, 2015).

La survie d'un parasite dépend de la capacité de son hôte à tolérer l'infection ou à survivre assez longtemps pour transmettre le parasite. Au même titre qu'une espèce introduite et l'environnement d'accueil, l'évolution des hôtes et des parasites est profondément liée (Buckingham & Ashby, 2022). Les hôtes s'adaptent perpétuellement pour éviter ou tolérer les infections et les parasites cherchent à échapper ou à surmonter les défenses de l'hôte. Cette sélection d'adaptations et de contre-adaptations crée une boucle répétée de rétroaction coévolutive (Buckingham & Ashby, 2022). La coévolution entre hôtes et pathogènes repose donc sur un équilibre précaire où chaque espèce tente de prendre l'avantage sans que l'un des deux ne soit éliminé. La dynamique complexe entre les parasites et leurs hôtes est illustrée par la théorie de la Reine Rouge décrite par Leigh Van Valen en 1973 (Solé, 2022; Van Valen, 1973). Elle est issue d'une analogie dans le roman de Lewis Carroll « *Alice à travers le miroir* », dans lequel la Reine Rouge explique qu'il faut courir aussi vite que possible simplement pour rester à la même place. Appliquée aux interactions hôtes-parasites, cette théorie suggère que les espèces hôtes et parasites, doivent constamment évoluer pour survivre face aux pressions évolutives exercées par les autres espèces. La compréhension des processus de coévolution est cruciale dans l'étude des relations hôte-parasite et de leurs conséquences sur les écosystèmes (Buckingham & Ashby, 2022). Ainsi, les relations entre parasites et leurs hôtes envahissants sont dynamiques et variables en fonction des milieux et des espèces présentent, ce qui complique davantage la prédiction des impacts écologiques et économiques de l'invasion (Dunn & Hatcher, 2015).

Ainsi, les parasites et les espèces envahissantes ont un fort impact sur les écosystèmes, contribuant à la nouveauté écologique ou bien à l'extinction de populations. De manière plus générale, les parasites jouent un rôle clef dans le fonctionnement des écosystèmes et sont des composants importants de la diversité biologique. En effet, les parasites qui infectent des espèces hôtes dominantes dans un écosystème vont permettre de réguler cette population et ainsi réduire la pression de compétition sur les autres espèces. Dans ce cas-là, un parasite peut permettre d'améliorer la biodiversité (Dunn and Hatcher, 2015; Janzen, 1970). À l'inverse, dans le cadre d'une infection d'une espèce peu compétitrice, cette interaction peut aboutir à la réduction de la taille de la population voir à l'extinction et ainsi réduire la biodiversité (Hatcher et al., 2014). Au-delà des parasites et des espèces envahissantes très étudiées, comme les

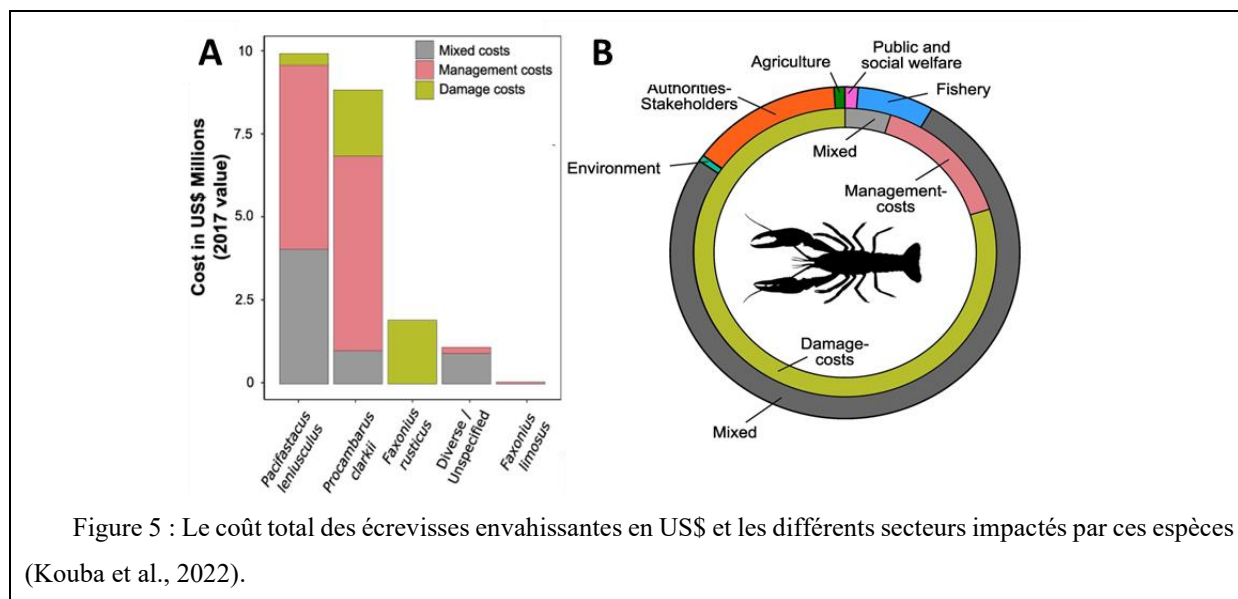


moustiques et les poissons d'eau douce, les crustacés posent également des problèmes écologiques et économiques majeurs, car ils représentent un groupe important ayant des impacts avérés sur les communautés locales dans de nombreux milieux aquatiques. Cette étude sera consacrée aux écrevisses exotiques envahissantes qui sont souvent à l'origine de la diminution drastique de la biodiversité dans les milieux où elles sont introduites.

II- Impact des écrevisses exotiques envahissantes en Europe

Les écrevisses envahissantes occupent une place particulière, car ce sont les invertébrés d'eau douce les plus grands possédant une espérance de vie assez longue de l'ordre d'une dizaine d'années (Souty-Grosset et al., 2006). Leurs caractéristiques intrinsèques (stratégie de reproduction *r*, agressivité, et régime omnivore) font que les écrevisses exercent une pression considérable sur de nombreuses espèces indigènes via leurs interactions de prédation et de compétition (Reynolds et al., 2013). Ces crustacés, introduits accidentellement ou volontairement, sont responsables d'impacts significatifs sur les écosystèmes d'eau douce, affectant à la fois la biodiversité locale et les activités humaines (Kouba et al., 2022). Ces écrevisses proviennent principalement d'Amérique du Nord, qui regroupe 70% des espèces d'écrevisses connues (Crandall and Buhay, 2008). Depuis les années 2000, les écrevisses exotiques envahissantes ont causé des pertes économiques estimées à 120,5 millions de dollars US d'après la base de données Invacost (Kouba et al., 2022). Les familles des Astacidae et des Cambaridae qui incluent les espèces *P. leniusculus*, *P. clarkii*, et *F. rusticus*, sont celles qui causent la majorité des pertes économiques (Figure 5) (Kouba et al., 2022). Toutefois, les coûts sont probablement fortement sous-estimés du fait que 96% des dépenses décrites proviennent du continent européen (Diagne et al., 2020; Kouba et al., 2022). Les écrevisses envahissantes sont pourtant retrouvées à l'échelle mondiale (Lodge et al., 2012). Par exemple, l'espèce *P. clarkii* originaire d'Amérique du Nord, est actuellement l'espèce d'écrevisse envahissante la plus répandue dans le monde. Présente en Indonésie, au Japon ou encore en Chine (Loureiro et al., 2015; Putra et al., 2018). Les dépenses liées aux écrevisses envahissantes sont principalement allouées à la réparation des dommages engendrés par ces espèces (79%) alors que peu de fonds sont consacrés à prévenir et contrôler les introductions (Figure 5). Ces dépenses sont assumées par les autorités locales pour la gestion et la réparation des dommages, mais aussi directement par le secteur de l'agriculture et l'aquaculture (Arce & Diéguez-Uribeondo, 2015; Jussila et al., 2021; Kouba et al., 2022).

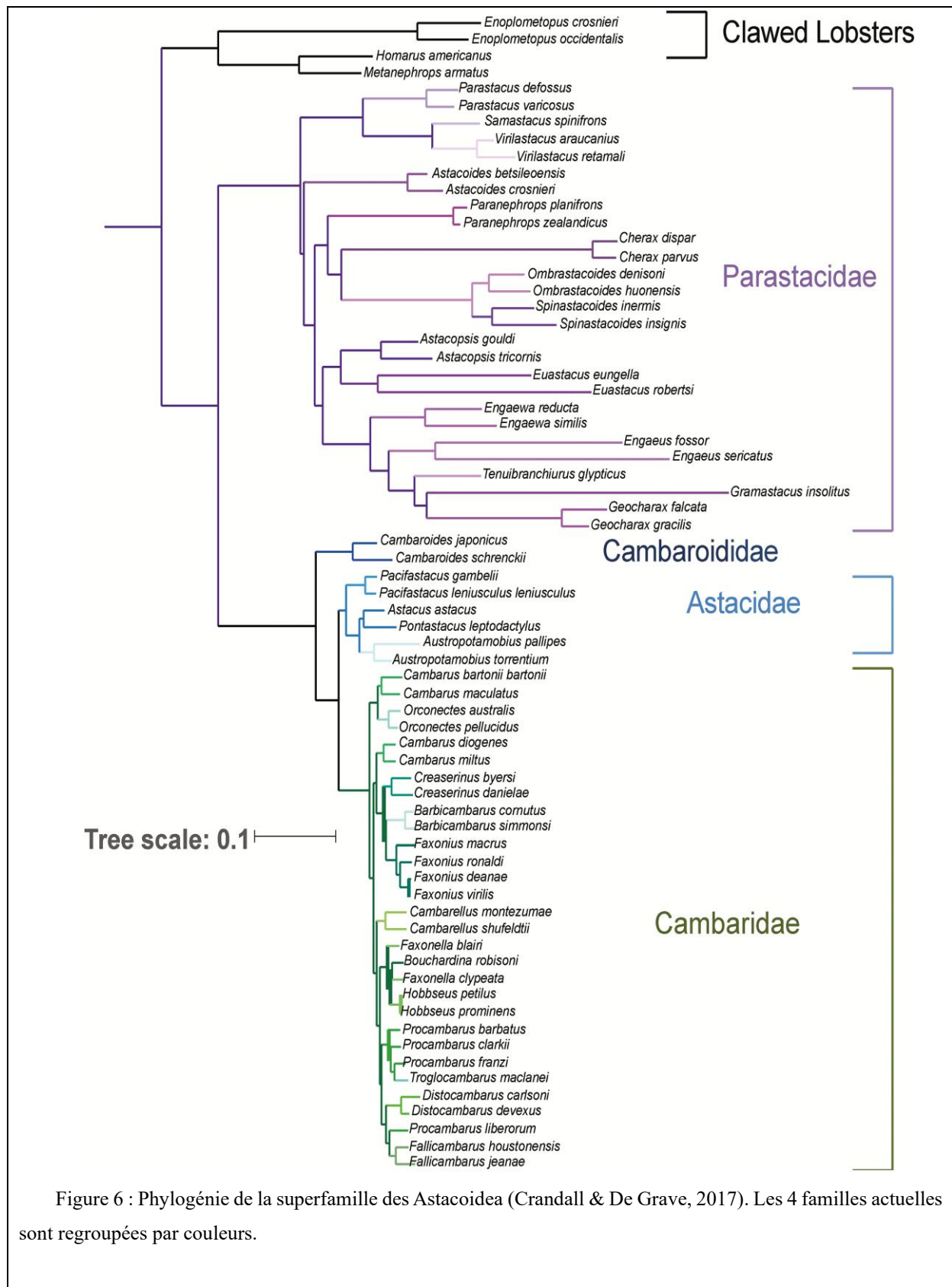




a) Généralités sur les écrevisses

Les écrevisses d'eau douce appartiennent à l'ordre des crustacés décapodes et à l'infra-ordre *Astacida*. Cet infra-ordre regroupe quatre superfamilles : les homards à pince, *Enoplometopioidea* et *Nephropoidea*, et les écrevisses d'eau douce *Astacoidea* et *Parastacoidea*. La divergence au sein de cet infra-ordre entre les groupes d'eau douce et d'eau de mer pourrait avoir eu lieu il y a 330 millions d'années. Chez les écrevisses, une première classification a été réalisée par Hobbs, (1989) ; cependant, cette revue était limitée aux espèces américaines. Depuis, les méthodes de génétiques modernes ont révélé une origine monophylétique des écrevisses appartenant à la superfamille des *Astacoidea* (Crandall et al., 2000). Elle est divisée en 3 familles, les *Astacidae* retrouvées principalement en Europe, les *Cambaridae* majoritairement présentes en Amérique du Nord et les *Parastacidae* originaire de l'hémisphère Sud. En 2017, Crandall et De Grave proposent une révision majeure de la classification taxonomique des écrevisses d'eau douce, basée sur les études systématiques et taxonomiques précédentes. Ainsi, elle regroupe 5 familles, dont 38 genres : *Astacidae* (4 genres), *Cambaridae* (14 genres), *Parastacidae* (18 genres), *Cambaroididae* (1 genre) et *Cricoidoscelosidae* (1 genre, éteint) (Figure 6) (Crandall & De Grave, 2017). La diversité génétique des écrevisses se traduit également par une variabilité phénotypique importante en termes de couleur et de taille, mais aussi d'exigence écologique, ce qui fait de ce groupe un clade ubiquitaire que l'on retrouve sur l'ensemble des réseaux hydrographiques, excepté au niveau des pôles.



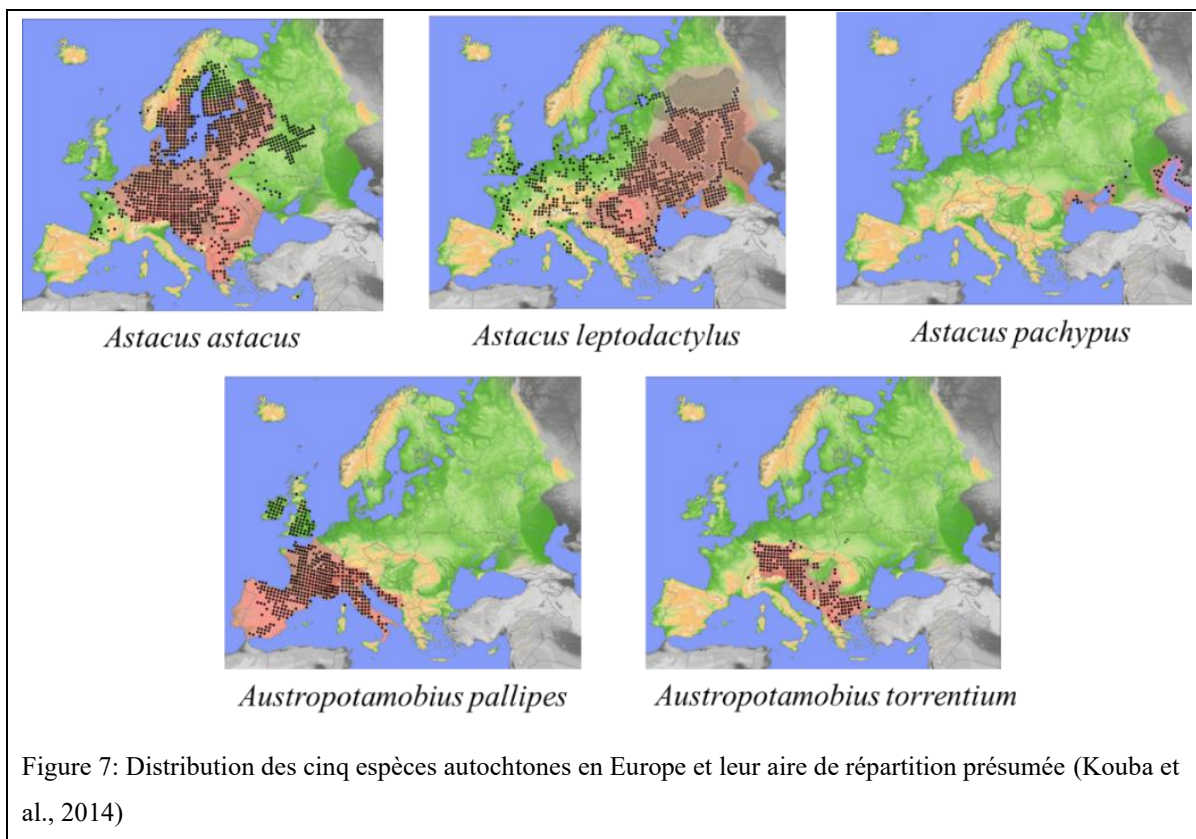


b) Impact des écrevisses envahissantes sur la chaîne trophique

Les écrevisses sont des espèces clefs de voûte pour leur environnement en raison de leur rôle central dans la structuration des communautés. Leurs activités de prédation influencent la composition des communautés de macro-invertébrés, d'algues et de macrophytes (Lodge et al., 1994). Elles consomment et réduisent l'abondance d'une grande variété d'organismes, comme des larves d'insectes, des invertébrés benthiques comme des mollusques, mais aussi certains végétaux, qui sont souvent essentiels à d'autres organismes, comme des poissons et des amphibiens (Nyström et al., 1999). Les écrevisses envahissantes transforment des zones dominées par les macrophytes généralement associés à de l'eau claire en des environnements turbides dominés par le phytoplancton (Matsuzaki et al., 2009). Une expérience en bassin d'expérimentation a permis de démontrer que *P. clarkii* déracinait et consommait certaines espèces de macrophytes (*Myriophyllum spicatum*, *Chara* sp), mais n'avait pas de conséquence sur l'espèce *Elodea nuttallii* (Chucholl, 2013). Cette expérience *in situ* a permis de démontrer que les écrevisses envahissantes, par leur comportement, pouvaient directement impacter l'abondance de chaque espèce et la richesse spécifique du milieu. De plus, leur consommation de feuilles en décomposition réduit pour d'autres taxons la disponibilité de cette ressource (Jackson et al., 2014). Ainsi, elles modulent la dynamique des populations de l'environnement dans lequel elles évoluent, entraînant parfois une diminution drastique de la biodiversité (Holdich & Pöckl, 2007). Les écrevisses envahissantes sont également parfois responsables de la baisse de la biodiversité en poisson d'eau douce et amphibien. Elles exercent par exemple une pression directe en attaquant les sites de ponte et en consommant les œufs (Souty-Grosset et al., 2016). En Finlande, une analyse du régime alimentaire de *P. leniusculus* a révélé que les œufs de salmonidés (*Coregonus albula* et *C. lavaretus*) constituaient environ 6 % de leur alimentation (Karjalainen et al., 2015). De plus, les communautés d'invertébrés benthiques, comme les amphipodes, les diptères, les éphéméroptères et les mollusques, sont en général négativement affectées par la présence des écrevisses envahissantes (Twardochleb et al., 2013). Selon une étude menée par Lodge et al, (1994), *F. rusticus* a réduit significativement l'abondance des populations d'invertébrés benthiques dans les lacs nord-américains, jusqu'à 70 % dans certaines zones envahies. Ercoli et al, (2015), ont mis en évidence une réduction de 50% de la densité en macro-invertébrés entre une zone sans écrevisse et une zone où *P. leniusculus* était présent. La dynamique et l'agressivité des écrevisses envahissantes leur permet d'être très compétitives pour les abris et la nourriture par rapport aux espèces préexistantes, et particulièrement les espèces d'écrevisses natives (Holdich et al., 2009).



c) Impact sur les écrevisses autochtones



Cinq espèces d'écrevisse autochtone sont recensées en Europe, *Astacus astacus*, l'écrevisse à pattes rouges, *Astacus leptodactylus*, l'écrevisse à pattes grêles, *Astacus pachypus*, l'écrevisse de la mer Caspienne, *Austropotamobius torrentium*, l'écrevisse des torrents, *Austropotamobius pallipes*, l'écrevisse à pattes blanches (Figure 7). L'introduction d'espèces d'écrevisses exotiques envahissantes est l'un des nombreux facteurs qui a entraîné le déclin des populations d'écrevisses autochtones (Holdich et al., 2009; Kouba et al., 2014 ; Jussila et al., 2021). Certaines de ces espèces sont aujourd'hui sur la Liste rouge nationale de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (U.I.C.N), classées vulnérables (*A. astacus* et *A. torrentium*) et en danger d'extinction (*A. pallipes*). À l'origine, les espèces envahissantes ont d'abord été introduites en Europe pour des raisons économiques, notamment en aquaculture pour ses caractéristiques intrinsèques facilitant l'élevage (croissance rapide et tolérance environnementale) (Souty-Grosset et al., 2016 ; Grandjean et al., 2017). Cependant, ces introductions ont échappé au contrôle, entraînant la dispersion des écrevisses dans le milieu naturel et concurrençant les espèces autochtones. À l'heure actuelle, *P. leniusculus* est l'écrevisse la plus répandue en Europe et est présente dans plus de 28 pays (Tableau 2). Ce phénomène d'introduction s'est récemment amplifié avec le développement de l'aquariophilie



et des échanges mondiaux. En effet, le commerce d'animaux d'ornement et le trafic d'animaux sauvages jouent un rôle majeur dans la dispersion des EEEs (Chucholl, 2013; Mrugała et al., 2014). Depuis 1980, une augmentation considérable du nombre d'espèces introduites est recensée en Europe. L'aire de répartition de ces espèces semble encore relativement restreinte, cependant, elles représentent une menace grandissante pour le futur (Filipová et al., 2011; Grandjean et al., 2021; Laffitte et al., 2023; Mojžišová et al., 2024; Mrugała et al., 2014).

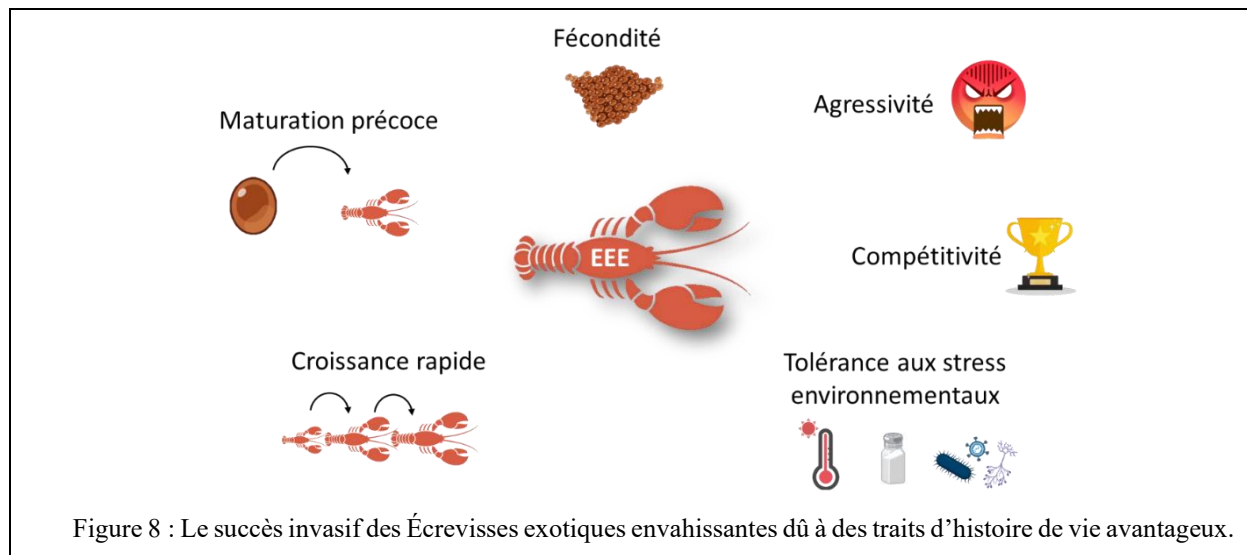
Tableau 2 : Les espèces exotiques envahissantes en Europe, distribution et source de l'introduction (adapté de Jussila et al., 2021). Les pays dans lequel sont introduits les EEEs sont représentés avec deux lettres selon le code www.iban.com/country-codes. La source d'introduction est indiquée par les lettres suivantes : AQ, aquaculture ; CA, Commerce d'Animaux ; SS, Stock sauvage.

Espèces	Source	Distribution en Europe
<i>Faxonius limosus</i>	SS	AT, BG, BY BE, HR, CZ, GB, FR, DE, HU, IT, VL, LT, NL, PL, RO, RS, RU, SI, SK, ES, CH
<i>Faxonius immunis</i>	AQ, SS	DE, FR
<i>Faxonius juvenilis</i>	AQ	FR
<i>Faxonius virilis</i>	-	FR, GB, ME, NL
<i>Faxonius rusticus</i>	-	FR
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	AQ, SS	AT, BA, BE, HR, CY, CZ, DK, GB, EE, FI, FR, DE, GR, HU, IT, LV, LT, LU, MT, NL, NO, PL, PT, SK, SI, ES, SE, CH
<i>Procambarus clarkii</i>	AQ, CA, SS	AT, BE, CY, GB, FR, DE, HU, IT, MT, NL, PL, PT, ES, CH
<i>Procambarus virginalis</i>	CA	AT, BE, CZ, DE, EE, FR, HR, HU, IT, MT, NL, SE, SK, RO, UA
<i>Cherax destructor</i>	AQ, CA, SS	ES, FR, IT
<i>Cherax quadricarinatus</i>	AQ, CA	ES, FR, GB, GR, HU, SI, MT

Les espèces exotiques, telles que *Pacifastacus leniusculus*, l'écrevisse signal, *Procambarus clarkii*, l'écrevisse rouge de Louisiane et *Faxonius limosus*, l'écrevisse américaine, sont responsables d'une réduction significative de la diversité des écrevisses autochtones, notamment *A. pallipes*. À titre d'exemple, une baisse de 60% des populations d'écrevisses a été recensée en 15 ans dans l'ancienne région Poitou-Charentes (Bramard et al., 2006). En France, l'écrevisse signal est considérée comme celle ayant l'impact le plus négatif sur l'écrevisse à

pattes blanches, car elles partagent le même habitat en tête de bassin versant (Grandjean et al., 2017). En cas de cooccurrence avec une espèce envahissante, cela aboutit en général au remplacement progressif de la population native. Au-delà de la dissipation de population d'écrevisses autochtones, les écrevisses introduites provoquent la fragmentation des populations restantes en amont des hydrosystèmes (Collas et al., 2015). À terme, l'isolation des populations pourra aboutir à une perte de diversité génétique qui compromettra le devenir des espèces restantes.

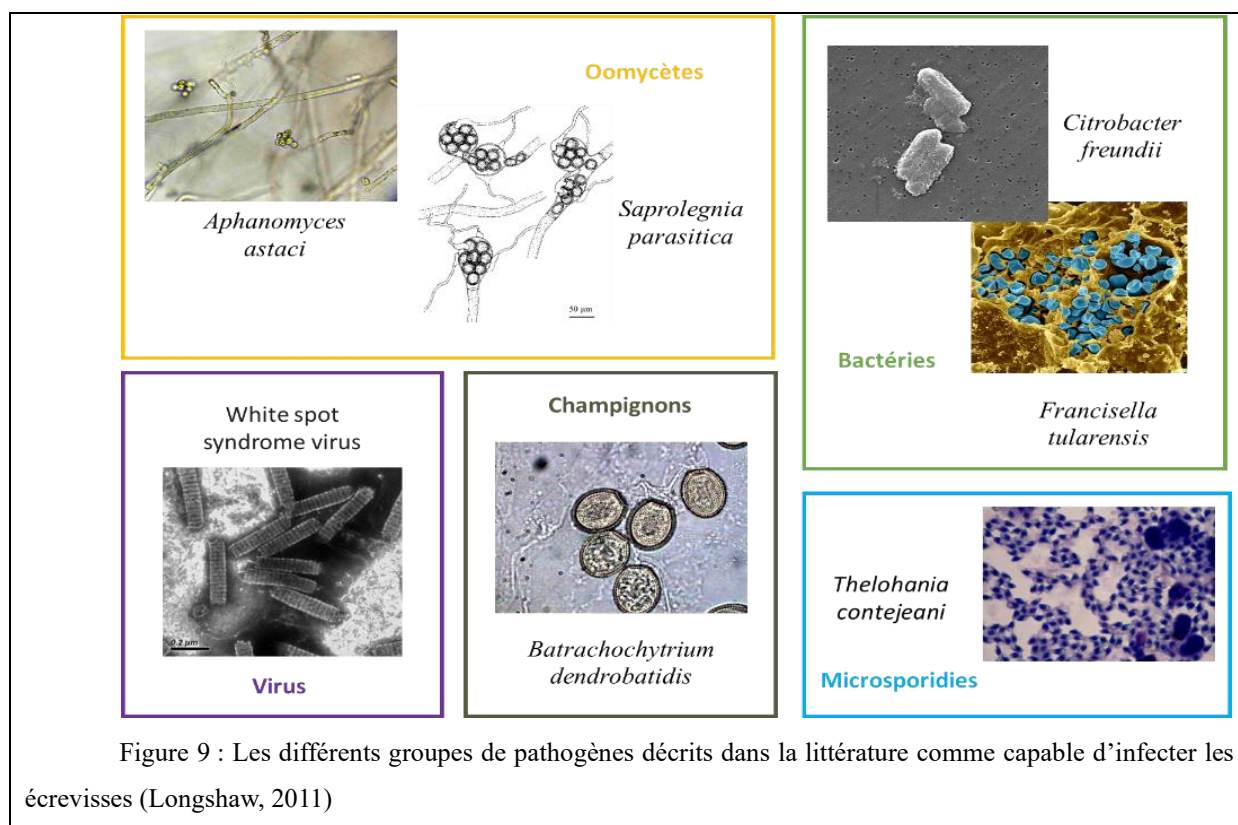
Ainsi, les écrevisses autochtones sont aujourd'hui menacées, car les espèces envahissantes perturbent leurs habitats et sont en concurrence directe pour les ressources disponibles (Grandjean et al., 2017; Holdich et al., 2009; Kouba et al., 2014; Martín-Torrijos et al., 2019; Souty-Grosset et al., 2016). Les espèces introduites sont en général plus agressives que les espèces natives, ce qui leur confère un avantage pour les abris et la nourriture perturbant la chaîne trophique et l'écosystème (Pintor et al., 2008; Souty-Grosset et al., 2016). La taille des pinces et du corps de chaque individu peut être un facteur décisif dans les interactions interspécifiques (Bovbjerg, 1956). La plasticité de leur cycle de vie est également un avantage des écrevisses envahissantes par rapport aux espèces autochtones. Ces dernières présentent un pic d'activité durant la nuit, et plus précisément à l'aube et à l'aurore (Souty-Grosset et al., 2006). La journée, ces espèces sont peu actives, hormis en cas de manque de nourriture et d'environnement défavorable. À l'inverse, les écrevisses envahissantes comme *F. limosus* et *P. leniusculus* sont plus actives durant la nuit, mais présentent également une activité en journée, ce qui leur permet d'adapter la période de recherche de nourriture en fonction des ressources disponibles dans l'environnement (Musil et al., 2010). Leur activité nocturne favorise la prédation envers les écrevisses autochtones. De plus, les écrevisses envahissantes possèdent une meilleure fitness (fécondité plus élevée et maturation des œufs plus rapide), et une résistance accrue aux stress abiotiques (salinité et température) et biotiques (pathogènes) (Dörr et al., 2020; Souty-Grosset et al., 2016) (Figure 8).



d) Vecteur de maladie

Les écrevisses envahissantes jouent un rôle crucial en tant que vecteurs de divers pathogènes, qui peuvent être de différentes natures, bactéries, virus et parasites eucaryotes, comme les champignons et les oomycètes (Figure 9) (Longshaw, 2011). Lors de leur translocation et dissémination, ces espèces envahissantes transportent parfois des pathogènes, ce qui contribuant à leur impact écologique néfaste. Par exemple, *P. clarkii* pourrait être un réservoir de *Batrachochytrium dendrobatidis*, un champignon responsable de la chytridiomycose, une maladie dévastatrice chez les amphibiens (Oficialdegui et al., 2019). Outre les maladies affectant les amphibiens, les écrevisses envahissantes hébergent également de nombreux parasites, comme ceux appartenant au genre *Thelohania*, des microsporidies qui infectent les muscles et les organes internes des écrevisses, provoquant la maladie de la "porcelaine" (Dunn et al., 2009; Longshaw, 2011). Cette maladie peut être transmise par les écrevisses envahissantes aux écrevisses autochtones. Cette capacité à transporter une diversité de pathogènes rend les écrevisses envahissantes particulièrement dangereuses, non seulement pour les écosystèmes aquatiques, mais aussi pour la santé publique. Par exemple, *Citrobacter freundii*, une bactérie opportuniste récemment identifiée comme responsable d'infections et de mortalité chez les écrevisses (Liu et al., 2020). En plus d'infecter les diverses espèces comme *P. clarkii*, cette bactérie peut également provoquer des méningites, et des endocardites chez les mammifères (homme et chevaux), mais aussi des intoxications alimentaires lorsque des produits contaminés sont consommés par des humains. (Pletz et al., 2018). D'autres études ont également démontré que *P. clarkii* peut être porteur de la bactérie *Francisella tularensis*, l'agent

responsable de la tularémie chez les humains, qui est transmise par contact direct ou consommation de crustacés contaminés (Anda et al., 2001). Pour finir, *Aphanomyces astaci*, l'agent causal de « la peste des écrevisses » est le pathogène des écrevisses le plus étudié (Soderhall all and Cerenius, 1999; Dieguez-Uribeondo, 2006). Il a été introduit en Europe depuis plus de 150 ans, par les espèces nord-américaines et est responsable de nombreux épisodes de mortalité de masse dans les populations d'écrevisses autochtones en Europe (Caprioli et al., 2018; Collas et al., 2016; Laffitte et al., 2023; Mirimin et al., 2022; Mojžišová et al., 2020).



III- *Aphanomyces astaci*, un pathogène envahissant responsable de la peste de l'écrevisse

Aphanonmyces astaci, l'oomycète responsable de la maladie de la peste de l'écrevisse, est un parasite classé parmi la liste des 100 espèces les plus envahissantes du monde (Simberloff & Rejmanek, 2019). C'est un pathogène endémique du continent nord-américain qui a été transloqué à travers le monde par son espèce hôte. À l'inverse des espèces américaines qui ont coévolué avec ce pathogène, les populations d'écrevisses européennes sont moins tolérantes à *A. astaci*. Ainsi, il a causé des ravages au sein des populations d'écrevisses autochtones européennes.



a) Classification des oomycètes et du genre *Aphanomyces*

Aphanomyces astaci, appartient aux oomycètes classés dans le phylum des *Stramenopiles*, regroupant l'ensemble des eucaryotes filamenteux qui ont colonisé les écosystèmes terrestre et aquatique (Beakes et al 2012). Historiquement, ce groupe a été classé dans le règne des *Fungi* du fait de ses similitudes morphologiques, physiologiques et écologiques. Cependant, le groupe présente des caractéristiques biochimiques et cytologiques plus proches des *Chromistan* (eucaryotes unicellulaires). Par exemple, les oomycètes possèdent des proportions élevées de cellulose et B 1-3 glucane alors que les champignons ont une paroi cellulaire principalement composée de Chitine (Rezinciuc *et al.*, 2015). Au sein des oomycètes, le genre monophylétique *Aphanomyces* peut être divisé en trois lignées distinctes qui, pour la plupart, sont des parasites : les pathogènes de plante, d'animaux aquatiques et les espèces saprophytes ou opportunistes (Figure 10) (Becking *et al.*, 2022). De nombreuses espèces d'intérêts agricole et aquacole sont susceptibles à divers taxons du genre *Aphanomyces*. Par exemple, *Aphanomyces euteiches* et *Aphanomyces cochlioides* sont responsables de la maladie de la pourriture des racines chez deux cultures majeures, le pois et la betterave (Gaulin et al 2007). De plus, le genre *Aphanomyces* impacte également certains animaux ; par exemple *Aphanomyces invadans* cause le syndrome ulcéreux épizootique chez plus de 160 espèces de poissons d'eau douce et d'estuaire, alors que *Aphanomyces frigidophilus* cause des ravages chez les œufs de salmonidés (Ballesteros et al., 2007, Herbert et al., 2019). Pour finir, *Aphanomyces astaci*, est source de dommages écologiques et économiques au sein des populations d'écrevisses à travers le monde (Soderhall all and Cerenius, 1999; Dieguez-Uribeondo, 2006).

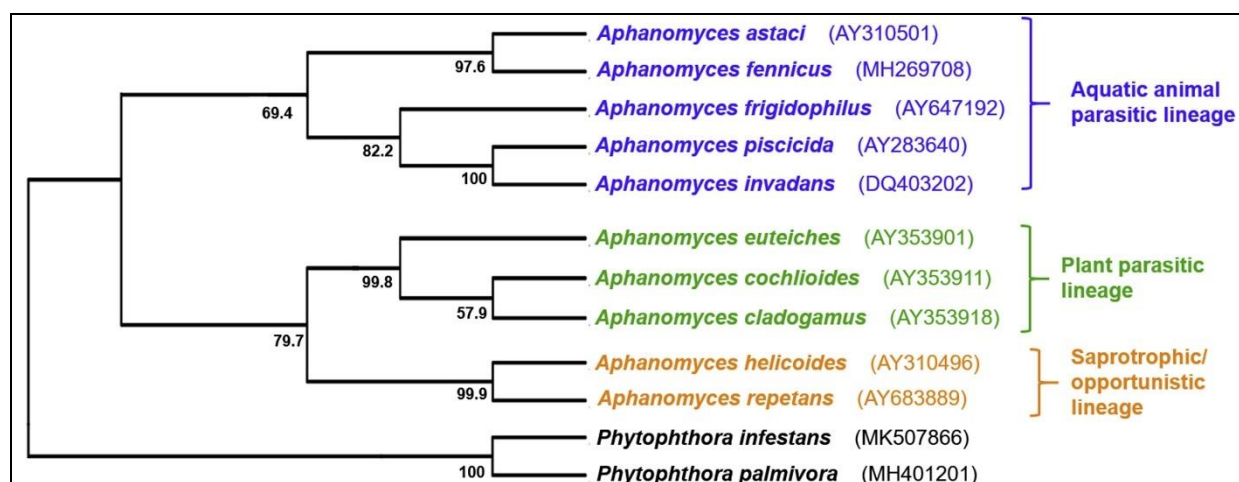


Figure 10 : Cladogramme du genre *Aphanomyces* basé sur l'ARN ribosomique 5.8S représentant les trois lignées en fonction de leurs interactions (Becking *et al.*, 2021).



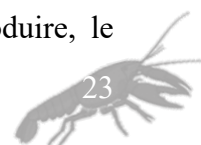
b) Historique de l'introduction de *Aphanomyces astaci* en Europe

L'estimation de la première introduction de *A. astaci* sur le continent européen a été basée sur le recensement d'épidémies au sein des populations d'écrevisses autochtones, à la suite de translocations d'espèces nord-américaines connues aujourd'hui pour être des espèces porteuses saines. C'est en 1859 dans la région de Lombardie (Italie) dans le bassin du fleuve Pô, que la première épidémie de peste connue à ce jour semble avoir eu lieu (Alderman 1996). Cependant, cette période coïncide également avec l'utilisation de sulfate de cuivre pour lutter contre les pathogènes en viticulture, et laisse ainsi un doute quant à l'introduction de *A. astaci* en Europe. En 1974, un foyer de peste apparaît pour la première fois dans le plateau de Langres en France, situé entre trois grands fleuves, la Meuse, la Seine et le Rhin. Cet emplacement a alors favorisé la dispersion de ce parasite sur le territoire. Depuis lors, le pathogène s'est répandu à travers l'Europe, entraînant des épisodes de mortalité conséquents sur un grand nombre de populations d'écrevisses en Turquie (Baran et Soylu 1989), en Irlande (Matthews et Reynolds 1992), en Angleterre (Alderman 1993), en Norvège (Taugbøl et al. 1993), en Suède (Huang et al., 1994), en Autriche (Alderman 1996), en Espagne (Diéguez-Uribeondo et al. 1997), en Finlande (Vennerström et al. 1998), en Allemagne (Oidtmann et al. 1999) et en République tchèque (Kozubíková et al. 2008).

c) Cycle de vie du pathogène

Le cycle de vie des oomycètes est complexe, avec une alternance entre reproduction sexuée et asexuée, en fonction des conditions environnementales. La reproduction sexuée favorise la diversité génétique, ce qui permet aux oomycètes de s'adapter et de persister dans l'environnement dans des conditions stressantes. En revanche, la reproduction asexuée favorise la dissémination et la propagation rapide, lorsque les ressources sont épuisées (Rezinciuc et al., 2015). Chez *A. astaci*, aucune reproduction sexuée n'a été reportée à ce jour en Europe (Diéguez-Uribeondo et al., 2009). En effet, les oomycètes sont des espèces hétéroalléliques qui nécessitent deux patterns compatibles pour produire des spores. C'est pourquoi l'une des hypothèses serait qu'un seul pattern ait été introduit en Europe. Jusqu'à preuve du contraire les diverses études épidémiologiques soutiennent ce fait, car les isolats semblent se reproduire par reproduction clonale.

Aphanomyces astaci se développe sous forme d'hyphe au sein de la cuticule d'écrevisses infectées (Figure 11). Chez les espèces nord-américaines chroniquement infectées, les zones mélanisées contiennent souvent l'agent pathogène (Figure 11A). Afin de se reproduire, le



pathogène forme d'abord un sporange composé d'un ensemble de zoospores biflagellées. Des zoospores (pz) sont libérées et s'enkystent à l'extrémité de l'hyphe (h) pour former un amas de kystes (s) (Figure 11B). Ces kystes libèrent ensuite des zoospores secondaires, l'unité infectieuse (Figure 11C). Ces spores infectieuses dirigent leurs mouvements par chimiotaxie afin de localiser l'hôte (Figure 11). Suite à la rencontre de la cuticule d'un nouvel individu, le cyste germinal se développe en hyphe qui croît le long de la cuticule de l'écrevisse. De plus, les espèces parasites du genre *Aphanomyces* sont capables d'effectuer des cycles d'enkystement et d'émergence de nouvelles zoospores, appelés RZE, qui leur permet de persister dans l'environnement (Cerenius et Söderhäll 1984, Diéguez-Uribeondo et al. 2009). Au contraire, les espèces saprotrophes germent immédiatement après l'enkystement, suggérant que la RZE est une adaptation au mode de vie parasitaire. Chez *A. astaci*, trois cycles de RZE ont été observés dans des conditions in vitro (Martínez-Ríos et al., 2023).

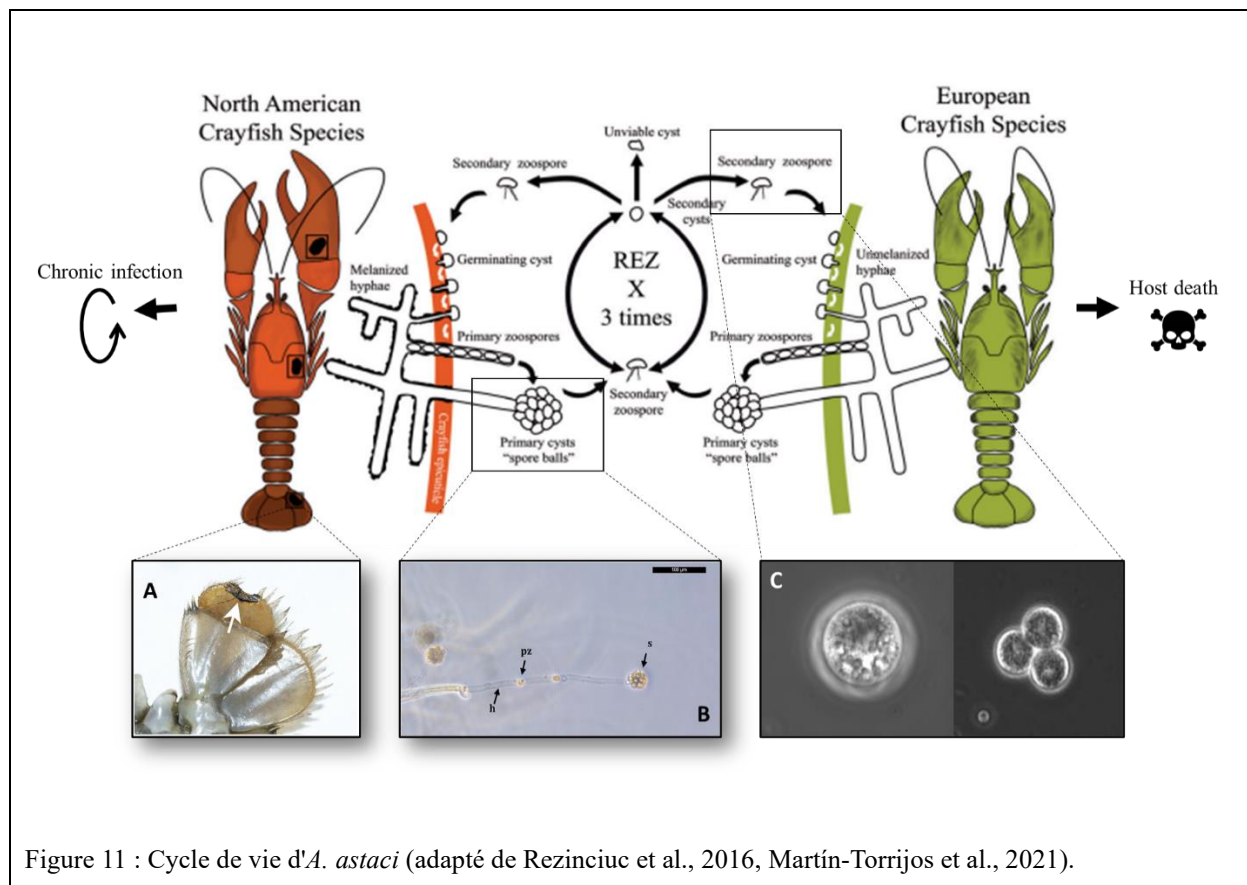


Figure 11 : Cycle de vie d'*A. astaci* (adapté de Rezinciuc et al., 2016, Martín-Torrijos et al., 2021).

d) Susceptibilité et tolérance des espèces hôtes

L'ensemble des espèces d'écrevisses nord-américaines testées, ont présenté des susceptibilités à *A. astaci* plus faible. Du fait de la coévolution entre l'hôte et le pathogène, elles ont développé des mécanismes de résistances permettant de restreindre sa croissance dans la cuticule. Cette adaptation semble être apparue à deux reprises au sein du genre *Pacifastacus* et de la famille des *Cambaridae*. Ainsi, les espèces américaines sont parfois des espèces porteuses saines de la maladie et agissent comme des vecteurs. À la différence des espèces nord-américaines, les espèces australiennes, asiatiques et européennes se sont révélées plus susceptibles à l'infection par la peste de l'écrevisse. Leur réponse immunitaire est moins efficace, ce qui entraîne leur mort peu de temps après une infection (Tableau 3). Cependant, les espèces nord-américaines peuvent succomber à une infection de *A. astaci*. Par exemple, l'écrevisse signal, peut mourir de la maladie lorsque son système immunitaire est affaibli, lors des mues, d'une infection par un autre parasite ou bien dans des conditions environnementales défavorables (Cerenius et al., 2003; Svoboda et al., 2017). Dans des conditions de laboratoire, les espèces autochtones ont également présenté des variations de la susceptibilité. Par exemple, *A. astacus* est capable de survivre lors d'une faible exposition à certaines souches (Makkonen et al., 2012; Makkonen et al., 2014). De plus, des infections latentes au sein des populations naturelles de *A. leptodactylus* ont été mises en évidence en Turquie et en Roumanie (Kokko et al., 2012; Svoboda et al., 2012, 2017). Des infections latentes ont également été recensées en Finlande dans des populations de *A. astacus* et de *A. pallipes* en Italy (Jussila et al., 2017 ; Svoboda et al., 2017).

Tableau 3 : Susceptibilité et tolérance des espèces à la peste de l'écrevisse (Svoboda et al., 2017). Cette table résume le nom de chaque espèce, son origine et la susceptibilité au pathogène *A. astaci*. L'ensemble des espèces provenant d'Amérique du Nord sont tolérantes à la peste de l'écrevisse alors que celles provenant d'Asie, d'Australie et d'Europe sont sensibles.

Espèce	Région d'origine	Susceptibilité à <i>A. astaci</i>
<i>Cambarus acuminatus</i> Faxon	Amérique du Nord	Faible
<i>Cambarus bartoni</i> (fabricius)	Amérique du Nord	Faible
<i>Cambarus latimanus</i> (Le Conte)	Amérique du Nord	Faible
<i>Cambarus longulus</i> Girard	Amérique du Nord	Faible
<i>Faxonella clypeata</i> (Hay)	Amérique du Nord	Faible
<i>Faxonius erichsonianus</i>	Amérique du Nord	Faible
<i>Faxonius limosus</i>	Amérique du Nord	Faible
<i>Faxonius propinquus</i> Girard	Amérique du Nord	Faible
<i>Faxonius virilis</i> (Hagen)	Amérique du Nord	Faible
<i>Pacifastacus leniusculus</i> (Dana)	Amérique du Nord	Faible
<i>Procambarus clarkii</i> Girard	Amérique du Nord	Faible
<i>Procambarus hayi</i> (Faxon)	Amérique du Nord	Faible
<i>Astacopsis fluviatilis</i> Riek	Tasmanie	Forte
<i>Astacopsis gouldi</i> Clark	Tasmanie	Forte
<i>Astacus astacus</i> (L.)	Europe	Forte
<i>Astacus leptodactylus</i> Eschscholtz	Europe, Asie	Forte
<i>Austropotamobius pallipes</i> (Lereboullet)	Europe	Forte
<i>Austropotamobius torrentium</i> (Schränk)	Europe	Forte
<i>Cambaroides japonicus</i> De Haan	Japon	Forte
<i>Cherax destructor</i> Clark	Australie	Forte
<i>Cherax papuanus</i> Holthuis	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Forte
<i>Cherax quadricarinatus</i> (von Martens)	Australie	Forte
<i>Cherax quadricarinatus</i> (Gray)	Australie	Forte
<i>Euastacus clydensis</i> Riek	Australie	Forte
<i>Euastacus crassus</i> Riek	Australie	Forte
<i>Euastacus kershawi</i> Smith	Australie	Forte
<i>Geocharax gracilis</i> Clark	Australie	Forte



e) Transmission dans l'environnement

- Transmission horizontale du pathogène

Les spores de *A. astaci* sont les stades infectieux du cycle de l'oomycète et sont transmises horizontalement entre les différents hôtes par le biais de l'eau douce. La peste des écrevisses est principalement propagée par les hôtes naturels, que ce soient des écrevisses autochtones infectées ou des écrevisses nord-américaines présentant une infection chronique. De plus, les individus morts, ou des parties de leur corps, peuvent rester une source d'infection pendant au moins 5 jours à 21 °C, et probablement plus lors de températures plus basses (Oidtmann et al., 2002). Aucune transmission verticale de la mère aux œufs n'a été démontrée chez cette espèce jusqu'à présent. Cependant, les juvéniles restent accrochés à l'abdomen de leur mère jusqu'à la première mue, ce qui peut favoriser la transmission de la peste (Reynolds et al., 2002).

Outre les écrevisses, *A. astaci* est également capable d'infecter d'autres taxons. Par exemple, *Eriocheir sinensis*, un crabe chinois, est un hôte non symptomatique de ce pathogène (Schrimpf, 2014; Svoboda et al., 2014; Tilmans et al., 2014). Cela laisse supposer que *A. astaci* pourrait infecter plus généralement les décapodes d'eau douce. De plus, il est probable que les crabes aient été infectés à cause des populations d'écrevisses avec lesquelles ils coexistent. Il a également été démontré que *E. sinensis* pouvait être vecteur de la peste de l'écrevisse. Schrimpf et al, (2014), ont démontré que *A. astaci* pouvait être transmis des *E. sinensis* infectés aux écrevisses sensibles par détection moléculaire. Plusieurs autres invertébrés d'eau douce ont été exposés à *A. astaci*, cependant, aucune croissance apparente de mycélium n'a été observée.

- Dispersion dans l'environnement par des agents externes

La dispersion physique du pathogène par d'autres espèces animales de l'environnement est jusqu'à présent peu décrite. Les oiseaux et les mammifères pourraient transporter des spores par le biais de leurs poils ou plumes, cependant, cette méthode de dispersion est encore peu étudiée. En tant que prédateur des écrevisses, certaines espèces peuvent également participer à la translocation d'individus infectés (Oidtmann et al., 2002). En revanche, les activités humaines, telles que la pêche, jouent un rôle majeur dans la dispersion des spores. Les objets ayant été en contact avec de l'eau provenant d'un lieu où des hôtes sont infectés par *A. astaci* (équipements de pêche, balances, vêtements ...) peuvent être un moyen de transmission. Le matériel devraient être nettoyés et désinfectés entre chaque zone de pêche pour éviter les transferts involontaires de souches (Jussila et al., 2011). De plus la translocation et le trafic d'animaux d'ornements sont l'une des causes majeures de la dissémination du pathogène en France et en Europe.



- Le succès infectieux et la persistance dans l'environnement

Le succès de l'infection par *A. astaci* dépend du nombre de spores auxquelles l'hôte est exposé (Unestam & Weiss, 1970; Diéguez-Uribeondo et al., 1995; Makkonen et al., 2014), de la virulence de la souche, et de la susceptibilité de la population d'écrevisses concernée. Dans l'environnement, lors d'une épidémie de peste, les concentrations de spores peuvent être de plusieurs centaines par litre. Cependant, dans les localités abritant des écrevisses nord-américaines, le nombre de spores peut être très variable, de 0 à 100 spores par litre (Strand et al. 2014). La durée de vie des spores d'*A. astaci* dépend des conditions environnementales (température, pH...). Après deux mois à 2 °C, il a été démontré qu'une suspension de spores d'*A. astaci* contenait encore des spores viables (Unestam, 1966). De plus, *A. astaci* est relativement sensible à la sécheresse, aux variations de température et à la salinité (Alderman & Polglase, 1986). Contrairement à d'autres oomycètes, *A. astaci* ne semble pas produire d'oospores, une forme de persistance aux différents stress abiotique. De plus, *A. astaci* est une espèce regroupant des souches génétiquement, physiologiquement et écologiquement variées qui sont en général adaptées aux conditions de vie de leurs hôtes respectifs (Diéguez-Uribeondo et al., 1995).



Objectifs de la thèse :

Cette thèse a pour objectif d'apporter des clefs dans la compréhension concernant la transmission du pathogène *Aphanomyces astaci* au sein des populations envahissantes. À différentes échelles populationnelles, individuelles et génétiques. Cette thèse s'articulera autour des 4 thématiques suivantes :

- (1) Réactualiser l'aire de distribution des populations d'écrevisses nord-américaines en France.
- (2) Évaluer le rôle d'espèces envahissantes en tant que réservoir de *A. astaci*.
- (3) Caractériser la variabilité génétique de *A. astaci* et les transferts de souches entre individus afin de retracer l'introduction et la propagation des isolats en Europe.
- (4) Développer des marqueurs moléculaires pour étudier les mécanismes immunitaires des écrevisses en réponse à un pathogène

Le premier chapitre s'intéresse aux nouvelles introductions d'espèces d'écrevisses envahissantes et aux dangers qu'elles représentent pour les espèces autochtones en France. Malgré les mesures mises en place, de plus en plus d'espèces et en particulier des écrevisses sont introduites dans les cours d'eau. Nous avons décrit pour la première fois en France à Inières en Aveyron (07), la présence de l'écrevisse à taches rouges, *Faxonius rusticus*. Cette espèce est classée parmi les plus invasives au monde. Dans les sites étudiés, cette espèce coexiste avec une autre espèce invasive, *Pacifastacus leniusculus*.

Le deuxième chapitre a pour objectif d'évaluer le risque que représentent les espèces envahissantes « historiques » et *A. astaci* pour l'écrevisse autochtone à pattes blanches. Actuellement, les réservoirs de ce pathogène sont principalement les populations d'écrevisses nord-américaines envahissantes, comme l'écrevisse de Louisiane, *Procambarus clarkii*, et l'écrevisse signal, *Pacifastacus leniusculus*. *P. clarkii* est porteuse du génotype D qui a été incriminé dans la majorité des épidémies de peste dans un pays frontalier, l'Espagne. À mesure que *P. clarkii* continue de se disperser, le risque de transmission de la peste pour les écrevisses autochtone augmente. Afin d'évaluer la menace que représente cette espèce, cette étude recense pour la première fois les prévalences de *A. astaci* dans les populations de *P. clarkii* en France et répertorie les épisodes de mortalités décrites depuis 2014. D'autre part, nous avons cherché à comprendre comment évoluent les prévalences dans le temps du pathogène dans les populations de *P. leniusculus* décrites dans deux études précédentes.

Le troisième chapitre s'intéresse à deux cas de transmission interspécifiques de souches de *A. astaci* entre espèces envahissantes. Le premier traitera de cas de transmission



interspécifiques dans la rivière du Danube à Budapest. Le second cas s'intéressera au cas de Inière et à la transmission probable de souches entre *P. leniusculus* et *F. rusticus*. Ces cas de transmission sont facilités par des environnements favorables (eaux thermales) et la cooccurrence d'espèces porteuses du pathogène. Ces conditions sont également favorables à la détection d'individus multi-infectés par plusieurs souches de pathogènes.

Le quatrième chapitre traite de la variabilité génétique de *A. astaci*. La caractérisation des différentes souches et génotypes d'*A. astaci* permet de mieux comprendre les dynamiques des épidémies et mettre en place des mesures de gestion efficaces. Les microsatellites sont un outil de choix pour étudier la diversité génétique d'*Aphanomyces astaci* du fait de leurs sensibilité et variabilité. Pour certains groupes génétiques, comme le groupe B, aucune variabilité intragroupe n'a encore été décrite et qui permettrait d'améliorer les connaissances sur les transferts de souche en Europe. C'est pourquoi de nouveaux microsatellites ont été développés afin de détecter de la variabilité intragroupe.

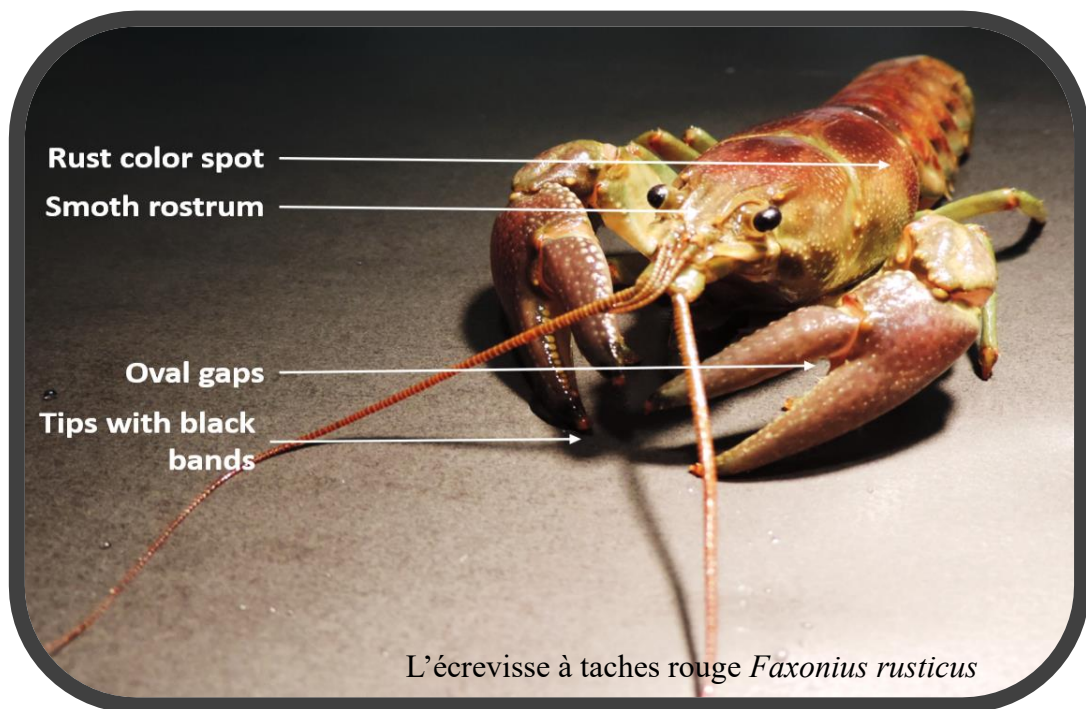
Pour finir, le cinquième chapitre est une étude intégrée, des mécanismes immunitaires individuels de *A. astacus* afin de développer des marqueurs de la réponse immunitaire. Dans les écosystèmes aquatiques, les écrevisses autochtones font face à de nombreux pathogènes, comme *A. astaci*. Certaines populations d'écrevisses autochtones présentent une résistance partielle aux épisodes de peste qui suggèrent un phénomène d'adaptation de l'hôte au pathogène. Il est donc essentiel d'identifier les mécanismes immunitaires et les gènes responsables de l'acquisition de cette résistance. Ainsi, afin de caractériser la réponse immunitaire de l'écrevisse d'élevage *A. astacus* divers marqueurs ont été développés, cellulaires, génétiques et enzymatiques. Ces résultats permettront de mieux comprendre la susceptibilité et les réponses de *A. astacus* suite à l'infection. L'intégration de ces résultats dans les stratégies de conservation et de gestion est cruciale pour assurer la pérennité des écrevisses autochtones dans un environnement où les pressions des invasions biologiques et des pathogènes exotiques augmentent constamment.

Pour finir, une discussion générale qui reprendra l'ensemble des thématiques abordées permettra de mettre en lien l'ensemble de ces chapitres.



Chapitre 1 :

Faxonius rusticus, l'écrevisse à taches rouges, une nouvelle menace au sein des écosystèmes d'eaux douces en France



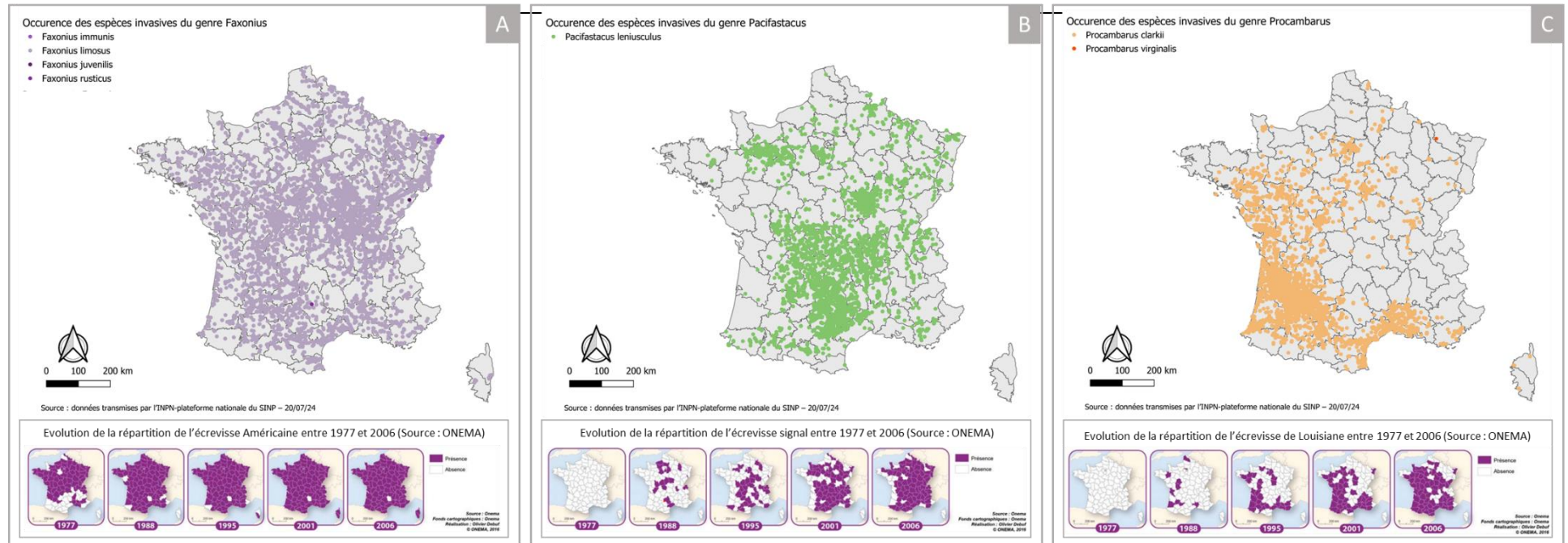
Contexte :

En Europe, les espèces envahissantes ont d'abord été introduites à des fins économiques, notamment en aquaculture, en raison de caractéristiques intrinsèques facilitant l'élevage (croissance rapide et peu exigeante vis-à-vis de la qualité de l'eau) (Grandjean et al., 2017; Souty-Grosset et al., 2016). Selon la législation française en vigueur jusqu'en 1983, il était possible de transporter et d'introduire ces espèces dans le milieu naturel. Ce n'est qu'à partir de cette date, que les espèces d'écrevisse exotique ont été considérées comme susceptibles d'occasionner des déséquilibres biologiques avec interdiction de les transporter vivantes et, par conséquent, de les vendre dans les commerces spécialisés en France (ce qui n'est pas le cas dans les autres pays européens). Malgré la législation française, de nouvelles espèces sont régulièrement découvertes, notamment avec le développement de l'aquariophilie et des échanges mondiaux (Souty-Grosset et al., Kouba et al., 2014, Ion et al. 2024). En effet, le commerce d'animaux d'ornement et le trafic d'animaux sauvages jouent un rôle majeur dans la dispersion récente des EEEs (Chucholl, 2013; Mrugała et al., 2014). Les écrevisses appartiennent à un clade très diversifié présentant une vaste palette de couleurs (blanches, rouges, bleues, orange) et de taille (quelques mm à des dizaines de cm), ce qui les rend particulièrement attrayantes pour les aquariophiles. Par exemple, l'écrevisse *Faxonius immunis* présente des spécimens pouvant-être bleus, rare dans les populations natives. Cette couleur est par contre prédominante dans les populations introduites en Europe, notamment en France (Grandjean com. pers.). Historiquement, les trois premières espèces introduites l'ont été pour l'élevage et la consommation, l'écrevisse américaine *Faxonius limosus* (introduite en 1890 – Pologne, date de première observation en France 1911), l'écrevisse signal *P. leniusculus* (Suède en 1959, France en 1974) et l'écrevisse rouge de Louisiane *P. clarkii* (Espagne en 1973, France en 1980) (Figure 12) (Kouba et al., 2014). Elles sont à présent largement distribuées en France (Collas et al. 2015, Ion et al 2024). Ces introductions se sont récemment amplifiées ces dernières années en raison de l'aquariophilie, puisque cinq nouvelles espèces ont été recensées en France: parmi elles, trois sont d'origine américaine l'Écrevisse juvénile *Faxonius juvenilis* (Collas et al., 2015), l'Écrevisse calicot *Faxonius immunis* (Collas et al., 2015) et l'Écrevisse marbrée *Procambarus virginalis* (Grandjean et al., 2021) (Figure 12). Les deux autres espèces sont d'origine australienne et appartiennent toutes deux au genre *Cherax*, : l'écrevisse de Murray (Vigneron, 2019), *Cherax destructor* et l'écrevisse bleue, *Cherax quadricarinatus* (Baudry et al., 2020, 2021). Les écrevisses exotiques, telles que les espèces du genre *Cherax* et



Procambarus, sont particulièrement préoccupantes, en raison de leur adaptabilité, de leur capacité à proliférer, et de leurs impacts écologiques négatifs sur la biodiversité et les habitats (Souty-Grosset et al., 2016 ; Baudry et al., 2020). Toutes ces espèces représentent donc de nouvelles menaces pour les écosystèmes et leurs associées (voir introduction). Ce chapitre fait état de l'introduction d'une nouvelle espèce d'écrevisse envahissante l'écrevisse à taches rouges *Faxonius rusticus*, dans le cours d'eau d'Inières dans l'Aveyron (07) et jugée fortement préoccupante au sein des écosystèmes aquatiques.

Figure 12: Évolution de la dispersion des écrevisses exotiques envahissantes en France de 1977 à aujourd'hui. Cette carte a été réalisée grâce aux données de l'INPN du 20/07/24 et aux rapports de l'inventaire national des écrevisses réalisées par l'ONEMA (Collas et al., 2015).



A new invader in freshwater ecosystems in France: the rusty crayfish *Faxonius rusticus* (Girard, 1852)

Maud Laffitte, Thomas Baudry, Martine Guilmet, Thierry Andrieu, Nicolas Poulet, Théo Duperray, Delaunay Carine, Marc Collas, Bouziane Moumen, Marion Sudres and Frédéric Grandjean,
Article publié dans *BioInvasions records*

Contexte :

- *Faxonius rusticus*, l'écrevisse à taches rouges, est originaire de l'Ouest américain
- *F. rusticus* a montré une capacité rapide à coloniser de nouveaux habitats, ce qui représente une menace sérieuse pour les écosystèmes d'eau douce.
- Cette espèce est classée parmi les écrevisses les plus invasives au monde
- Première observation de *Faxonius rusticus* en France et en Europe.

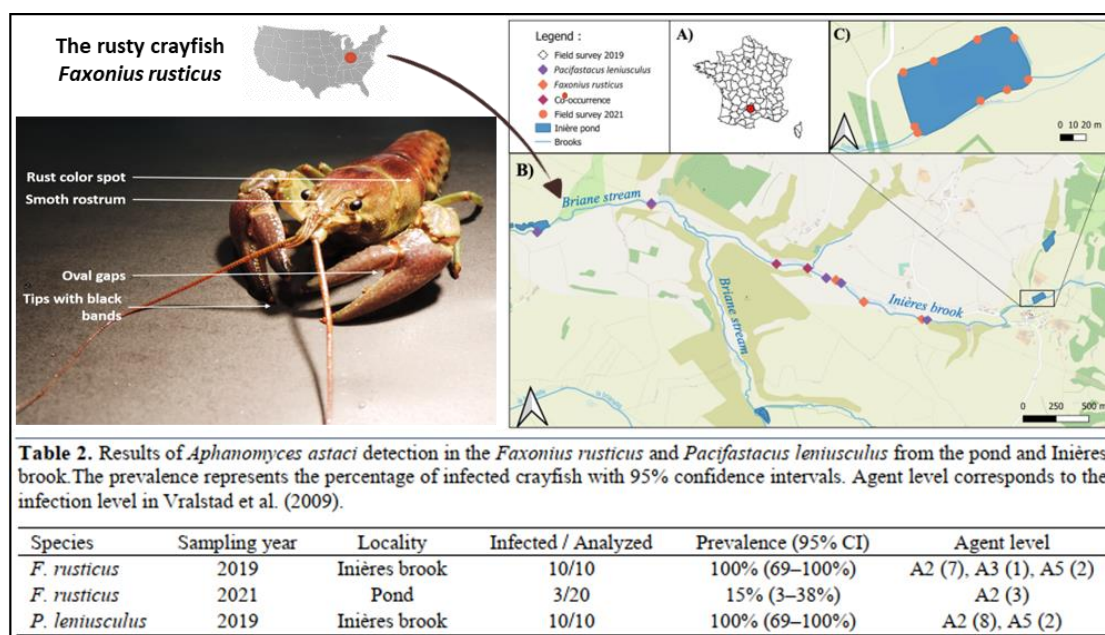
Résultats :

- Forte densité d'individus de *F. rusticus* dans l'étang le long du ruisseau d'Inières, où toutes les classes de taille sont représentées, adultes et juvéniles.
- *F. rusticus* coexiste avec une autre espèce invasive, *Pacifastacus leniusculus* (écrevisse signal), dans les sites étudiés.
- Porteuses de la maladie « peste des écrevisses », avec certains individus présentant des niveaux élevés d'infection A5 selon l'échelle de Vralstad et al. (2009)

Conclusion :

- L'invasion par *F. rusticus* pourrait avoir des conséquences négatives importantes sur la biodiversité locale, notamment en supplantant les espèces d'écrevisses autochtones
- Mettre en place une stratégie de gestion afin de contrôler la propagation de *F. rusticus*

Résumé graphique :



Rapid Communication

A new invader in freshwater ecosystems in France: the rusty crayfish *Faxonius rusticus* (Girard, 1852)

Maud Laffitte¹, Thomas Baudry¹, Martine Guilmet², Thierry Andrieu³, Nicolas Poulet⁴, Théo Duperray⁵, Delaunay Carine¹, Marc Collas⁶, Bouziane Moumen¹, Marion Sudres⁷ and Frédéric Grandjean^{1,*}

¹Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions – EBI CNRS, 4 rue Fort, 86000, Poitiers, France

²Fédération de l'Aveyron de pêche et de protection du milieu aquatique, chemin des Attizals, moulin de la Gascarie, 12000 Rodez, France

³Office Français de la Biodiversité, 9, rue de Bruxelles-Bourran, 12000 Rodez, France

⁴Office Français de la Biodiversité, 2 Allée du Pr Camille Soula, 31400 Toulouse, France

⁵Saules & Eaux, Lapra, 07 310 - Intres, France

⁶Office Français de la Biodiversité, Service départemental des Vosges, 22-26 Avenue Dutac - 88026 Epinal cedex, France

⁷SMBV2A (Syndicat Mixte du Bassin Versant Aveyron Amont), 16 rue de la Muraille, 12390 Rignac, France

*Corresponding author

E-mail: Frederic.grandjean@univ-poitiers.fr

Citation: Laffitte M, Baudry T, Guilmet M, Andrieu T, Poulet N, Duperray T, Carine D, Collas M, Moumen B, Grandjean F (2023) A new invader in freshwater ecosystems in France: the rusty crayfish *Faxonius rusticus* (Girard, 1852). *BioInvasions Records* 12(2): 457–468, <https://doi.org/10.3391/bir.2023.12.2.10>

Received: 23 June 2022

Accepted: 17 February 2023

Published: 21 April 2023

Handling editor: Laura Garzoli

Thematic editor: Karolina Bącela-Spychalska

Copyright: © Laffitte et al.

This is an open access article distributed under terms of the Creative Commons Attribution License (Attribution 4.0 International - CC BY 4.0).

OPEN ACCESS

Abstract

Crayfish are of major ecological importance within freshwater ecosystems, due to their central position in the trophic niche, acting as regulators of food webs. However, the introduction of exotic crayfish species threatens native species. Indeed, these introduced crayfish often outcompete local species and can even disseminate pathogens (i.e. exotic American species with the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906), leading to rapid population losses. We report here the first record of rusty crayfish *Faxonius rusticus* in the wild in France and in Europe so far. The situation is alarming because *F. rusticus* is native to North America, potentially carrier of *A. astaci*, and classified among the most invasive species of crayfish in the world, due to its impressive dispersal capacities. This study reports high densities of individuals from a pond along the Inières Brook, where all size classes are represented, both adults and juveniles. A total of thirty-seven specimens were also observed over 2.5 km of the Inières brook as well as the Briane (main stream) in 2019 where this species co-occurs with another invasive crayfish species, the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. In these sites, all specimens of both species were positive for crayfish plague presence with some individuals showing high level of infection (A5) (on an A0 to A7 scale), rarely observed in specimen of other invasive crayfish species. Since these first observations, the situation seems to have worsened, with 847 individuals captured, in the pond along the Inières brook, during survey sessions in 2021.

Key words: invasive crayfish, crayfish plague, co-occurrence, *Pacifastacus leniusculus*

Introduction

The situation of native crayfish in France has become alarming in recent decades due to various factors, among them habitat destruction and degradation of water quality but also increasing of introductions of non-native crayfish species in recent times (Kouba et al. 2014; Mrugała et al. 2017; Baudry et al. 2020; Grandjean et al. 2021).



Until recently, six North American species and one Australian species have been reported from the wild in France. Three American species were introduced several decades ago to reinvigorate the aquaculture and are now considered as “Old Non-Indigenous Crayfish Species”: the spiny-cheek crayfish *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817), the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) and the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). They are widespread in France, having colonized all the hydrographic basins (Kouba et al. 2014; Préau et al. 2019). In spite of the French law prohibits the sale of live crayfish in pet trades and in the absence of crayfish aquaculture, an increase of introductions has been noted in the last decade with additional four alien crayfish species established (Chucholl 2013): the Kentucky River crayfish *Faxonius juvenilis* (Hagen, 1870) with one population in the east of France (Souty-Grosset et al. 2006), the Calico crayfish *Faxonius immunis* (Hagen, 1870) present in three affluents of the Rhine catchment (Collas 2020) and more recently, the parthenogenetic marbled crayfish *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) in a pond network in Moselle department located in North-east of France (Grandjean et al. 2021) and the Australian yabby *Cherax destructor* (Clark, 1936) in a catchment in Brittany (Collas 2020). These six American crayfish species are non-symptomatic carriers of *A. astaci*, causing melanized spots, eroded carapace or lost limbs to its native hosts, sometimes leading to death, depending on physiological conditions and different molt cycle of the considered specimen (Aydin et al. 2014). But the damage is greater on non-American crayfish species, for example in Europe and Japan, where this oomycete was responsible for numerous local extinctions of native crayfish populations (Filipová et al. 2013; Grandjean et al. 2014; Collas et al. 2016; Mrugała et al. 2017).

In this paper, we report the first record of the invasive rusty crayfish *Faxonius rusticus* (Girard, 1852) in France and in Europe. The species was discovered accidentally by a fisherman in 2019 in a pond in Aveyron department in Southern part of France. The circumstances of its presence in this location remain unknown, but undoubtedly result from an intentional human release as with most crayfish introductions in Europe. Yet, European law prohibits the sale and live transport of all exotic crayfish since 1983 (Regulation EU 1143/2014). This species is native to southwestern Ohio, northern Kentucky, southeastern Indiana and northern Tennessee in the Ohio River watershed (Perry et al. 2001). This species has been translocated by humans and now it is present throughout the northeastern United States up to southern regions of Canada (Reid and Nocera 2015). It is considered as one of the most invasive crayfish because of its aggressive behavior and ability to out-compete and displace native crayfish, when introduced outside its native range (Taylor and Redmer 1996; Olden et al. 2006). Thus, its presence in Europe is a real threat for local biodiversity



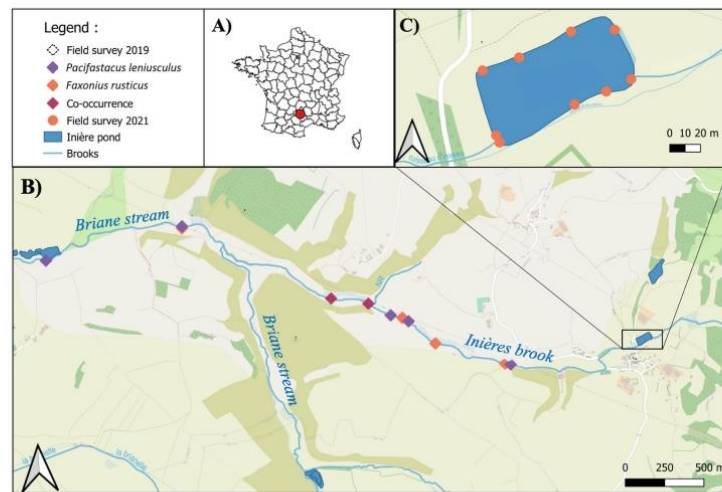


Figure 1. Location of the pond corresponding to the first occurrence of *Faxonius rusticus* along the Inières brook and the Briane (main stream) in Aveyron (France) (A). Diamonds represents the occurrence of *F. rusticus* (orange), *P. leniusculus* (purple) and both of them (red) (B). The orange circles in the pond correspond to the location of the 9 baited traps used for the survey in 2021 (C).

(Bobeldyk and Lamberti 2008), particularly towards white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* (Linnaeus, 1758) which shares similar habitat in the head of water systems (Souty-Grosset et al. 2006).

Materials and methods

Ethical statements

All experimental procedures and animal manipulations, as well as field sampling, were performed according to French legislation. The sampling material was provided by the French Office for Biodiversity (OFB) and the Federation of Aveyron for fishing and protection of the of the aquatic environment. All captured specimens were euthanized in accordance with the French law on invasive species (law n° 2016–1087 of August 8, 2016).

Field surveys

The field survey carried out after fisherman brought live crayfish for taxonomic identification to the Federation of Aveyron for fishing and protection of the aquatic environment in 2019. The study area was composed of a private pond supplied from an adjacent brook (Inières), and another stream (Briane), joining Inières 2 km further downstream from the pond, located in the department of Aveyron in south of France (Figure 1, Table 1).

Several adapted methodological approaches (baited traps, electrofishing, night light session) were used. Trapping was done using FIAP 1683 plastic traps (FIAP GmbH, Ursensollen, Deutschland) (61 cm length × 31 cm width × 25 cm height, with a mesh of 1 cm × 2 cm and a double cone-shaped



Table 1. Number of crayfish trapped and observed in the successive surveys during the period September–October 2019 and April–August 2021 by the different methods used in this survey.

Site	Sampling methods	Date	<i>F. rusticus</i>		<i>P. leniusculus</i>
			Number	Size range (mm)	Number
Inières Pond	Baited traps	25/09/2019	37	54–93	–
Inières Brook	Fishing nets	02/10/2019	3	–	–
	Fishing nets	10/10/2019	6	53–92	–
	Fishing nets	10/10/2019	8	79–95	–
	Baited traps	06/10/2019	1	63	4
	Baited traps	09/10/2019	6	83–104	6
	Light	09/10/2019	12	–	23
	Electrofishing	17/10/2019	1	50	–
Briane	Baited traps	08/09/2019	–	–	–
	Baited traps	09/09/2019	–	–	7
	Light	10/10/2019	1	–	–
	Light	16/10/2019	–	–	55
Inières Pond	Baited traps	20/04/2021	14	59–97	–
	Baited traps	27/04/2021	15	69–98	–
	Baited traps	04/05/2021	10	54–95	–
	Baited traps	18/05/2021	42	60–101	–
	Baited traps	01/06/2021	61	60–100	–
	Baited traps	08/06/2021	57	55–96	–
	Baited traps	15/06/2021	117	50–106	–
	Baited traps	29/06/2021	71	64–103	–
	Baited traps	16/07/2021	84	64–109	–
	Baited traps	28/07/2021	71	62–101	–
	Baited traps	30/07/2021	89	65–103	–
	Baited traps	17/08/2021	87	41–100	–
	Baited traps	27/08/2021	92	46–101	–

inlet), baited with fish meat (fresh sardines). Traps were deposited overnight and during the day, for a total of 12 to 16 hours in the water.

Two field survey periods were conducted. The first occurred between September 2019 and October 2019, following the discovery of *F. rusticus* in the Inières pond, by prospecting the Inières and the Briane brooks, situated next to the invaded pond. Trapping was carried out as described above and completed using a search light to chase and detect crayfish, during two successive nights, to observe the invasion range of this species, along the two brooks (Figure 1). Electrofishing was also carried out in the Inières brook: this method is widely used to assess freshwater assemblages (crustaceans and fish) and consists of a power source producing alternating current with 300 volts, generating an electrical field when electrodes are placed in the water (Bryant et al. 2012).

Then, a second survey was conducted, between April and September 2021, after obtaining the owner's permission, aiming at realizing a robust population monitoring. For that, each sampling event consisted of setting out 9 baited traps in fixed positions all around the pond (Table 1, Figure 1), repeated 13 times during the trapping season (i.e. April to September, when the crayfish activity—reproduction and moulting—is higher because of higher water temperature). Visual observations by light were also performed alongside the two adjacent brooks (as in 2019), to investigate the invasion front of *F. rusticus*. All captured individuals were identified



(to the species level, as also other crayfish species can be caught), sexed, and measured (total body length) to the nearest mm.

Genetic identification of F. rusticus

One walking leg was collected from two individuals and stored in 90% ethanol, for further genetic analysis to confirm the taxonomic status of crayfish by COI barcoding. DNA was extracted from leg muscle tissue, using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit following manufacturer's instructions. A fragment of the mitochondrial gene for the cytochrome c oxidase subunit I (COI) was sequenced (Folmer et al. 1994). Both forward and reverse fragments were assembled and aligned using Geneious TM (<https://www.geneious.com>) and blasted in GenBank to confirm the identity of each specimen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Screening for Aphanomyces astaci infection

The presence of *A. astaci* pathogen was tested on 10 specimens of each species (*F. rusticus* and *P. leniusculus*), sampled in the brook and its tributary in 2019 and stored in absolute molecular-grade ethanol. Twenty additional *F. rusticus* specimens, sampled in August 2021 were also analyzed. Before the dissection, a visual checking of the presence of black melanized spots were noted. Tissue from one half of the soft abdominal cuticle, one uropod, and any melanized spots were collected in a 1.5 mL tube and stored at -20°C . Then, a DNA extraction was performed with a modified protocol of DNeasy tissue kit (Qiagen) (Filipová et al. 2013). Next, the presence of the pathogen *A. astaci*, ITS1 gene was tested by quantitative TaqMan MGB real-time PCR (Vrålstad et al. 2009), using a LightCycler 480 Instrument (Roche). Each run was composed of one pure sample and one 1/10 diluted sample, four standards and two negative controls. The infection rate was quantified with four standards of 3×10^4 , 3×10^3 , 3×10^2 , 3×10^1 , expressed as PCR forming units (PFU) (Vrålstad et al. 2009). The relative levels of infection were calculated and samples with agent levels A2 and higher were considered infected with *A. astaci* (Vrålstad et al. 2009). We estimated the prevalence of *A. astaci* in the two studied species and its 95% confidence interval, using the function “epi.conf” from the epiR library for the statistical package R v 4.0.5 (Filipová et al. 2013).

Results

Species identification

Two crayfish species were caught during the survey: *F. rusticus* and *P. leniusculus*. Both species were identified by morphological traits. *Faxonius rusticus* is characterized by black bands on the tips of its claws and an oval gap between the claw fingers when closed, a smooth, pinched and distinctly concave rostrum and rusty patches on each side of the shell (Figure 2)





Figure 2. *Faxonius rusticus* trapped in the Inières pond. This species shows dark “rusty” spots on either side of the carapace and claws generally smooth, with a dark band on the proximate end of the cheliped. Photo by Maud Laffitte.

(Wetzel et al. 2004). *Pacifastacus leniusculus* is characterized by the absence of spine on the cephalothorax, with a white or turquoise colored patch at the base of each claw and a red coloration on the underside of claws (Larson et al. 2012).

The presence of *F. rusticus* was confirmed by COI barcoding. Only one haplotype was obtained from COI sequencing from the 2 specimens analyzed. They were identical over a 660 base pair stretch with previously identified *F. rusticus* sequences (available on GenBank Accession number: MN902184) originating from the Lower Susquehanna watershed of south central Pennsylvania (Di Domenico et al. 2021).

Biometry and population description of F. rusticus

During the first survey session (2019), 37 individuals were captured in the Inières pond, using traps. This led to extending the search to the adjacent brooks, Inières brook and Briane brook. Thus, 12 individuals were observed by visual search in the Inières brook and 25 were captured (1 by electrofishing, 17 by fishing nets and seven by baited traps), where as only 1 individual was observed in the Briane brook.

Following the two survey periods (2019 and 2021), only *F. rusticus* was recorded in the Inières pond, with 847 individuals trapped (Table 1). The total length of *F. rusticus* caught ranged from 41 to 109 mm (Figure 3), with a size range between 50 and 109 mm for females and 41 and 106 for males, respectively. The overall female ratio (female/total individuals) of all captured crayfish, between April and September in 2021, was 0.36 but some variation occurred during the trapping season. No females were caught during the first month (April) of the campaign. However, there was a progressive increase in the number of females caught from May until August,



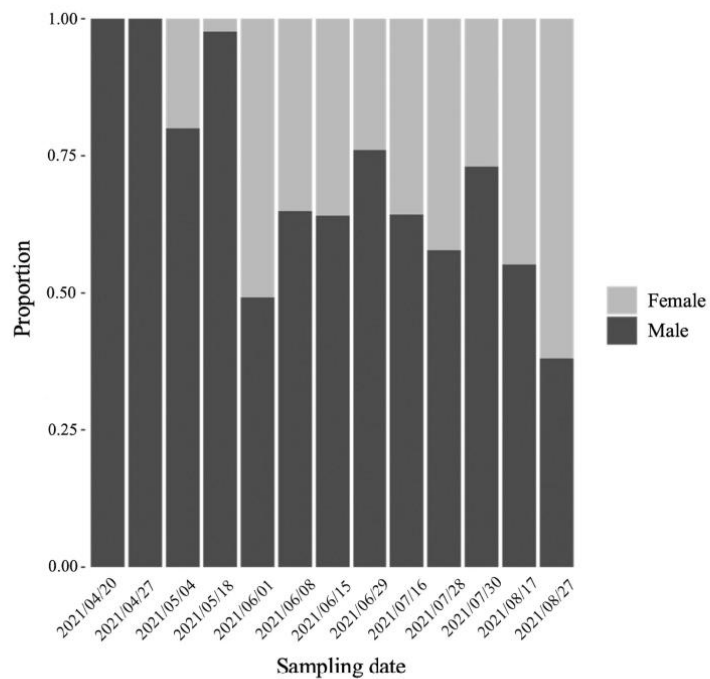


Figure 3. Number of crayfish trapped in the pond, by size class (total length in millimeters) and by sex (females in light grey and males in dark grey), following the two survey periods (2019 and 2021).

when the females became dominant (Figure 4). Furthermore, one female caught in May was egg-carrying.

The pond only hosts *F. rusticus*, whereas in both the Inières brook and the Briane (main stream), this species co-occurs with *P. leniusculus*. The colonization front of *F. rusticus* along the Inières was around 3 km downstream from the pond. One specimen has been observed in the Briane closed to the join with Inières. Additionally, *P. leniusculus* was found to be the most abundant species in the Inières and the Briane (Table 1).

Prevalence of A. astaci in the population

All individuals from both species were infected with level of infection ranging from A2 to A5. In total, 10 *F. rusticus* (seven from 2019 survey period and three from 2021) were A2 infected, one (from 2019) at A3 level and two (from 2019) at A5 level. Among the 10 *P. leniusculus* analyzed from the pond in 2019, eight were infected by *A. astaci* with level of infection A2 and two at A5 level (Table 2).

Discussion

This study reports the first detection of the invasive crayfish *F. rusticus* in France, and so far in Europe. The population density appears to be very high



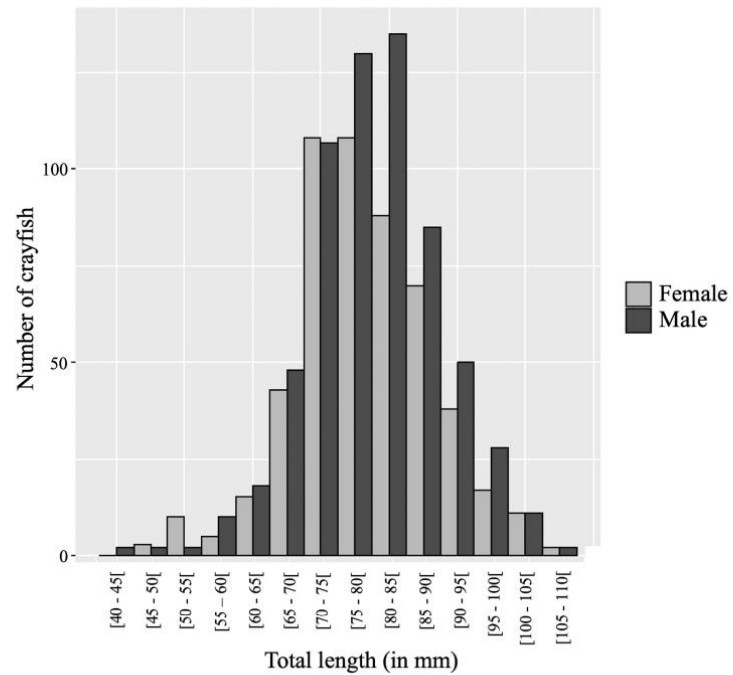


Figure 4. Sex-ratio of crayfish trapped (light grey bars for females and dark grey bars for males) for each sampling event carried out between April 2021 and August 2021.

Table 2. Results of *Aphanomyces astaci* detection in the *Faxonius rusticus* and *Pacifastacus leniusculus* from the pond and Inières brook. The prevalence represents the percentage of infected crayfish with 95% confidence intervals. Agent level corresponds to the infection level in Vralstad et al. (2009).

Species	Sampling year	Locality	Infected / Analyzed	Prevalence (95% CI)	Agent level
<i>F. rusticus</i>	2019	Inières brook	10/10	100% (69–100%)	A2 (7), A3 (1), A5 (2)
<i>F. rusticus</i>	2021	Pond	3/20	15% (3–38%)	A2 (3)
<i>P. leniusculus</i>	2019	Inières brook	10/10	100% (69–100%)	A2 (8), A5 (2)

in a private pond in the Aveyron French Department, with more than 800 individuals caught only in 2021. The situation is alarming because this species is known to be very invasive, with a high dispersal potential and some individuals were already observed in the adjacent brooks, three kilometers downstream of the pond. Evidence of reproduction was constated (all size classes represented and capture of an egg-carrier female) and survey session highlighted an increase of the capture probability of female, from May to August. This is certainly linked to the increase of crayfish activity during summer, as showed for signal crayfish (Dunn et al. 2017). Additionally, all the specimen captured were tested positive to the crayfish plague, with some individuals infected at a high level (A5), representing a dramatical risk for native crayfish.

As this is the first time that this species has been reported in Europe, no direct data on its invader potential in European freshwater networks exists, but some studies have described its high ability to outcompete crayfish



congeners (Hill and Lodge 1999; Olden et al. 2006). For example, this crayfish was introduced in the Great Lakes region in US more than a century ago and now it is the most widespread crayfish among the thirteen species occurring in all five Great Lakes (Peters et al. 2014). This ability to replace native congeners has been also reported from Wisconsin lakes (U.S.A.), where this species is replacing the native *F. virilis* (Hagen, 1870), and even *F. propinquus* (Girard, 1852), an invader that arrived there earlier. The distribution of *F. rusticus* outside its native area has expanded rapidly due to introductions by human activities, including ornamental trade and aquaculture. *Faxonius rusticus* is reported in 20 states within the US (Taylor and Redmer 1996) and also in Canada (Peters et al. 2014). Its invasion success is attributed to its high dispersal rate (Wilson et al. 2004; Jansen et al. 2009), broad habitat niche (Freeman and Byers 2006), and its aggressive behaviour (Hill and Lodge 1999).

The presence of *F. rusticus* in France is therefore alarming for the preservation of *A. pallipes*, considered by IUCN as vulnerable, for three main reasons. Firstly, this species seems to share similar habitat preferences as *A. pallipes* in the head waters, with clear well oxygenated waters and available shelters (Gunderson 2008; Trouilhé et al. 2007). Secondly, this species seems to be present in dense populations and to show particularly aggressive behavior that could enhance its invasion capacity (Olden et al. 2006; Reid and Nocera 2015). As a result of its aggressiveness and its competitiveness, *F. rusticus* might eventually outcompete the signal crayfish *P. leniusculus*, historically present in the In eres brooks and currently co-occurring with *A. pallipes* in some regions (Souty-Grosset et al. 2006). Thirdly, *F. rusticus* could then become the dominant crayfish species in certain catchments in France, effectively dispersing a high-contagious crayfish plague strain. Indeed, all tested specimens in 2019 and 2021 (including *P. leniusculus* individuals) were infected (100% of prevalence) and someone at a high infection level (A5). These results are alarming because the crayfish plague was already known to be one of the most virulent pathogen known for crayfish (Becking et al. 2022; Jussila et al. 2021) but never in previous studies reported a combination of such high levels of infection in such large proportion of individuals been infected topics (Vr lstad et al. 2011; Kozubíková et al. 2011; James et al. 2017). For example, recent studies reported a low total infection prevalence in some U.S.A populations of around 11%, but some individuals could have high levels of infection (A5), according to the scale of Vr lstad et al. (2009) (Panteleit et al. 2019) or, inversely, a high prevalence of infected crayfish (87%), but at a medium level (A3) (Strand et al. 2013). Filipova et al. (2013) have reported on the signal crayfish, a pathogen prevalence ranged from 0% to 80% among the 43 populations with only 2 individuals from 513 harbored an infection rate of A4 level. More recently, in the same species, Grandjean et al. (2017)



reported only 5 individuals on 1131 with A5 infection level. Our result indicates that *F. rusticus* is a high-risk crayfish plague vector if nothing is done for its eradication.

For all of the reasons (e.g. aggressivity, reproduction ability, *A. astaci* infection rate), this species seems to be worse than other invasive species such as *P. leniusculus* and *F. immunis* present in headwater system in France (Collas et al. 2016). Actions, such as pond draining and intensive trapping effort, are done to eradicate this population before its spread to major French catchments.

Acknowledgements

We would like to thank Julian Reynolds for proofreading an English version of the manuscript and the Syndicat mixte du bassin versant Aveyron amont (SMBV2A) for field assistance. We also thank the reviewers for their valuable comments which greatly improved the manuscript.

Funding declaration

This work was funded by the 2015–2020 State-Region Planning Contracts (CPER) and European Regional Development Fund (FEDER), and intramural funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Poitiers.

Author contributions

All authors contributed to the final proofreading of the manuscript. ML and FG wrote the first version of the manuscript, after performing the laboratory experiments (with CD). Fieldwork was done by MG, TA, NP, TD, MS and MC. The corrections of the manuscript were carried out by TB, ML and, and the conceptualization of the study as well as its supervision were ensured by FG and BM.

References

- Aydin H, Kokko H, Kortet R, Kukkonen H, Jussila J (2014) The signal crayfish is vulnerable to both the As and the Psl- isolates of the crayfish plague. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413: 03, <https://doi.org/10.1051/kmae/2014004>
- Baudry T, Becking T, Gout JP, Arqué A, Gan HM, Austin CM, Delaunay C, Smith-Ravin J, Roques JAC, Grandjean F (2020) Invasion and distribution of the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Martinique. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* 421: 50, <https://doi.org/10.1051/kmae/2020041>
- Becking T, Kiselev A, Rossi V, Street-Jones D, Grandjean F, Gaulin E (2022) Pathogenicity of animal and plant parasitic *Aphanomyces* spp and their economic impact on aquaculture and agriculture. *Fungal Biology Reviews* 40: 1–18, <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.08.001>
- Bobeldyk AM, Lamberti GA (2008) A decade after invasion: Evaluating the continuing effects of rusty crayfish on a Michigan river. *Journal of Great Lakes Research* 34: 265–275, [https://doi.org/10.3394/0380-1330\(2008\)34\[265:ADAIET\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3394/0380-1330(2008)34[265:ADAIET]2.0.CO;2)
- Bryant D, Crowther D, Papas P (2012) Improving survey methods and understanding the effects of fire on burrowing and spiny crayfish in the Bunyip and South Gippsland catchments: Black Saturday Victoria 2009 – Natural values fire recovery program. Victorian Government Department of Sustainability and Environment Melbourne, 34 pp, <https://doi.org/10.13140/2.1.4059.6166>
- Churchill C (2013) Invaders for sale: Trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biological Invasions* 15: 125–141. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0273-2>
- Collas M (2020) Ecrevisses exotiques en France: le rythme des introductions en milieu naturel s'accélère. *Courrier de la nature* 324: 24–31
- Collas M, Becking T, Delpy M, Pflieger M, Bohn P, Reynolds J, Grandjean F (2016) Monitoring of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) population during a crayfish plague outbreak followed by rescue. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 417: 1–8, <https://doi.org/10.1051/kmae/2015037>
- Di Domenico M, Curini V, Caprioli R, Giansante C, Mrugała A, Mojžišová M, Cammà C, Petrusek A (2021) Real-Time PCR Assays for Rapid Identification of Common



- Aphanomyces astaci* Genotypes. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9: 597585. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.597585>
- Dunn N, Priestley V, Herraiz A, Arnold R, Savolainen V (2017) Behavior and season affect crayfish detection and density inference using environmental DNA. *Ecology and Evolution* 7: 7777–7785, <https://doi.org/10.1002/ece3.3316>
- Filipová L, Petrusek A, Matasová K, Delaunay C, Grandjean F (2013) Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in populations of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: evaluating the threat to native crayfish. *PLoS ONE* 8: e70157, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070157>
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294–299
- Freeman AS, Byers JE (2006) Divergent induced responses to an invasive predator in marine mussel populations. *Science* 313: 831–833, <https://doi.org/10.1126/science.1125485>
- Grandjean F, Vrålstad T, Diéguez-Urbeondo J, Jelić M, Mangombi J, Delaunay C, Filipová L, Rezinciuc S, Kozubíková-Balcarová E, Guyonnet D, Viljamaa-Dirks S, Petrusek A (2014) Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Veterinary Microbiology* 170: 317–324, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.020>
- Grandjean F, Roques J, Delaunay C, Petrusek A, Becking T, Collas M (2017) Status of *Pacifastacus leniusculus* and its role in recent crayfish plague outbreaks in France: Improving distribution and crayfish plague infection patterns. *Aquatic Invasions* 12, 541–549. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.4.10>
- Grandjean F, Collas M, Uriarte M, Rousset M (2021) First record of a marbled crayfish *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) population in France. *BioInvasions Records*, <https://doi.org/10.3391/bir.2021.10.2.12>
- Hill AM, Lodge DM (1999) Replacement of resident crayfishes by an exotic crayfish: The roles of competition and predation. *Ecological Applications* 9(2): 678–690, [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1999\)009\[0678:RORCBA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1999)009[0678:RORCBA]2.0.CO;2)
- James J, Nutbeam-Tuffs S, Cable J, Mrugala A, Viñuela-Rodríguez N, Petrusek A, Oidtmann B (2017) The prevalence of *Aphanomyces astaci* in invasive signal crayfish from the UK and implications for native crayfish conservation. *Parasitology* 144: 411–418, <https://doi.org/10.1017/S0031182016002419>
- Jansen W, Geard N, Mosindy T, Olson G, Turner M (2009) Relative abundance and habitat association of three crayfish (*Orconectes virilis*, *O. rusticus*, and *O. immunis*) near an invasion front of *O. rusticus*, and long-term changes in their distribution in Lake of the Woods, Canada. *Aquatic Invasions* 4: 627–649, <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.4.9>
- Jussila J, Edsman L, Maguire I, Diéguez-Urbeondo J, Theissinger K (2021) Money Kills Native Ecosystems: European Crayfish as an Example. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9: 648495, <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.648495>
- Kouba A, Petrusek A, Kozák P (2014) Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413: 05, <https://doi.org/10.1051/kmae/2014007>
- Kozubíková E, Vrålstad T, Filipová L, Petrusek A (2011) Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by Taq Man MGB real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 113–125, <https://doi.org/10.3354/dao02411>
- Larson E, Abbott C, Usio N, Azuma N, Mberly K, Wood A, Lei FM, Herborg S, And J, Ulian D, Olden J (2012) The signal crayfish is not a single species: Cryptic diversity and invasions in the Pacific Northwest range of *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater Biology* 57: 1823–1838, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02841.x>
- Mrugala A, Kawai T, Kozubíková-Balcarová E, Petrusek A (2017) *Aphanomyces astaci* presence in Japan: a threat to the endemic and endangered crayfish species *Cambaroides japonicus*? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 27: 103–114, <https://doi.org/10.1002/aqc.2674>
- Olden JD, McCarthy JM, Maxted JT, Fetzner WW, Zanden MJ Vander (2006) The rapid spread of rusty crayfish (*Orconectes rusticus*) with observations on native crayfish declines in Wisconsin (U.S.A.) over the past 130 years. *Biological Invasions* 8: 1621–1628, <https://doi.org/10.1007/s10530-005-7854-2>
- Panteleit J, Horvath T, Jussila J, Makkonen J, Perry W, Schulz R, Theissinger K, Schrimpf A (2019) Invasive rusty crayfish (*Faxonius rusticus*) populations in North America are infected with the crayfish plague disease agent (*Aphanomyces astaci*). *Freshwater Science* 38: 425–433, <https://doi.org/10.1086/703417>
- Perry WL, Feder JL, Lodge DM (2001) Implications of hybridization between introduced and resident *Orconectes* crayfishes. *Conservation Biology* 15: 1656–1666, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.00019.x>
- Peters JA, Cooper MJ, Creque SM, Kornis MS, Maxted JT, Perry WL, Schueler FW, Simon TP, Taylor CA, Thoma RF, Uzarski DG, Lodge DM (2014) Historical changes and current



- status of crayfish diversity and distribution in the Laurentian Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research* 40: 35–46, <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.01.003>
- Préau C, Bertrand R, Nadeau I, Sellier Y, Isselin F, Collas M, Capinha C, Grandjean F (2019) Niche modelling to guide conservation actions in France for the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in relation to the invasive *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater biology* 65: 304–315, <https://doi.org/10.1111/fvb.13422>
- Reid SM, Nocera JJ (2015) Composition of native crayfish assemblages in southern Ontario rivers affected by rusty crayfish (*Orconectes rusticus* Girard, 1852) invasions - implications for endangered queensnake recovery. *Aquatic Invasions* 10: 189–198, <https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.2.07>
- Souty-Grosset C, Holdich DM, Noël PY, Reynolds JD, Haffner P (2006) Atlas of crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. Collection Patrimoines naturels 64, 187 pp
- Strand DA, Jussila J, Johnsen SI, Viljamaa-Dirks S, Edsman L, Wiik-Nielsen J, Viljugrein H, Engdahl F, Vrålstad T (2013) Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology* 51: 544–553, <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12218>
- Taylor CA, Redmer M (1996) Dispersal of the crayfish *Orconectes rusticus* in Illinois, with notes on species displacement and habitat preference. *Journal of Crustacean Biology* 16: 547–551, <https://doi.org/10.1163/193724096X00577>
- Trouillhé MC, Souty-Grosset C, Grandjean F, Parinet B (2007) Physical and chemical water requirements of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in western France. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 17: 520–538, <https://doi.org/10.1002/aqc.793>
- Vrålstad T, Knutsen AK, Tengs T, Holst-Jensen A (2009) A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 137: 146–155, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.022>
- Vrålstad T, Johnsen S, Fristad R, Edsman L, Strand D (2011) Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 75–83, <https://doi.org/10.3354/dao02386>
- Wetzel JE, Poly WJ, Fetzner JW (2004) Morphological and genetic comparisons of golden crayfish, *Orconectes luteus*, and rusty crayfish, *O. rusticus*, with range corrections in Iowa and Minnesota. *Journal of Crustacean Biology* 24: 603–617, <https://doi.org/10.1651/C-2483>
- Wilson KA, Magnuson JJ, Lodge DM, Hill AM, Kratz TK, Perry WL, Willis TV (2004) A long-term rusty crayfish (*Orconectes rusticus*) invasion: Dispersal patterns and community change in a north temperate lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61: 2255–2266, <https://doi.org/10.1139/f04-170>

Web sites and online databases

- Gunderson J (2008) Rusty Crayfish : A Nasty Invader- Biology, Identification, Impacts. <http://www.seagrant.umn.edu/downloads/x034.pdf> (accessed 11 May 2011)



Chapitre 2 :

Prévalence de *Aphanomyces astaci* dans les populations d'écrevisses invasives en France et implication dans les épizooties d'écrevisse à pattes blanches



Contexte :

Les écosystèmes aquatiques européens ont été fortement impactés par l'introduction de EEEs depuis la première introduction en 1890 de l'écrevisse américaine *F. limosus* (Kouba et al., 2014; Kozák et al., 2015). Depuis deux autres espèces « historiques » ont été introduites à des fins aquacoles, l'Écrevisse du Pacifique *Pacifastacus leniusculus* (en 1959 - Suède) et l'Écrevisse rouge de Louisiane *Procambarus clarkii* (en 1973- Espagne) (Souty-Grosset et al., 2006 ; Kouba et al., 2014 ; Collas et al. 2014). Suite à des introductions secondaires volontaires ou accidentelles par l'homme, elles ont ensuite colonisé une grande majorité du réseau hydrographique français (Collas et al. 2014). L'étude réalisée par Filipova et al, (2012), retrace l'origine du stock d'écrevisses signal en France à partir de marqueurs mitochondriaux. Les résultats ont montré une très grande diversité génétique au sein des populations de *P. leniusculus*, probablement due à de multiples introductions d'origines différentes. Cette espèce constitue la plus grande menace pour les espèces autochtones, notamment pour l'écrevisse à pattes blanches, car elle partage la même niche écologique, en tête de bassin hydrographique, entrant ainsi en compétition directe pour les mêmes ressources et l'habitat (Collas et al., 2015, 2016; Grandjean et al., 2017). Plusieurs cas de populations sympatriques peuvent être observés en France où l'on note une disparition progressive de l'espèce autochtone (Grandjean com. pers.). L'écrevisse de Louisiane, *Procambarus clarkii*, est quant-à-elle originaire du sud-est des Etats Unis, et a été transloquée dans de nombreux pays du monde, principalement pour sa valeur alimentaire. Elle est désormais présente sur l'ensemble des continents, excepté l'Antarctique et l'Australie (Souty-Grosset et al., 2016 ; Oficialdegui et al., 2019). En Europe, elle a été délibérément introduite en Espagne en 1973 à des fins aquacoles et s'est rapidement répandue (Gherardi, 2006). L'espèce a été signalée pour la première fois en France, dans les années 1980 dans la région de Camargue sur la côte méditerranéenne, et s'est considérablement étendue au cours des trois décennies suivantes (Collas et al., 2015).

L'introduction d'une espèce s'accompagne également de son cortège de parasites appelé pathobiome. Cette notion englobe l'ensemble des agents pathogènes qui coexistent avec l'organisme hôte, formant ainsi des interactions biologiques complexes. Claude Combes, parasitologue français de renom, illustre bien cette idée dans son livre *L'art d'être un parasite*. Il écrit : « Là où le biologiste traditionnel ne voit qu'un pigeon, je vois une véritable communauté de parasites » (p102, éditions Flammarion, 1995). Les activités humaines brisent certaines barrières naturelles qui empêchaient jusqu'alors la rencontre d'un parasite et d'un hôte naïf. Une fois ce filtre de rencontre passé, ce parasite peut devenir agent pathogène redoutable



pour ce nouvel hôte naïf s'il parvient à passer le filtre de compatibilité (Combes, 2001; Combes Claude, 2003). Dans la littérature, nombreux sont les exemples illustrant ce fait (grippe espagnole, l'introduction du lapin en Australie avec l'agent de la myxomatose). Parmi eux, celui des écrevisses et de la maladie de la peste de l'écrevisse est particulièrement éloquent. En effet, l'ensemble des écrevisses nord-américaines sont porteuses saines de l'oomycète *Aphanomyces astaci*, responsable de nombreuses épizooties au sein des populations d'écrevisses autochtones d'Europe depuis le 19ème siècle (Filipová et al., 2013 ; Mrugała et al., 2017 ; Caprioli et al., 2018; Martín-Torrijos et al., 2019; Ungureanu et al., 2020 ; Mirimin et al., 2022) . Le développement d'une méthode de détection spécifique de *A. astaci* par (Vrålstad et al., 2009) a permis de diagnostiquer la présence du pathogène dans les populations d'écrevisses autochtones et envahissantes. La méthode est basée sur la détection par qPCR en temps réel TaqMan, d'un fragment d'ADN (région ITS) du pathogène dans les échantillons de cuticule d'écrevisses testées. Ainsi, par quantification relative, cette méthode permet de déterminer le niveau d'infection de chaque spécimen, compris entre A0 et A7. Les échantillons A0 (PFU=0) et A1 (PFU=5) ne sont pas considérés comme positifs pour la peste de l'écrevisse, car le nombre de PFU détecté est inférieur à la limite de détection (LOD). Les niveaux compris entre A2 et A7 sont positifs au pathogène, A2 étant peu infecté et A7 est considéré comme exceptionnellement infecté (Vrålstad *et al.*, 2009) (Figure 13). Il est important de spécifier qu'à partir du niveau d'infection A4, il est possible d'appliquer toute une batterie de marqueurs moléculaires (microsatellites, marqueurs mitochondriaux) afin de caractériser le groupe génétique d'appartenance de la souche détectée. Ces niveaux d'infection élevés sont rarement diagnostiqués chez les EEEs. Cependant, ils peuvent atteindre des niveaux jusqu'à A7 sur des individus d'écrevisses européennes lors d'une épizootie de peste. Dans le chapitre IV portant sur la caractérisation génétique des souches d'*A. astaci*, nous avons observé une spécificité des souches pour leurs hôtes. Il est donc possible d'attribuer une mortalité à la présence d'une espèce invasive. L'étude de Grandjean et al, (2014), portant sur la caractérisation des souches impliquées dans des mortalités massives de population d'écrevisse à pattes blanches en France, a montré que la souche du groupe génétique B isolé de *P. leniuculus* était responsable de la majorité des mortalités observées (7/8). La souche génétique du groupe D provenant de *P. clarkii* était impliquée dans seulement une mortalité localisée sur le front de colonisation de cette espèce en Poitou-Charentes (Grandjean et al., 2014).



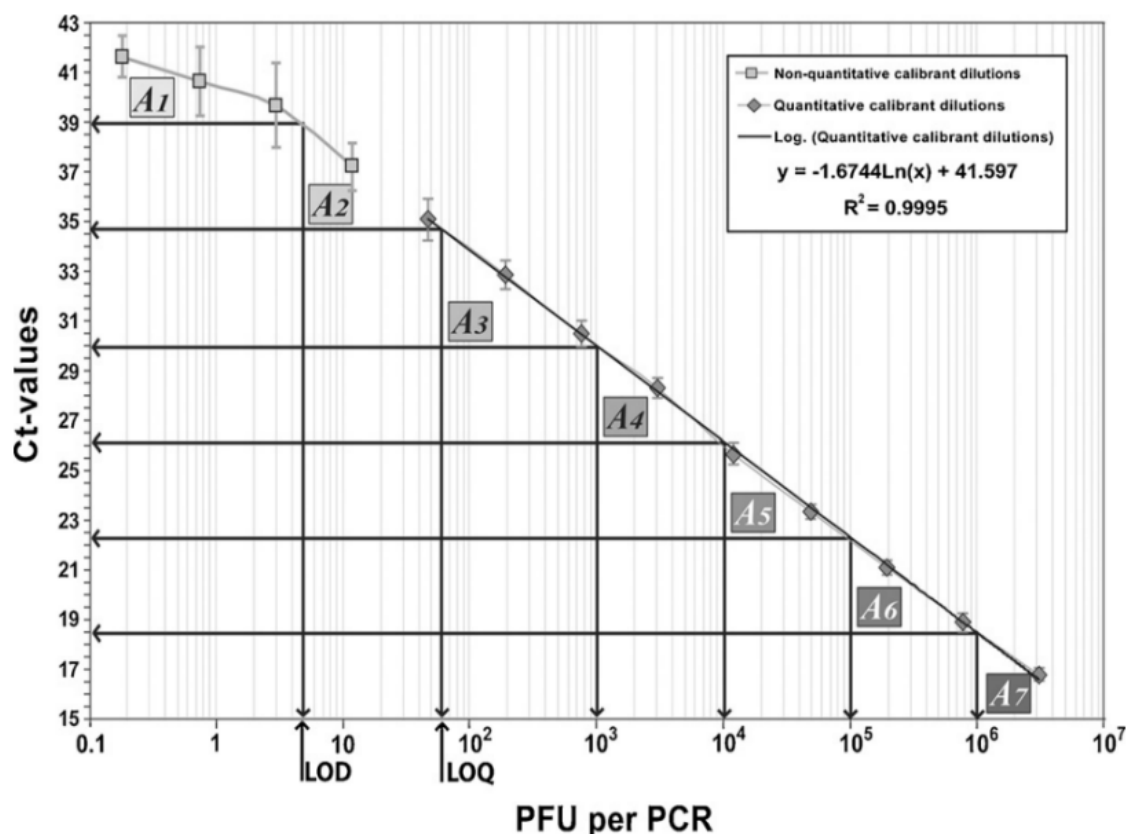
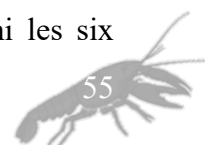


Figure 13 : Méthode de détection et quantification des niveaux d'infection par *A. astaci*. Ce diagnostic moléculaire comprend 7 niveaux d'infection (de A0 à A7) basés sur le nombre d'unités formant des colonies (PFU). La courbe étalon basée sur les valeurs Ct moyennes des dilutions quantitatives d'ADN d'*A. astaci* tracée par rapport au nombre d'unités formant des colonies (PFU). Les niveaux A0 et A1 ne sont pas considérés comme positifs au pathogène, tandis que les niveaux compris entre A2 et A7 le sont. Les limites de détection (LOD) = 5 PFU et la quantification (LOQ) = 50 PFU sont indiquées. (Vrålstad et al., 2009).

En Europe, ces méthodes de diagnostic ont largement été utilisées pour monitorer les prévalences d' *A. astaci* dans les populations d'écrevisses envahissantes et d'évaluer le risque qu'elles représentent en tant que réservoir et vecteur de la maladie (Filipová et al., 2013; James et al., 2017; Matasová et al., 2011; Mojžišová et al., 2020). L'application de cette méthode qPCR a permis de montrer des prévalences de l'ordre de 50 % au sein des populations d'écrevisses exotiques, notamment chez *Pacifastacus leniusculus* avec des niveaux d'infection individuels pouvant atteindre le niveau A4 selon l'échelle de Vralstad et al, (2009), (Filipova et al 2013 ; Grandjean et al. 2017). Très peu de données de prévalence existent pour les populations d'écrevisses de Louisiane en Europe, espèce considérée comme l'une des plus envahissantes au monde. Les études précédentes utilisant la détection par qPCR (Vrålstad et al., 2009) se sont concentrées sur un nombre restreint de populations. En Suisse, Sieber et al., en 2022 ont par exemple détecté *A. astaci* dans deux populations de *P. clarkii* parmi les six



étudiées. Tilmans et al. (2014) ont trouvé *A. astaci* dans une population d'écrevisses sur trois aux Pays-Bas, tandis que Mojžišová et al. (2024) ont rapporté une infection dans une population sur dix en Hongrie. Ces études semblent cependant corroborer l'idée que *P. clarkii* est une espèce réservoir du pathogène en Europe (Tilmans et al., 2014 ; Mojžišová et al., 2024), mais aussi dans son aire de répartition native (Martín-Torrijos et al., 2021). Bien qu'il existe des preuves directes et indirectes des impacts négatifs de *P. clarkii* sur les populations d'écrevisses autochtones (Grandjean et al., 2014; Martín-Torrijos et al., 2019; Souty-Grosset et al., 2016), aucune étude à grande échelle n'a encore été réalisée pour analyser la variation de la prévalence d'*A. astaci* dans ces populations. Ce chapitre s'intéressera aux prévalences *A. astaci* et leur évolution dans les populations d'écrevisses envahissantes en France. Une première étude sera axée sur les taux d'infection des populations de *P. clarkii*, afin d'évaluer la menace que représentent ces espèces pour l'écrevisse à pattes blanches *A. pallipes*. D'autre part, nous avons étudié l'évolution des taux de prévalence sur le moyen terme au sein d'un rééchantillonnage partiel des populations de *P. leniusculus* analysées par Filipová et al. (2013) et Grandjean et al. (2017).

a) Prévalence de *Aphanomyces astaci* dans les populations d'écrevisses de Louisiane dans l'ouest de la France : quel est le risque pour l'écrevisse autochtone à pattes blanches ?

Prevalence of the crayfish plague pathogen in red swamp crayfish populations in western France: How serious is the risk for the native white-clawed crayfish?

Laffitte, M., Mojžišová, M., Delaunay, C., Collas, M., Petrusek, A., Grandjean, F., 2024.

Article publié dans *Journal of Invertebrate Pathology*

Contexte :

- Les espèces envahissantes américaines sont des réservoirs du pathogène *Aphanomyces astaci* cause de nombreux épisodes de mortalités d'espèces autochtones à travers l'Europe.
- Introduite en Espagne en 1973 et 1974 à des fins commerciales, l'écrevisse envahissante de Louisiane *Procambarus clarkii* s'est rapidement propagée dans plusieurs autres pays européens.
- Son aire de distribution évolue d'année en année en France.

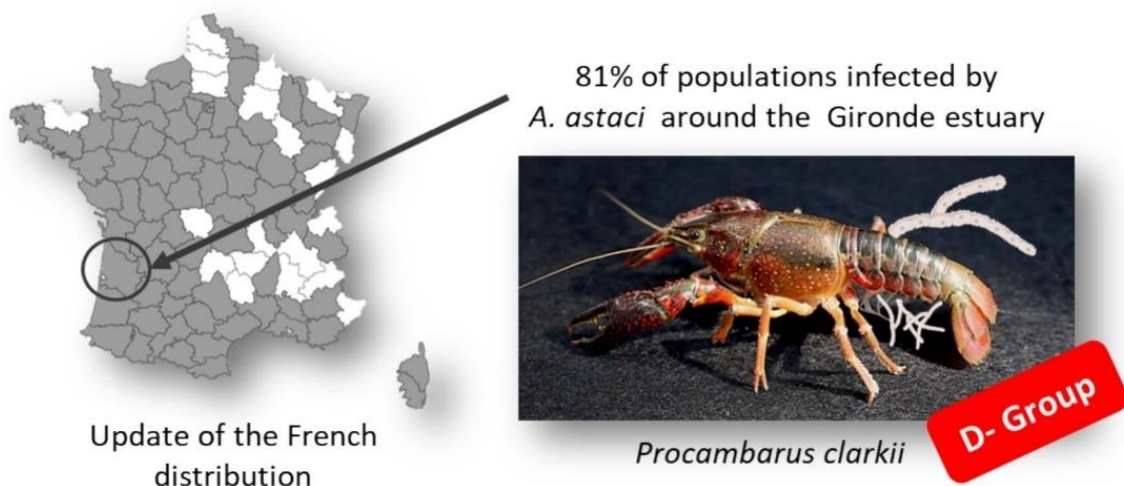
Résultats :

- *P. clarkii* est présente dans 75 départements de la métropole française.
- Le pathogène a été détecté dans plus de 81 % des sites échantillonnés.
- Deux épidémies de peste de l'écrevisse ces 12 dernières années.

Conclusion :

- Avec sa propagation, les impacts de *P. clarkii* et de son pathogène associé sur les écrevisses autochtones en France risquent d'augmenter.

Résumé graphique :



Procambarus clarkii a risk for the native white-clawed crayfish ?



Prevalence of the crayfish plague pathogen in red swamp crayfish populations in western France: How serious is the risk for the native white-clawed crayfish?

Maud Laffitte^a, Michaela Mojžišová^b, Carine Delaunay^a, Marc Collas^c, Adam Petrusek^b, Frederic Grandjean^{a,*}

^a Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Poitiers University, 3 Rue Jacques Fort, 86000, Poitiers, France

^b Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, 12800, Prague 2, Czechia

^c Office Français de la Biodiversité, Service départemental des Vosges, 22-26 Avenue Dutac, 88026, Epinal, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Aphanomyces astaci
Procambarus clarkii
Invasive crayfish distribution
Mass mortality
Crayfish plague
Pathogen transmission

ABSTRACT

The crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* has been implicated in a number of mass mortalities and irreversible population declines of native crayfish across Europe. At present, the reservoirs of the pathogen in Europe are mainly populations of invasive North American crayfish species. In southwestern Europe, including France, a particularly widespread invader is the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. Recent distribution data confirm that *P. clarkii* is present in at least 75 French departments, i.e. more than 78% of those in metropolitan France. We analysed the prevalence and pathogen load of *A. astaci* in 42 populations of this species in western France (Nouvelle Aquitaine region), where the species is most densely distributed, particularly in a wide range of environments around the Gironde estuary. The pathogen was detected by two different quantitative PCR assays in more than three quarters of the populations studied (34 out of 42); 163 out of 480 analysed crayfish individuals tested positive for the presence of *A. astaci*. In most cases, individual infection levels were very low, detectable with quantitative PCR but not sufficient for pathogen genotyping. In seven *P. clarkii* individuals from four populations, however, we were able to assess *A. astaci* variation by microsatellite markers and sequencing of mitochondrial markers. All these host specimens carried *A. astaci* genotype group D, haplotype d1, which has caused the majority of crayfish plague outbreaks in neighbouring Spain. In contrast, the French outbreaks genotyped to date (including eight newly analysed in this study) were mostly caused by strains of genotype group B, specific to the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Haplotype d1 found in *P. clarkii* was involved in one of the newly characterised outbreaks. Our study confirms that *P. clarkii* is a potentially important reservoir of the crayfish plague pathogen in France, but not the main source of the pathogen in mass mortalities of *A. pallipes*, probably due to different ecological requirements of the different invasive host crayfish. However, as *P. clarkii* continues to spread, the threat posed by this species to native crayfish is likely to increase.

1. Introduction

Globalization is contributing to the spread of various species, including both terrestrial and aquatic plants and animals (Cuthbert et al., 2021). Freshwater ecosystems are particularly affected by the intentional or accidental introductions of invasive species (Hulme, 2009). Among these, freshwater crayfish are ecologically important invaders in many regions of the globe, including Europe. Originally, such species were imported to this continent for economic reasons: fisheries

and aquaculture (Souty-Grosset et al., 2016). Another introduction pathway that has recently been responsible for a substantial increase of the number of non-native crayfish species in Europe is the import of live animals for the ornamental trade and the deliberate releases of aquarium specimens to the wild (Churcholl, 2013; Weiperth et al., 2019).

All of these pathways have contributed to the introduction and spread of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852), globally the most widespread crayfish species. Originating from northern Mexico and southern USA, it has been introduced to at least 40

* Corresponding author.

E-mail address: frederic.grandjean@univ-poitiers.fr (F. Grandjean).

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108128>

Received 2 March 2024; Received in revised form 5 May 2024; Accepted 9 May 2024

Available online 10 May 2024

0022-2011/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



countries around the world mainly for its food value, and it is now present on all continents except Antarctica and Australia (Oficialdegui et al., 2019; Souty-Grosset et al., 2016). In Europe, it was first deliberately introduced into Spain in 1973 and 1974 for aquaculture purposes (Gherardi, 2006). Since then, it has rapidly expanded in several other European countries, also thanks to its further spread as an ornamental aquarium animal (Patoka et al., 2015; Weiperth et al., 2019).

The invasion success of this species is facilitated by its life cycle plasticity, high fecundity, short maturation time, and high tolerance to a wide range of environmental conditions (pollution, water temperature, oxygen concentration). Such adaptability allows *P. clarkii* to thrive in warm waters but also to survive in headwater systems and to successfully overwinter in temperate conditions (Vesely et al., 2015). As a result, it can be found in various habitats, from brooks and large rivers to ponds, lakes, and wetlands. Due to its broad salinity tolerance (Dör et al., 2020), this species is not only able to colonize brackish waters (Martín-Torrijos et al., 2021a) but was even found in marine environments (Nota et al., 2024).

In France, *P. clarkii* was first reported in the 1980s in the wetlands of the Camargue region at the Mediterranean coast, and it has expanded considerably during the following three decades (Changeux, 2003). The species was already present in 61 out of 96 departments in metropolitan France (i.e., those located within Europe, not including the overseas regions) by 2007 (Collas et al., 2007). Seven years later, in 2014, its presence was confirmed in 70 departments, including those in the north-west, centre, and east of the country (Collas et al., 2015).

This aggressive and omnivorous species has a negative impact on aquatic biota, including macrophytes and animals, may cause important changes in the food web structure, and even whole-ecosystem shifts (Souty-Grosset et al., 2016). Moreover, like many other crayfish species of North American origin, *P. clarkii* acts as a vector of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* Schikora (Aquiloni et al., 2011; Diéguez-Uribeondo and Söderhäll, 1993; Martín-Torrijos et al., 2019; Becking et al., 2022). Crayfish plague has been involved in numerous crayfish mass mortalities throughout Europe since the 19th century (Alderman, 1996), and contributes to severe declines of native European crayfish (Holdich et al., 2009).

Improvements in molecular methods for detection of the crayfish plague pathogen (Oidtmann et al., 2006; Strand et al., 2023; Vrålstad et al., 2009) and its genotyping (Di Domenico et al., 2021; Grandjean et al., 2014; Huang et al., 1994; Makkonen et al., 2018; Minardi et al., 2018) have allowed the identification of genotypes involved in the disease outbreaks and their association with the likely sources of infection. Three of the five *A. astaci* genotype groups (B, D, and E), characterized by RAPD-PCR (see review in Svoboda et al., 2017) and corresponding to haplogroups based on mitochondrial ribosomal subunits (Makkonen et al., 2018), seem largely associated with the three most widespread non-native crayfish of North American origin in Europe, the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), the spiny-cheek crayfish *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817), and *P. clarkii* (see review of *A. astaci* genotyping in Ungureanu et al., 2020). Although the diversity of *A. astaci* is much greater, particularly when its native range is considered (Martín-Torrijos et al., 2021b), and horizontal transmission of genotype groups between these hosts may occur (Mojžišová et al., 2022), genotyping of crayfish plague outbreaks can indicate likely sources of the pathogen strains involved in crayfish mass mortalities (Caprioli et al., 2018; Martín-Torrijos et al., 2019; Mojžišová et al., 2020).

Procambarus clarkii is the primary host reservoir for *A. astaci* genotype group D in Europe (Diéguez-Uribeondo et al., 1995). Strains of this group (and/or the corresponding mitochondrial D-haplogroup; Makkonen et al., 2018), have been implicated in numerous crayfish plague outbreaks affecting the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) in Spain (Martín-Torrijos et al., 2019) and also in the mortalities of native crayfish in France, Italy, and Central Europe (summarized in Ungureanu et al., 2020), and even in Japan (Martín-

Torrijos et al., 2018). Transmission of the crayfish plague pathogen from *P. clarkii* to susceptible crayfish is therefore a relevant threat for such species.

The efficiency of conservation management of native European crayfish may be improved by information on the distribution and prevalence of the crayfish plague pathogen in invasive crayfish populations, which can then be considered when assessing risks to native populations at specific places, regions, and catchments. Such information is obtained by molecular screening, which has become possible thanks to the development of sufficiently sensitive and specific laboratory methods that detect even small amounts of *A. astaci* DNA in mixed-genome samples (Oidtmann et al., 2006; Strand et al., 2023; Vrålstad et al., 2009). Most of the large-scale prevalence studies have been carried out on populations of *P. leniusculus* and *F. limosus* in Europe (e.g., Grandjean et al., 2017; James et al., 2017; Mojžišová et al., 2022), although some populations of *P. clarkii* have also been screened occasionally (Caprioli et al., 2018; Mojžišová et al., 2024; Sieber et al., 2022; Tilmans et al., 2014). Most of these studies agree that *A. astaci* prevalence in populations of hosts of North American origin can vary dramatically, from no detection (i.e., prevalence below the detection level or local absence of the pathogen) to almost 100 %. For example, in the largest study screening *P. leniusculus* for *A. astaci* infection in France, which included 94 sampling sites and more than 1500 specimens, Filipová et al. (2013) and Grandjean et al. (2017) reported the pathogen in 63 % of the populations studied, with within-population infection prevalence reaching up to 90 %. In contrast, *A. astaci* was reported surprisingly infrequently from most European populations of *P. clarkii* analysed so far by comparable methodology (Caprioli et al., 2018; Mojžišová et al., 2024; Sieber et al., 2022; Tilmans et al., 2014).

Despite the direct and indirect evidence of the detrimental effects of *P. clarkii* presence on native crayfish populations, no study has focused so far on a large-scale screening of its populations to evaluate variation in *A. astaci* prevalence, and directly assess its role in the transmission of crayfish plague in Europe. As this species has become increasingly widespread in France, it is of interest to compare the patterns in this *A. astaci* host with the previously intensively studied signal crayfish. In our study, we particularly focused on Nouvelle-Aquitaine region in western France, where *P. clarkii* is widespread and inhabits a wide range of habitats, including the naturally valuable wetlands of the Gironde estuary.

The aims of this study were (i) to update information on the distribution of *P. clarkii* in France, (ii) to characterize the distribution and prevalence of *A. astaci* in populations of this host in the study region, (iii) to assess *A. astaci* strain diversity in individuals with high levels of infection using two complementary genotyping methods, and (iv) to genotype *A. astaci* strains involved in crayfish plague outbreaks in French *A. pallipes* populations between 2014 and 2021, to assess the contribution of strains transmitted from *P. clarkii* to losses of native crayfish populations in the country.

2. Materials and methods

2.1. Distribution of *Procambarus clarkii* in France

The update of *P. clarkii* distribution is based on the data from the OpenObs database (<https://openobs.mnhn.fr/>) from the National Inventory of Natural Heritage (INPN) maintained by National Museum of Natural History, Paris (MNHN), and those from Office Français de la Biodiversité (OFB) (Collas et al., 2015). The occurrence records were retrieved on September 20, 2023. All reported occurrences of *P. clarkii* in France were assigned to the department level and then mapped using the open-source software QGIS v. 3.30.2.

2.2. Field survey

Procambarus clarkii (Fig. 1) were captured in the Gironde department





Fig. 1. Specimen of *Procamburus clarkii* trapped during the survey in Gironde. Photo by Maud Laffitte.

in the Nouvelle-Aquitaine region by the experienced personnel of the French National Agency for Water and Aquatic Environments (ONEMA). The sampling took place from 2014 to 2021 in summer months (June to September), mostly using baited traps but also during night surveys of suitable habitats. Crayfish were collected in a wide variety of localities, including both running and stagnant waters (altogether 42 sites: 34 brooks, 2 channels, 3 lakes and 1 pond, 2 swamps; Table 1). The number of analyzed specimens ranged from 3 to 20 per site, depending on trapping success. The sampling effort, however, was not sufficiently standardized to allow assessment of crayfish population densities. After sampling, crayfish were preserved in 96 % ethanol until further processing. In total, 480 individuals from 42 *P. clarkii* populations were screened for *A. astaci* infection (Table 1).

In addition, we analyzed *A. astaci* diversity in samples from eight recent, previously unreported crayfish plague outbreaks documented in *A. pallipes* populations in five French departments (Ain, Ardèche, Loire, Pyrénées-Atlantique, Vienne) between 2014 and 2021 (Table 2).

2.3. Molecular detection of *A. astaci*

The cuticle from one uropod and half of the abdomen was dissected with sterile tools and the presence of melanized spot was noted for each specimen if relevant. DNA from the dissected tissues was extracted using an adapted protocol of the Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), as in Filipová et al. (2013). The infection status of each specimen was tested by TaqMan MGB quantitative PCR (qPCR) according to Vrålstad et al. (2009), using a LightCycler® 480 Instrument II (Roche Sequencing, Basel, Switzerland) and TaqMan Environmental Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cycle settings followed the original protocol of Vrålstad et al. (2009), with the annealing temperature of 58 °C. Each DNA isolate was tested twice, once undiluted and once 10-fold diluted, in order to test for potential inhibition (Vrålstad et al., 2009). Two negative controls (water, and muscle tissue from an uninfected specimen of *Austropotamobius pallipes*), which remained negative in all runs, were included in each qPCR.

Four standards, a dilution series with concentration levels of 4^{-10} (corresponding to 12 PCR-forming units (PFUs) in the reaction), 4^{-8} (~192 PFU), 4^{-4} (~49,152 PFU) and 4^{-2} (~786,432 PFU) from reference *A. astaci* DNA isolate of a known concentration of 80 ng/μL, were included in duplicates in each qPCR reaction. The reference DNA was extracted from *A. astaci* laboratory strain Pec10 isolated from the crayfish plague outbreak caused by genotype group B in Černý Brook, Czechia (Kozubíková-Balcarová et al., 2014). This standard dilution series was used to quantify the number of PCR-forming units in the reaction, and subsequently to assign each crayfish to a semiquantitative agent level (between A0 and A7; Vrålstad et al., 2009). Samples with A0 (PFU = 0) and A1 (PFU < 5) were not considered as positive for *A. astaci* DNA (Vrålstad et al., 2009). The prevalence of the pathogen and its 95 %

confidence interval were estimated for each population using the “epi.conf” function from the R package epiR (Stevenson & Sergeant, 2024).

In light of the recent development of *A. astaci* detection assays, we later re-analysed a subset of DNA isolates, representing selected populations in which *A. astaci* was detected and different agent levels, by a qPCR assay published by Strand et al. (2023). This improved method is not prone to cross-reactivity with *Aphanomyces fennicus* Viljamaa-Dirks & Heinikainen, a closely related congener of *A. astaci* reported from Fennoscandia (Strand et al., 2023; Viljamaa-Dirks & Heinikainen, 2019). The qPCR protocol was comparable with that described above, with cycling conditions following the EMM2 protocol of Strand et al. (2023). The results of this analysis were mainly used to confirm that the previous results were not seriously affected by false positives, and to compare the efficiency of both assays in the laboratory setup at the University of Poitiers.

2.4. *Aphanomyces astaci* genotyping in infected *Procamburus clarkii* and in crayfish plague outbreaks

Genotyping of *A. astaci* was performed on DNA isolates with a sufficiently high level of infection (agent level at least A3) from seven *P. clarkii* individuals representing four populations (Saint-Germain, Estey du Gu, Ayguemor, Barbanne), and from sixteen infected *A. pallipes* individuals, two from each of the eight analysed crayfish plague outbreaks. We applied two genotyping methods, characterizing variation at nine microsatellite markers developed by Grandjean et al. (2014), and in partial sequences of two *A. astaci* mitochondrial genes for large and small ribosomal subunits (Makkonen et al., 2018), respectively.

Three multiplex PCRs were carried out by using a modified protocol from Grandjean et al. (2014), combining three microsatellite loci in each PCR (Multiplex 1: loci Aast2, Aast9 and Aast12; Multiplex 2: Aast4, 7 and 14; Multiplex 3: Aast6, 10 and 13). Each reaction of a final volume of 10 μL was performed using the Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's protocol, with 1 μL of genomic DNA (concentration between 25 and 60 ng/μL), and with 2 μM concentration of each primer. The cycling program consisted of initial step of 15 min at 95 °C for HotStart Taq activation, and 40 cycles of 30 sec at 95 °C, annealing 90 sec at 54 °C and extension 60 sec at 72 °C. Each PCR product was then diluted 10-fold and used in fragment analysis on an Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Allele sizes were scored using GeneMapper v. 6 software (Thermo Fisher Scientific). If the scoring was ambiguous, the genotyping was repeated separately for each locus.

The mitochondrial haplotype of *A. astaci* in each DNA isolate successfully genotyped by microsatellite loci was determined by amplification and sequencing of ribosomal small (rnnS) and large (rnnL) subunits following the original protocol of Makkonen et al. (2018). Sanger sequencing of the PCR products in both directions was performed on the SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

3. Results

3.1. *Procamburus clarkii* distribution in France

The OpenObs database with 17,459 georeferenced crayfish records, including records from the 2014 national survey performed by OFB (Collas et al., 2015), provided up-to-date picture of *P. clarkii* distribution in France (Fig. 2). At the national level, this species is mainly found along the Atlantic coast, particularly within the regions of Nouvelle-Aquitaine (departments Gironde, Lot-et-Garonne, Landes), Pays de la Loire (Loire-Atlantique, Vendée) and Midi-Pyrénées (Gers, Tarn-et-Garonne), but also towards the Mediterranean Sea (departments Hérault, Gard, Bouches-du-Rhône). In these areas, *P. clarkii* have colonized a wide range of ecosystems including extensive wetland areas with

Table 1
Results of *Aphanomyces astaci* detection and genotyping in *Procambarus clarkii* population from 2014 to 2021 in the Gironde Department. Number of individuals are provided for each agent level in parentheses. Genotyping was carried out for *A. astaci*-positive DNA isolates exceeding 500 PFU with microsatellite loci (Grandjean et al., 2014) to assign genotype group, and by sequencing of mitochondrial small (mtS) and large (mtL) ribosomal subunits (Wolkowicz et al., 2018) to identify haplotype. Abbreviations of locality types: B: brook, L: lake, P: pond, C: channel, S: swamp; CI: confidence interval.

Locality [waterbody type]	Catchment	Coordinates (WGS84)	Year	No. infected / analysed	Agent level (No.)	Prevalence (95 % CI)	Genotype group	Haplotype
Étang de Barreyre [L]	—	45.4245 N, 1.0936 W	2016	0/15	A0(15)	0 % (0–22 %)	—	—
Étang de Lacanau [L]	—	44.9733 N, 1.1181 W	2014	5/20	A0(4), A1(11), A2(3), A3(2)	25 % (9–49 %)	—	—
Étang de Ferrière [L]	—	44.4834 N, 0.3567 W	2016	10/10	A2(7), A3(3)	100 % (69–100 %)	—	—
Le Nazairde [B]	Dordogne	44.8370 N, 0.0616 W	2014	0/7	A0(1), A1(6)	0 % (0–41 %)	—	—
Chenal de Richard [C]	Dordogne	45.3855 N, 0.9600 W	2015	0/10	A0(10)	0 % (0–31 %)	—	—
Le Cadailhan [B]	Dordogne	44.8418 N, 0.0440 W	2016	0/7	A0(7)	0 % (0–41 %)	—	—
Canal des Étangs [B]	Dordogne	44.8590 N, 1.1516 W	2016	0/10	A0(9), A1(1)	0 % (0–31 %)	—	—
Ruisseau Cante Ranne [B]	Dordogne	44.9305 N, 0.3748 W	2016	0/11	A0(7), A1(4)	0 % (0–28 %)	—	—
La Barbanne [B]	Dordogne	44.9373 N, 0.1865 W	2014	4/16	A0(4), A1(8), A2(3), A3(1)	25 % (7–52 %)	D	dl
La Marzelle [B]	Dordogne	45.0574 N, 0.4982 W	2016	3/11	A0(4), A1(4), A2(2), A3(1)	27.3 % (6–61 %)	—	—
Essey du Gua [B]	Dordogne	44.9319 N, 0.5115 W	2014	3/10	A0(2), A1(5), A2(2), A3(1)	30 % (7–65 %)	D	dl
Le Colinet [B]	Dordogne	45.0964 N, 0.4499 W	2016	3/10	A0(7), A2(3)	30 % (7–65 %)	—	—
Ruisseau de Gendarme [B]	Dordogne	44.9826 N, 0.0813 W	2016	5/14	A1(9), A2(5)	35.7 % (13–65 %)	—	—
Le Moron [B]	Dordogne	45.0658 N, 0.4751 W	2016	17/17	A2(11), A3(6)	100 % (80–100 %)	—	—
Ruisseau de Lacanau [B]	Eyre	44.6320 N, 0.9504 W	2014	1/10	A0(3), A1(6), A3(1)	10 % (0–45 %)	—	—
Cuistre Moure [B]	Eyre	45.2355 N, 1.1057 W	2016	2/16	A0(10), A1(4), A2(2)	12.5 % (2–38 %)	—	—
Ruisseau du Syndic [B]	Eyre	44.4887 N, 0.8036 W	2016	2/15	A1(13), A2(2)	13 % (2–40 %)	—	—
Pont de Lamothe [B]	Eyre	44.6260 N, 0.9963 W	2016	2/15	A0(9), A1(4), A2(2)	13.3 % (2–40 %)	—	—
Bras de l'Eyre [B]	Eyre	44.4637 N, 0.7878 W	2016	8/11	A1(3), A2(8)	72.7 % (39–94 %)	—	—
Le Saucats [B]	Garonne	44.6779 N, 0.5342 W	2015	0/10	A0(9), A1(1)	0 % (0–31 %)	—	—
Le Dropt [B]	Garonne	44.6338 N, 0.0109 W	2015	1/7	A0(2), A1(4), A2(1)	14.3 % (0–58 %)	—	—
Ayguemor [B]	Garonne	44.3717 N, 0.1021 W	2016	10/19	A0(7), A1(2), A2(2), A3(8)	57.9 % (33–80 %)	D	dl
Hiou [B]	Garonne	44.4852 N, 0.3237 W	2016	11/15	A0(1), A1(3), A2(8), A3(3)	73.3 % (45–92 %)	—	—
Langranne [B]	Garonne	44.7204 N, 0.3143 W	2016	6/8	A1(2), A2(5), A3(1)	75 % (35–97 %)	—	—
Ruisseau du Bois Noir [B]	Garonne	45.1332 N, 0.3101 W	2014	7/8	A1(1), A2(3), A3(4)	87.5 % (47–100 %)	—	—
Ruisseau de Lavie [B]	Garonne	44.4688 N, 0.4291 W	2015	8/8	A2(5), A3(3)	100 % (63–100 %)	—	—
Bras de la Cabalyre [B]	Garonne	45.0489 N, 0.7219 W	2016	0/11	A0(9), A1(2)	0 % (0–28 %)	—	—
Le Ferchaud [B]	Gironde	45.2902 N, 0.5668 W	2016	1/7	A0(3), A1(3), A2(1)	14.3 % (0–58 %)	—	—
Le Segur [B]	Gironde	44.6397 N, 0.0293 W	2016	1/7	A0(3), A1(3), A2(1)	14.3 % (0–58 %)	—	—
Canal des Sables [B]	Gironde	45.2331 N, 0.6526 W	2016	2/11	A0(5), A1(4), A2(2)	18.2 % (2–52 %)	—	—
Marais du Graoux [S]	Gironde	44.5037 N, 0.8112 W	2016	3/15	A0(3), A1(7), A2(3)	20 % (4–48 %)	—	—
Ruisseau des Hauts Ponts [B]	Gironde	45.2863 N, 0.5132 W	2016	2/10	A0(3), A1(5), A2(2)	20 % (3–56 %)	—	—
La Moulinade [S]	Gironde	45.1966 N, 0.6039 W	2016	3/15	A0(8), A1(4), A2(3)	20 % (4–48 %)	—	—
Le Caron [P]	Gironde	44.3698 N, 0.2417 W	2016	2/10	A0(4), A1(4), A2(1), A3(1)	20 % (3–56 %)	—	—
Le Martinet [B]	Gironde	44.5484 N, 0.8895 W	2016	2/10	A0(1), A1(7), A2(2)	20 % (3–56 %)	—	—
Chenal du Gaet [C]	Gironde	45.1997 N, 0.7827 W	2015	2/9	A0(1), A1(6), A2(2)	22.2 % (3–60 %)	—	—
Le Palais [B]	Gironde	45.0200 N, 0.1873 W	2016	3/13	A0(2), A1(8), A2(3)	23.1 % (5–54 %)	—	—
Jaille de Cartillon [B]	Gironde	45.0951 N, 0.7246 W	2014	4/10	A0(1), A1(5), A2(4)	40 % (12–74 %)	—	—
La Loube [B]	Gironde	45.0187 N, 0.7160 W	2016	4/8	A1(4), A2(3), A3(1)	50 % (16–84 %)	—	—
Ruisseau de Cabosin [B]	Ile de	45.0122 N, 0.1116 W	2016	8/16	A0(2), A1(6), A2(7), A3(1)	50 % (25–75 %)	—	—
Saint-Germain [B]	Ile de	44.9818 N, 0.2096 W	2021	3/3	A4(1), A3(2)	100 % (29–100 %)	D	dl
Le Petit Palais [B]	Ile de	45.0126 N, 0.1944 W	2016	15/15	A2(15)	100 % (78–100 %)	—	—



Table 2
Austropotamobius pallipes mass mortalities due to crayfish plague confirmed by molecular analyses in France from 2001 to 2021, and results of pathogen genotyping. Genotyping of *Aphanomyces astaci* was attempted with microsatellite loci (Grandjean et al., 2014), and for most recent outbreaks also by sequencing of mitochondrial small (rnnS) and large (rnnL) ribosomal subunits (Makkonen et al., 2018). Asterisks indicate recent mass mortalities first analyzed in this study and not reported before.

Brook	Catchment	Department	Coordinates (WGS84)	Year	Genotype group	Haplotype
Saint-Christophe	Vienne	Charente	46.0002 N, 0.8474 E	2001	B	b
Le Jabron	Rhône	Vaucluse	44.5462 N, 4.8687 E	2008	E	—
Magot	Auxance	Deux-Sèvres	46.6202 N, 0.0396 W	2009	D	—
La Lucelle	Birs	Haut-Rhin	47.4261 N, 7.2639 E	2013	B	b
Ruisseau de Rouillé	Sarthe	Sarthe	48.2363 N, 0.0697 E	2014	B	b
Le Curraize	Loire	Loire	45.5849 N, 4.1270 E	2014	B	b
Le Grozon	Doux	Corrèze	44.9818 N, 4.6163 E	2014	B	b
Pisseur*	Ain	Ain	46.0987 N, 5.2621 E	2014	B	b
Aigue Blanche*	Loire	Loire	45.3658 N, 4.0453 E	2015	B	b
La Petite Rimarde*	Loire	Loire	48.0544 N, 2.3049 E	2015	B	b
Le Buizin	Rhône	Haute-Savoie	45.8808 N, 5.4266 E	2015	E	—
Mormante*	Loire	Loire	45.4942 N, 4.4981 E	2016	B	b
Le Rune*	Le Clain	Vienne	46.4851 N, 0.2326 E	2020	B	b
Eve*	Ardeche	Ardeche	44.8758 N, 4.6673 E	2021	B	b
Poupmens*	Ardeche	Ardeche	44.7063 N, 4.2187 E	2021	B	b
Bayse de Pouquet*	Gave	Pyrénées-Atlantiques	43.2064 N, 0.4620 W	2021	D	d1

marshes and coastal ponds, rivers and canals. At the moment of analysis (September 20, 2023), the Openobs database included occurrences of this species from 75 French departments (Fig. 2); only 21 metropolitan departments had no records as yet. Since the last national survey in 2014, the species has been recorded in 4 additional departments: Meurthe-et-Moselle, Meuse, Eure-et-Loire, and Loire-et-Cher. Furthermore, compared to 2014 data, the Openobs database included a substantially higher number of occurrences of the

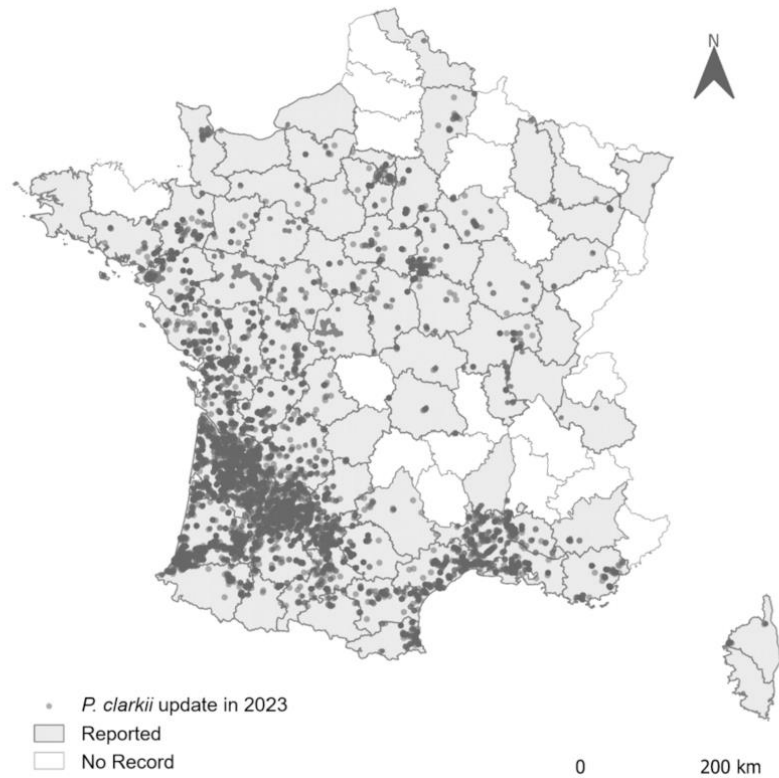


Fig. 2. Distribution of *Procambarus clarkii* in France in 2023 according to combined data from the Openobs database (openobs.mnhn.fr), and that of the Office Français de la Biodiversité. Departments shaded in light grey have at least one record of the species; no sightings were reported in either database for the departments in white.



species in several departments (e.g., Loiret, Cher, Nièvre, Indre-et-Loire, and Haute-Vienne).

3.2. Screening for the crayfish plague pathogen in *Procambarus clarkii* populations

Out of 480 analysed individuals of *P. clarkii* (Table 1), 163 specimens (34 %) tested positive for the presence of *A. astaci* DNA (agent level between A2 and A5) with the Vrålstad et al. (2009) assay. In the remaining two thirds of the analysed specimens (317), the pathogen DNA was not detected at all (agent level A0 in 158 individuals), or it was detected in insufficient quantity to be considered positive (agent level A1, i.e., slight but inconclusive traces of *A. astaci* DNA, in 159 individuals).

Infected *P. clarkii* individuals were detected in 34 sites (81 %) of the 42 sampled. The values of estimated *A. astaci* prevalence varied substantially, from 100 % in 5 populations (12 %; 3 to 17 individuals analysed; Table 1) to no pathogen detection in 8 populations (19 %; 7 to 15 individuals analysed). However, the wide confidence intervals of the prevalence values indicate that for none of those populations, absence of the pathogen can be reliably claimed (Table 1).

Most of the 163 infected individuals exhibited only low intensity of infection by the crayfish plague pathogen (agent levels A2 to A3; Table 1). Specifically, 123 isolates were assigned to agent level A2 (very low level of *A. astaci* DNA, according to Vrålstad et al., 2009) and 27 to agent level A3 (low level of the target DNA). In one site, Saint-Germain brook in the Isle river basin, however, all three analysed specimens were infected more strongly (1 × A4 and 2 × A5).

The re-analysis of selected DNA isolates by the recently published Strand et al. (2023) qPCR assay showed a good congruence with the results summarized above (Supplementary Table S1). Out of 38 samples that tested positive for *A. astaci*, one was re-assigned to a negative category (agent level A1), but that specimen was originally among the weakest positively-scoring samples (i.e., with very low levels of the pathogen DNA). In contrast, 5 out of 22 re-tested isolates that originally tested negative were re-assigned to agent level A2, i.e., positive, with the

new assay. All those isolates originally showed weak, inconclusive traces of *A. astaci* DNA (A1). All samples originally assigned A0 category remained negative, and all samples originally assigned to A3 or higher agent levels (i.e., with low, moderate or high levels of the pathogen DNA) tested positive for *A. astaci* also with the new assay.

The spatial distribution of high- and low-prevalence populations around the Gironde estuary (Figure 3B) was uneven. In some areas, highly and lowly infected populations were located in close vicinity. However, there was a general tendency for clustering of multiple populations with similar prevalence values (Fig. 3B).

3.3. *Aphanomyces astaci* genotyping

All seven *P. clarkii* individuals from four different populations, for which the crayfish plague pathogen genotyping was attempted, carried the same mitochondrial haplotype d1 (based on mns and mnL sequences). Accordingly, microsatellite multilocus genotypes indicated that the strains belonged to genotype group D.

In seven out of eight *A. pallipes* mass mortalities analysed, the microsatellite allele pattern as well as sequences of the mitochondrial markers confirmed the presence of genotype group B (Figure 3A, Table 2). However, the outbreak in Bayse de Pouquet (southwestern France, department Pyrénées-Atlantiques) was caused by a strain whose microsatellite allele pattern as well as mitochondrial ribosomal subunits matched those characterized from French *P. clarkii* populations (i.e., genotype group D, mitochondrial haplotype d1; Table 2).

4. Discussion

The updated map of distribution of *Procambarus clarkii* in France confirms continuous expansion of this invasive crayfish in the country. Although most records of the species come from its southwestern part (the region our study focuses on) and from along the Mediterranean coast, the number of occurrences has been increasing since 2014 (Collas et al., 2015), and four more departments have been colonized meanwhile. By 2023, *P. clarkii* has been recorded in more than three quarters

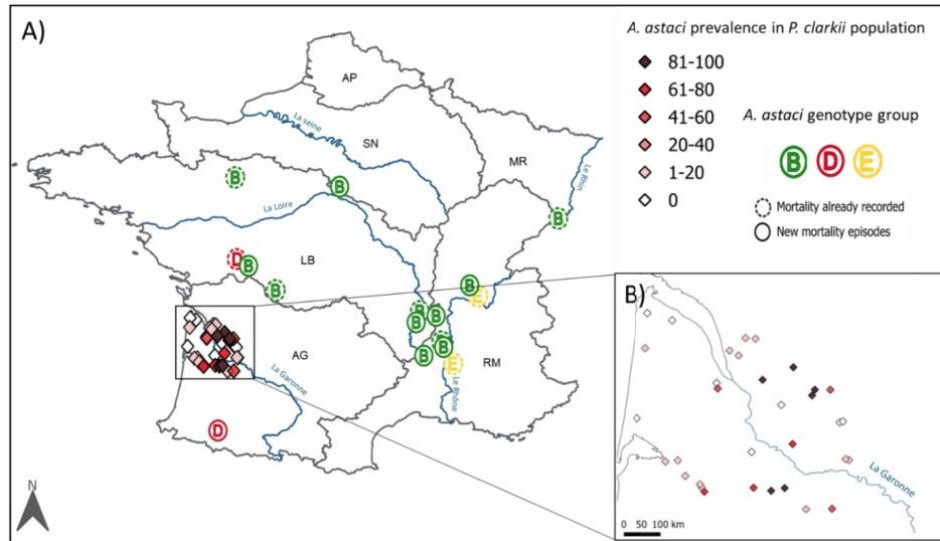


Fig. 3. Map of main hydrographic regions in France, distribution of studied *Procambarus clarkii* populations (with prevalence of *Aphanomyces astaci* indicated by colour intensity), and location of genotyped crayfish plague outbreaks in French *Austropotamobius pallipes* populations since 2001. Abbreviations of hydrographic regions: AP: Artois-Picardie, RM: Rhin-Meuse, SN: Seine-Normandie, LB: Loire-Bretagne, AG: Adour-Garonne, MR: Méditerranée-Rhône.

of metropolitan French departments. Being so widespread, *P. clarkii* affects invaded ecosystems, especially in lowlands and warmer regions, and also represents an increasing risk for native crayfish (Collas et al., 2015) by both direct and indirect competition.

Our results confirm that *P. clarkii* is a potentially important reservoir of the crayfish plague pathogen in western France. The pathogen was detected in more than 80 % of studied sites, and its absence could not be claimed anywhere with certainty. The analysis of selected DNA isolates by a new qPCR assay of Strand et al. (2023) confirms that our results based on the Vrålstad et al. (2009) assay were not affected by false positives; the few differences in positive/negative assignment of some A2 and A1 isolates were likely due to inherent variation of the results when samples with a very low concentration of the target DNA are analysed. This re-analysis also suggests that at least some of the many crayfish specimens in which qPCR detected only traces of *A. astaci* DNA (i.e., agent level A1, conservatively assessed as negative), were in fact carriers of the pathogen.

For French signal crayfish *P. leniusculus* studied by the same methodological approach, Grandjean et al. (2017) reported *A. astaci* presence in 63 % of studied populations. These differences between host species might stem from the different spatial coverage of the surveys. The signal crayfish survey covered the whole country including many isolated populations, while the present study focused on a region with substantial connectivity between *P. clarkii* populations, which should favour the pathogen spread. Furthermore, signal crayfish populations in different regions of France might have been founded from multiple sources, some of them possibly with low pathogen prevalence, while *P. clarkii* around the Gironde estuary are presumably all of the same (likely Spanish) origin. Indeed, results of Kozubíková et al. (2009) or Tilmans et al. (2014) suggest that founder effects are important determinants of *A. astaci* prevalence in populations of invasive crayfish.

The huge variation in pathogen prevalence, ranging locally from 0 % to 80 % or more, and generally low pathogen load in individual crayfish hosts (with only occasional exceptions of individuals with high agent levels), are in agreement with other studies focusing on *A. astaci* infections in populations of crayfish of North American origin. These include especially *P. leniusculus*, screened for example in France (Grandjean et al., 2017), Great Britain (James et al., 2017), and together with *F. limosus* in Czechia (Kozubíková et al., 2009; Mojžišová et al., 2022). Studies focusing on a broader range of crayfish host species in the Netherlands (Tilmans et al., 2014) or Hungary (Mojžišová et al., 2024) also documented a broad range of variation in *A. astaci* prevalence, both within and between species.

Relevant prevalence data from Europe for *P. clarkii* are scarce, as only limited number of populations was studied by a comparable methodology (i.e., using a sensitive qPCR-based detection) and with a sufficient number of individuals per site. From those studies, very variable patterns emerge. In six Swiss populations studied by Sieber et al. (2022), *A. astaci* was only detected in two of them (three infected individuals with agent level A2 out of 87 tested). In three Dutch populations, only a single specimen out of 50 was infected (Tilmans et al., 2014), no infection was detected among 27 individuals tested by qPCR from one Italian population (Caprioli et al., 2018), and *A. astaci* was confirmed in only one site of more than 10 where *P. clarkii* was sampled in the environs of Budapest, Hungary (Mojžišová et al., 2024). In the last-mentioned Hungarian site, the pathogen prevalence was high (18 positive specimens out of 23 analysed) but the agent level in infected individuals did not exceed A3.

In several *P. clarkii* populations screened for *A. astaci* in Brazil (Peiró et al., 2016), however, the patterns of variation in prevalence were comparable with our study, and individual infection loads occasionally reached high (A5) to exceptionally high (A7) agent levels. *A. astaci* infection was also confirmed in several individuals from a single *P. clarkii* population studied in Costa Rica, but by a different methodology (Martín-Torrijos et al., 2021a). Quantitative PCR proved the presence of *A. astaci* in an outdoor aquaculture in Indonesia (Putra et al.,

2018), and all four *P. clarkii* populations studied in Japan (Mrugala et al., 2017), in both cases with agent levels not exceeding A3. In contrast, no individual analysed from a Kenyan lake Naivasha was infected (Mrugala et al., 2017).

Overall, these European and global prevalence data, together with methodologically different studies on infected *P. clarkii* from other countries (Aquiloni et al., 2011; Diéguez-Urbeondo et al., 1995; Martín-Torrijos et al., 2021a), including its native range (Martín-Torrijos et al., 2021b), confirm that *A. astaci* infections in this host are widespread both in its native and invaded ranges and may locally reach high prevalences. These results are consistent with genotyping of crayfish plague outbreaks in regions invaded by *P. clarkii*. Numerous mass mortality episodes in Spain (Martín-Torrijos et al., 2019) and central Italy (Caprioli et al., 2018) were caused by *A. astaci* genotype group D, typically associated with this host (Diéguez-Urbeondo et al., 1995). Crayfish plague outbreaks due to pathogen transfer from *P. clarkii* to native *Cambaroides japonicus* were also documented from Japan (Martín-Torrijos et al., 2018).

Sequencing of the two mitochondrial genes for ribosomal subunits showed that each of the few strongly infected *P. clarkii* specimens, for which pathogen genotyping was possible, carried the d1-haplotype of *A. astaci*. The same haplotype was also involved in numerous crayfish plague outbreaks in Spain (Martín-Torrijos et al., 2019), one in Germany (Makkonen et al., 2018) and another in Czechia (Mojžišová et al., 2020), as well as in one of the recently documented outbreaks in France (in Bayse de Pouquet, Pyrénées-Atlantiques region; Figure 3A). The common presence of d1-haplotype in Spain and in southwestern France is in agreement with shared mitochondrial haplotypes of red swamp crayfish between these two regions (Oficialdegui et al., 2019), supporting the hypothesis of *P. clarkii* introduction to western France from Spain.

Although *A. astaci* genotype group D from *P. clarkii*, as well as group E associated with *F. limosus* (Kozubíková et al., 2011), are occasionally involved in *A. pallipes* mass mortalities in France, our analysis showed group B genotypes as most prevalent in crayfish plague outbreaks in *A. pallipes* populations. This group, associated with signal crayfish *P. leniusculus*, has been also responsible for numerous mass mortalities across Europe, from Spain to Central Europe and Fennoscandia (reviewed in Ungureanu et al., 2020). This is not only because *P. leniusculus* is broadly distributed across the continent (Kouba et al., 2014) but also because it frequently shares habitats with native European crayfish, including the white-clawed crayfish *A. pallipes* in France (Bramard et al., 2006).

As *P. clarkii* continues to spread in France, its role as a reservoir of the crayfish plague pathogen and potential threat to white-clawed crayfish conservation may become more prominent than at present. Indeed, in Spain where *P. clarkii* was introduced earlier (Gherardi, 2006), *A. astaci* genotypes carried by this host were involved in more mass mortalities than those from signal crayfish (Martín-Torrijos et al., 2019). Furthermore, additional introductions of new non-native crayfish species that are being found in various European countries, such as *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 and *Faxonius rusticus* (Girard, 1852) in France (Grandjean et al., 2021; Laffitte et al., 2023) or *Procambarus alleni* (Faxon, 1884) in Hungary (Weiperth et al., 2020), might contribute to an increased diversity of *A. astaci* (Mojžišová et al., 2024) with as yet unclear impact on native crayfish. It is thus relevant not only to maintain the screening efforts and to evaluate the pathogen's diversity, but also to continue to develop new methods that would not only characterise the strain involved but also predict its virulence or other relevant characteristics.

CRedit authorship contribution statement

Maud Laffitte: Writing – original draft, Methodology, Formal analysis. **Michaela Mojžišová:** Writing – review & editing, Methodology, Formal analysis. **Carine Delaunay:** Writing – review & editing, Validation, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Marc Collas:**



Writing – review & editing, Resources. Adam Petrusek: Writing – original draft, Supervision, Conceptualization. Frederic Grandjean: Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank all the delegations of Office Français de la Biodiversité (OFB), fishing federations, and Théo Duperray of Saules et Eaux enterprise for providing samples. This work was funded by the French Office for Biodiversity, Région Nouvelle Aquitaine (France), Grand Poitiers Communauté urbaine (France), 2015–2020 State-Region Planning Contracts (CPER), European Regional Development Fund (FEDER), partnership arrangements in ecology and the environment (DIPEE) and intramural funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Poitiers.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108128>.

References

- Alderman, D.J., 1996. Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 15, 603–632. <https://doi.org/10.20506/rst.15.2.943>.
- Aquiloni, L., Martín, M.P., Gherardi, F., Diéguez-Urbeondo, J., 2011. The North American crayfish *Procambarus clarkii* is the carrier of the oomycete *Aphanomyces astaci* in Italy. Biol. Invasions 13, 359–367. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9828-2>.
- Becking, T., Kiselev, A., Rossi, V., Street-Jones, D., Grandjean, F., Gaulin, E., 2022. Pathogenicity of animal and plant parasitic *Aphanomyces* spp and their economic impact on aquaculture and agriculture. Fungal Biol. Rev. 40, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.08.001>.
- Bramard, M., Demers, A., Trouille, M.-C., Bachelier, E., Dumas, J.-C., Fournier, C., Broussard, E., Robin, O., Souty-Grosset, C., Grandjean, F., 2006. Distribution of indigenous and non-indigenous crayfish populations in the Poitou-Charentes region (France): evolution over the past 25 years. Bull. Fr. Pêche Piscic. 380–381, 857–866. <https://doi.org/10.1051/kmae/2006027>.
- Caprioli, R., Mrugala, A., Di Domenico, M., Curini, V., Giansante, C., Cammà, C., Petrusek, A., 2018. *Aphanomyces astaci* genotypes involved in recent crayfish plague outbreaks in central Italy. Dis. Aquat. Org. 130, 209–219. <https://doi.org/10.3354/dao03275>.
- Changeux, T., 2003. Evolution de la répartition des écrevisses en France métropolitaine selon les enquêtes nationales réalisées menées par le Conseil Supérieur de la Pêche de 1977 à 2001. Bull. Fr. Pêche Piscic. 370–371, 17–41. <https://doi.org/10.1051/kmae/2003002>.
- Chucholl, C., 2013. Invaders for sale: Trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. Biol. Invasions 15, 125–141. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0273-2>.
- Collas, M., Burgun, V., Grandjean, F., Poulet, N., Pénit, C., 2015. La situation des écrevisses en France – Résultats de l'enquête nationale 2014. Technical report. Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques, Vincennes, 32 pp.
- Collas, M., Julien, C., Monnier, D., 2007. Note technique – La situation des écrevisses en France résultats des enquêtes nationales réalisées entre 1977 et 2006 par le Conseil Supérieur de la Pêche. Bull. Fr. Pêche Piscic. 386, 1–38. <https://doi.org/10.1051/kmae/2007010>.
- Cuthbert, R.N., Pattison, Z., Taylor, N.G., Verbrugge, L., Diagne, C., Ahmed, D.A., Leroy, B., Angulo, E., Briski, E., Capinha, C., Catford, J.A., Dalu, T., Essl, F., Gozlan, R.E., Haubrock, P.J., Kourantidou, M., Kramer, A.M., Renault, D., Wasserman, R.J., Courchamp, F., 2021. Global economic costs of aquatic invasive alien species. Sci. Total Environ. 775, 145238. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145238>.
- Di Domenico, M., Curini, V., Caprioli, R., Giansante, C., Mrugala, A., Mojžisová, M., Cammà, C., Petrusek, A., 2021. Real-Time PCR assays for rapid identification of common *Aphanomyces astaci* genotypes. Front. Ecol. Evol. 9, 597585. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.597585>.
- Diéguez-Urbeondo, J., Huang, T.-S., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1995. Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. Mycol. Res. 99, 574–578. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80716-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80716-8).
- Diéguez-Urbeondo, J., Söderhäll, K., 1993. *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. Aquacult. Res. 24, 761–765. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1993.tb00655.x>.
- Dörr, A.J.M., Scalici, M., Caldaroni, B., Magara, G., Scoparo, M., Goretti, E., Elia, A.C., 2020. Salinity tolerance of the invasive red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). Hydrobiologia 847, 2065–2081. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04231-z>.
- Filipová, L., Petrusek, A., Matasová, K., Delaunay, C., Grandjean, F., 2013. Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in populations of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: Evaluating the threat to native crayfish. PLoS One 8, e70157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070157>.
- Gherardi, F., 2006. Crayfish invading Europe: The case study of *Procambarus clarkii*. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 39, 175–191. <https://doi.org/10.1080/10236240600869702>.
- Grandjean, F., Vrilstad, T., Diéguez-Urbeondo, J., Jelić, M., Mangombi, J., Delaunay, C., Filipová, L., Rezinciu, S., Kozubíková-Balcarová, E., Guyonnet, D., Viljamaa-Dirks, S., Petrusek, A., 2014. Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. Vet. Microbiol. 170, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.020>.
- Grandjean, F., Roques, J., Delaunay, C., Petrusek, A., Becking, T., Collas, M., 2017. Status of *Pacifastacus leniusculus* and its role in recent crayfish plague outbreaks in France: Improving distribution and crayfish plague infection patterns. Aquat. Invasions 12, 541–549. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.4.10>.
- Grandjean, F., Collas, M., Uriarte, M., Rousset, M., 2021. First record of a marbled crayfish *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) population in France. Bioinvasions Rec. 10, 341–347. <https://doi.org/10.3391/bir.2021.10.2.12>.
- Holdich, D.M., Reynolds, J.D., Souty-Grosset, C., Sibley, P.J., 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. Knowl. Manag. Aquatic Ecosyst. 394–395, 11. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009025>.
- Huang, T., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1994. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. Aquaculture 126, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90243-7).
- Hulme, P.E., 2009. Trade, transport and trouble: Managing invasive species pathways in an era of globalization. J. Appl. Ecol. 46, 10–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x>.
- James, J., Nutbeam-Tuffs, S., Cable, J., Mrugala, A., Vinuela-Rodriguez, N., Petrusek, A., Oidtmann, B., 2017. The prevalence of *Aphanomyces astaci* in invasive signal crayfish from the UK and implications for native crayfish conservation. Parasitology 144, 411–418. <https://doi.org/10.1017/S0033182016002419>.
- Koubas, A., Petrusek, A., Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. Knowl. Manag. Aquat. Ec. 413, 05. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014007>.
- Kozubíková, E., Filipová, L., Kozák, P., Duriš, Z., Martín, M.P., Diéguez-Urbeondo, J., Oidtmann, B., Petrusek, A., 2009. Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. Conserv. Biol. 23, 1204–1213. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01240.x>.
- Kozubíková, E., Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Petrusek, A., 2011. Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. J. Invertebr. Pathol. 108, 214–216. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.002>.
- Kozubíková-Balcarová, E., Beran, L., Duriš, Z., Fischer, D., Horká, I., Svobodová, J., Petrusek, A., 2014. Status and recovery of indigenous crayfish populations after recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. Ethol. Ecol. Evol. 26, 299–319. <https://doi.org/10.1080/03949370.2014.897652>.
- Laffitte, M., Baudry, T., Guilmet, M., Andrieu, T., Poulet, N., Duperray, T., Carine, D., Collas, M., Moumen, B., Sudres, M., Grandjean, F., 2023. A new invader in freshwater ecosystems in France: The rusty crayfish *Faxonius rusticus*. Bioinvasions Rec. 12, 457–468. <https://doi.org/10.3391/bir.2023.12.2.10>.
- Makkonen, J., Jussila, J., Panteleit, J., Keller, N.S., Schrimpf, A., Theissinger, K., Kortet, R., Martín-Torrijos, L., Sandoval-Sierra, J.V., Diéguez-Urbeondo, J., Kokko, H., 2018. Mitochondrial DNA allows the sensitive detection and haplotyping of the crayfish plague disease agent *Aphanomyces astaci* showing clues about its origin and migration. Parasitology 145, 1210–1218. <https://doi.org/10.1017/S0033182018000227>.
- Martín-Torrijos, L., Kawai, T., Makkonen, J., Jussila, J., Kokko, H., Diéguez-Urbeondo, J., 2018. Crayfish plague in Japan: A real threat to the endemic *Cambaroides japonicus*. PLoS One 13, e0195353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195353>.
- Martín-Torrijos, L., Kokko, H., Makkonen, J., Jussila, J., Diéguez-Urbeondo, J., 2019. Mapping 15 years of crayfish plague in the Iberian Peninsula: The impact of two invasive species on the endangered native crayfish. PLoS One 14, e0219223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219223>.
- Martín-Torrijos, L., Correa-Villalona, A.J., Pradillo, A., Diéguez-Urbeondo, J., 2021a. Coexistence of two invasive species, *Procambarus clarkii* and *Aphanomyces astaci*, in brackish waters of a Mediterranean coastal lagoon. Front. Ecol. Evol. 8, 622434. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.622434>.
- Martín-Torrijos, L., Martínez-Ríos, M., Casabella-Herrero, G., Adams, S.B., Jackson, C.R., Diéguez-Urbeondo, J., 2021b. Tracing the origin of the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, to the Southeastern United States. Sci. Rep. 11, 9332. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88704-8>.
- Minardi, D., Studholme, D.J., van der Gezen, M., Pretto, T., Oidtmann, B., 2018. New genotyping method for the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on whole genome data. J. Invertebr. Pathol. 156, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.06.002>.



- Mojžišová, M., Mrugala, A., Kozubíková-Balcarová, E., Vlach, P., Svobodová, J., Kouba, A., Petrusek, A., 2020. Crayfish plague in Czechia: Outbreaks from novel sources and testing for chronic infections. *J. Invertebr. Pathol.* 173, 107390 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107390>.
- Mojžišová, M., Svobodová, J., Kozubíková-Balcarová, E., Struncová, E., Stif, R., Bílý, M., Kouba, A., Petrusek, A., 2022. Long-term changes in the prevalence of the crayfish plague pathogen and its genotyping in invasive crayfish species in Czechia. *NeoBiota* 74, 105–127. <https://doi.org/10.3897/neoBiota.74.79087>.
- Mojžišová, M., Weiperth, A., Gebauer, R., Laffitte, M., Patoka, J., Grandjean, F., Kouba, A., Petrusek, A., 2024. Diversity and distribution of *Aphanomyces astaci* in a European hotspot of ornamental crayfish introductions. *J. Invertebr. Pathol.* 202, 108040 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108040>.
- Mrugala, A., Kawai, T., Kozubíková-Balcarová, E., Petrusek, A., 2017. *Aphanomyces astaci* presence in Japan: a threat to the endemic and endangered crayfish species *Cambaroides japonicus*? *Aquat. Conserv.* 27, 103–114. <https://doi.org/10.1002/aqc.2674>.
- Nota, A., Santovito, A., Gattelli, R., Tiralongo, F., 2024. From fresh to salt waters: First reports of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in Mediterranean marine waters. *Hydrobiology* 3, 1–10. <https://doi.org/10.3390/hydrobiology3010001>.
- Oficialdegui, F.J., Clavero, M., Sánchez, M.J., Green, A.J., Boyero, L., Michot, T.C., Klöse, K., Kawai, T., Lejeune, C., 2019. Unravelling the global invasion routes of a worldwide invader, the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Freshw. Biol.* 64, 1382–1400. <https://doi.org/10.1111/fwb.13312>.
- Oidtman, B., Geiger, S., Steinbauer, P., Culas, A., Hoffmann, R., 2006. Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.* 72, 53–64. <https://doi.org/10.3354/dao072053>.
- Patoka, J., Kalous, L., Kopecný, O., 2015. Imports of ornamental crayfish: the first decade from the Czech Republic's perspective. *Knowl. Manag. Aquatic Ecosyst.* 416, 04. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014040>.
- Peiró, D., Almerio, M., Delaunay, C., Jussila, J., Makkonen, J., Bouchon, D., Araujo, P., Souty-Grosset, C., 2016. First detection of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in South America: a high potential risk to native crayfish. *Hydrobiologia* 781, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2841-4>.
- Putra, M.D., Bláha, M., Wardiatno, Y., Krisanti, M., Yonviter, Jerikho, R., Kamal, M.M., Mojžišová, M., Bystrický, P.K., Kouba, A., Kalous, L., Petrusek, A., Patoka, J., 2018. *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) and crayfish plague as new threats for biodiversity in Indonesia. *Aquat. Conserv.* 28, 1434–1440. doi:10.1002/aqc.2970.
- Sieber, N., Hartikainen, H., Krieg, R., Zenker, A., Vorburger, C., 2022. Parasite DNA detection in water samples enhances crayfish plague monitoring in asymptomatic invasive populations. *Biol. Invasions* 24, 281–297. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02644-y>.
- Souty-Grosset, C., Anastácio, P.M., Aquiloni, L., Banha, F., Choquer, J., Chucholl, C., Tricarico, E., 2016. The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: Impacts on aquatic ecosystems and human well-being. *Limnologia* 58, 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2016.03.003>.
- Stevenson, M., Sergeant, E., 2024. epiR: Tools for the analysis of epidemiological data. R Package Version 2.0.74. <https://CRAN.R-project.org/package=epiR>.
- Strand, D.A., Jinnerot, T., Aspán, A., Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Rolén, E., Vrålstad, T., 2023. Molecular detection of *Aphanomyces astaci* – An improved species specific qPCR assay. *J. Invertebr. Pathol.* 201, 108008 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108008>.
- Svoboda, J., Mrugala, A., Kozubíková-Balcarová, E., Petrusek, A., 2017. Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *J. Fish Dis.* 40, 127–140. <https://doi.org/10.1111/jfd.12472>.
- Tilmans, M., Mrugala, A., Svoboda, J., Engelsma, M.Y., Petie, M., Soes, D.M., Nutbeam-Tuffs, S., Oidtman, B., Roessink, L., Petrusek, A., 2014. Survey of the crayfish plague pathogen presence in the Netherlands reveals a new *Aphanomyces astaci* carrier. *J. Invertebr. Pathol.* 120, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.06.002>.
- Ungureanu, E., Mojžišová, M., Tangerman, M., Ion, M.C., Parvulescu, L., Petrusek, A., 2020. The spatial distribution of *Aphanomyces astaci* genotypes across Europe: Introducing the first data from Ukraine. *Freshw. Crayfish* 25, 77–87. <https://doi.org/10.5869/fc.2020.v25-1.077>.
- Vesely, L., Burić, M., Kouba, A., 2015. Hardy exotics species in temperate zone: can "warm water" crayfish invaders establish regardless of low temperatures? *Sci. Rep.* 5, 16340. <https://doi.org/10.1038/srep16340>.
- Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., 2019. A tentative new species *Aphanomyces fennicus* sp. nov. interferes with molecular diagnostic methods for crayfish plague. *J. Fish Dis.* 42, 413–422. <https://doi.org/10.1111/jfd.12955>.
- Vrålstad, T., Knutsen, A.K., Tengs, T., Holst-Jensen, A., 2009. A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.* 137, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.022>.
- Weiperth, A., Gál, B., Kuríková, P., Langrová, I., Kouba, A., Patoka, J., 2019. Risk assessment of pet-traded decapod crustaceans in Hungary with evidence of *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) in the wild. *North-West. J. Zool.* 15, e171303.
- Weiperth, A., Bláha, M., Szajbert, B., Seprős, R., Bányai, Z., Patoka, J., Kouba, A., 2020. Hungary: A European hotspot of non-native crayfish biodiversity. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 421, 43. <https://doi.org/10.1051/kmae/2020035>.

*Les annexes supplémentaires de l'article "Prevalence of the crayfish plague pathogen in red swamp crayfish populations in western France: How serious is the risk for the native white-clawed crayfish" sont en ANNEXE 1



b) Évolution des taux de prévalences d'*Aphanomyces astaci* dans les populations d'écrevisse signal, *Pacifastacus leniusculus*

Introduite au cours du 20^{em} siècle, l'écrevisse signal *P. leniusculus* constitue à ce jour, la plus grande menace pour les espèces autochtones (Grandjean et al., 2017). Elle est actuellement référencée dans 73 des 96 départements français avec un nombre d'occurrences de plus en plus important (Collas et al., 2015). En Europe, de nombreuses études se sont intéressées aux taux de prévalences d' *A. astaci* au sein des populations de cette espèce vivant parfois en sympatrie avec les espèces locales, afin d'évaluer le risque qu'elles représentent en tant que réservoir et leur rôle en tant que vecteur de la maladie (Filipová et al., 2013; James et al., 2017; Matasová et al., 2011; Mojžišová et al., 2020). Ces études ont porté sur l'analyse des prévalences à un temps, mais leur évolution dans le temps a rarement été abordée. En France, deux précédentes études ont permis d'évaluer la prévalence de ce pathogène dans les populations de *P. leniusculus* (Filipová et al., 2013; Grandjean et al., 2017) lors d'échantillonnages conduits entre 2009 et 2014. En 2022, nous avons échantillonné 9 populations incluses dans les études précédentes afin de suivre l'évolution de ces prévalences dans le temps.

Matériel et Méthode

L'ensemble des individus échantillonnés ont été prélevés par l'Office français de la Biodiversité (OFB). Cent quarante-six individus appartenant à l'espèce *Pacifastacus leniusculus* ont été prélevés à la main sous les pierres ou par nasses appâtées. Ces individus proviennent de 9 populations précédemment échantillonnées dans les régions Grand-Est, Auvergne-Rhône-Alpes et Bourgogne-Franche-Comté en 2010 et 2011 (Filipová et al., 2013; Grandjean, 2017) (Tableau 4).

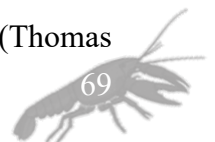
Les écrevisses capturées ont été conservées dans de l'éthanol à 96%. La dissection des spécimens, l'extraction d'ADN et la QPCR basée sur la méthode de Vrålstad et al., 2009 est détaillée dans l'article précédent (Laffitte et al., 2024). La prévalence d'*A. astaci* dans les populations étudiées a été estimée grâce à un intervalle de confiance à 95 %, calculé à l'aide de la fonction « epi.conf » du package epiR avec Rstudio (Filipová et al., 2013 ; Mojžišová et al., 2022 ; Laffitte et al., 2024). La différence statistique entre les prévalences passées et actuelles observées a été estimée avec un intervalle de confiance à 95%, en utilisant le test exact de Fisher « fisher.test » (Mojžišová et al., 2022).



Résultats et Discussion :

Le pathogène *A. astaci* a été détecté dans 5 des 9 populations de *P. leniusculus*, ce qui représente 55% des populations testées. Ce résultat concorde avec les prévalences reportées par Filipova et al., 2013 et Grandjean et al., 2017. Des taux similaires sont également décrits chez d'autres espèces nord-américaines, comme *F. limosus* ou *P. clarkii* (Kozubíková et al., 2009; Laffitte et al., 2024). Parmi les 146 écrevisses testées, 14 (soit environ 9,6% des individus analysés) ont été détectés comme positifs à l'infection par *A. astaci*. Les taux d'infection individuels sont compris entre les niveaux A2 et A4 et la majorité des individus présentent un faible niveau d'infection (A2). Cependant, une population testée a révélé des niveaux d'infection plus importants A3 et A4 provenant du ruisseau La Senouire (no. site 3). L'ensemble des résultats sont répertoriés dans la Tableau 4 ci-dessous. Parmi les populations rééchantillonnées entre 2010 et 2022, certaines prévalences détectées semblent être relativement stables. Tout d'abord, les populations de la rivière La Meurthe et du ruisseau de la Franouse (no. site 7 et 9) qui n'étaient pas infectées semblent toujours négatives. L'absence de détection pourrait cependant être liée à la sensibilité de la méthode. En effet, de faibles seuils d'infection ne permettent pas une détection efficiente par qPCR avec la méthode actuelle (Vrålstad et al., 2009). De plus, pour ces deux populations, le nombre d'individus analysés à chaque échantillonnage était faible (entre 9 et 14), alors que, selon Schrimpf et al. (2013), un minimum de 100 spécimens devrait être testé pour pouvoir conclure à l'absence d'infection. Également, nous n'avons pas reporté d'évolution pour la population de la rivière La Cère (no. Site 4) qui reste infecté entre septembre 2010 et 2022.

Ensuite, nous avons également observé certaines tendances de variations des prévalences au sein des autres populations testées bien qu'une seule soit réellement significative d'après le test exact de Fisher. Nos résultats semblent indiquer que la prévalence de *A. astaci* a significativement baissé de 67% à 5% dans la population de la rivière Le Chalaux. Cependant, ces résultats peuvent être questionnés, car seuls 3 spécimens ont été testés dans la première étude contre 20 en 2022. Chez les espèces envahissantes, les infections peuvent altérer leurs comportements, les rendant plus vulnérables à la capture. Une étude en condition contrôlée a démontré que les spécimens adultes de *P. leniusculus* qui présentaient des niveaux d'infection élevés avaient des comportements altérés. Les individus étaient moins susceptibles de quitter l'eau, d'explorer les zones terrestres et de montrer des réponses d'évasion (Thomas et al., 2020). Ces changements comportementaux peuvent être dus au stress physiologique causé par l'infection, qui affaiblit les écrevisses et modifie leurs réponses habituelles à la fuite (Thomas



et al., 2020). Cela suggère que le comportement des écrevisses infectées lors des campagnes d'échantillonnages pourrait introduire un biais en augmentant la probabilité de capturer des individus malades ou affaiblis, influençant ainsi les estimations de population.

Tableau 4: Prévalence d'*A. astaci* dans populations de *P. leniusculus*. Les populations de 1 à 9 sont des populations rééchantillonnées. La prévalence, l'intervalle de confiance et les niveaux d'infection sont reportés pour chaque population. La p-value du test exact de Fisher réalisé afin de tester la différence entre les prévalences passées et actuelles est indiquée dans la colonne Fisher's test.

No. Site	Localité	Département	Bassin versant	Coordonnées	Date d'ech.	Nbre d'infectés analysés	Prév.	IC (95%)	Niveau d'infection	Fisher's test	Références
1	Rivière Le Chalaux, Ouroux-en-morvan	58	Seine	47°10'48"N 3°55'48"E	- oct.-21	2/3 1/20	67,0% 5,0%	(9-99%) (0-25%)	A0(1), A2(2) A0(19), A2(1)	0,03444	(Grandjean et al., 2017)
2	Rivière Le Garat, Saint-Léger-de-Fougeret	58	Loire	47°1'12"N 3°52'47.999"E	- oct.-21	0/15 2/20	0,0% 10,0%	(0-30%) (1-32%)	A0(15) A0(18), A2(2)	0,5045	(Grandjean et al., 2017)
3	Ruisseau La Senouire, Saint-Pal-de-Senouire	43	Loire	45°15'N 3°39'E	juil.-10 mai-22	0/5 7/20	0,0% 35,0%	(0-64%) (15-59%)	A0(5) A0(13), A2(5), A3(1), A4(1)	0,5603	(Filipová et al., 2013) (Grandjean et al., 2017)
4	Rivière La Cère, Sansac-de-Marmiesse	15	Dordogne	44°53', 2°22'E	sept.-10 sept.-22	2/10 3/20	20,0% 15,0%	(3-56%) (3-38%)	A0(8), A2(2) A0(17), A2(3)	1	(Filipová et al., 2013) (Grandjean et al., 2017)
5	Ruisseau La Saône, Vioménil	88	Rhône	48°5'N 6°10'E	août-09 mars-22	0/5 1/15	0,0% 6,7%	(0-64%) (0-32%)	A0(5) A0(14), A2(1)	1	(Filipová et al., 2013) (Grandjean et al., 2017)
6	Etang Prairie du Vouau, Saint-Nabord	88	Rhin	48°03'N 6°36'E	août-09 août-22	1/5 0/12	20,0% 0,0%	(1-72%) (0-26%)	A0(4), A2(1) A0(12)	0,3333	(Filipová et al., 2013) (Grandjean et al., 2017)
7	Rivière La Meurthe, Saint-Michel-sur-Meurthe	88	Rhin	48°19'N 6°55'E	août-09 sept.-22	0/12 0/14	0,0% 0,0%	(0-36%) (0-23%)	A0(12) A0(14)	1	(Filipová et al., 2013) (Grandjean et al., 2017)
8	Ruisseau des Noires Faignes, Aneuménil	88	Rhin	48°06'N 6°32'E	août-09 nov.-21	5/15 0/15	33,0% 0,0%	(12-62%) (0-22%)	A2(2), A3(3) A0(15)	0,05701	(Filipová et al., 2013) (Grandjean et al., 2017)
9	Ruisseau de la Franouse, Clerjus	88	Rhône	47°58'12"N 6°22'47.99"E	- sept.-22	0/9 0/10	0,0% 0,0%	(0-45%) (0-31%)	A0(9) A0(10)	1	(Grandjean et al., 2017)



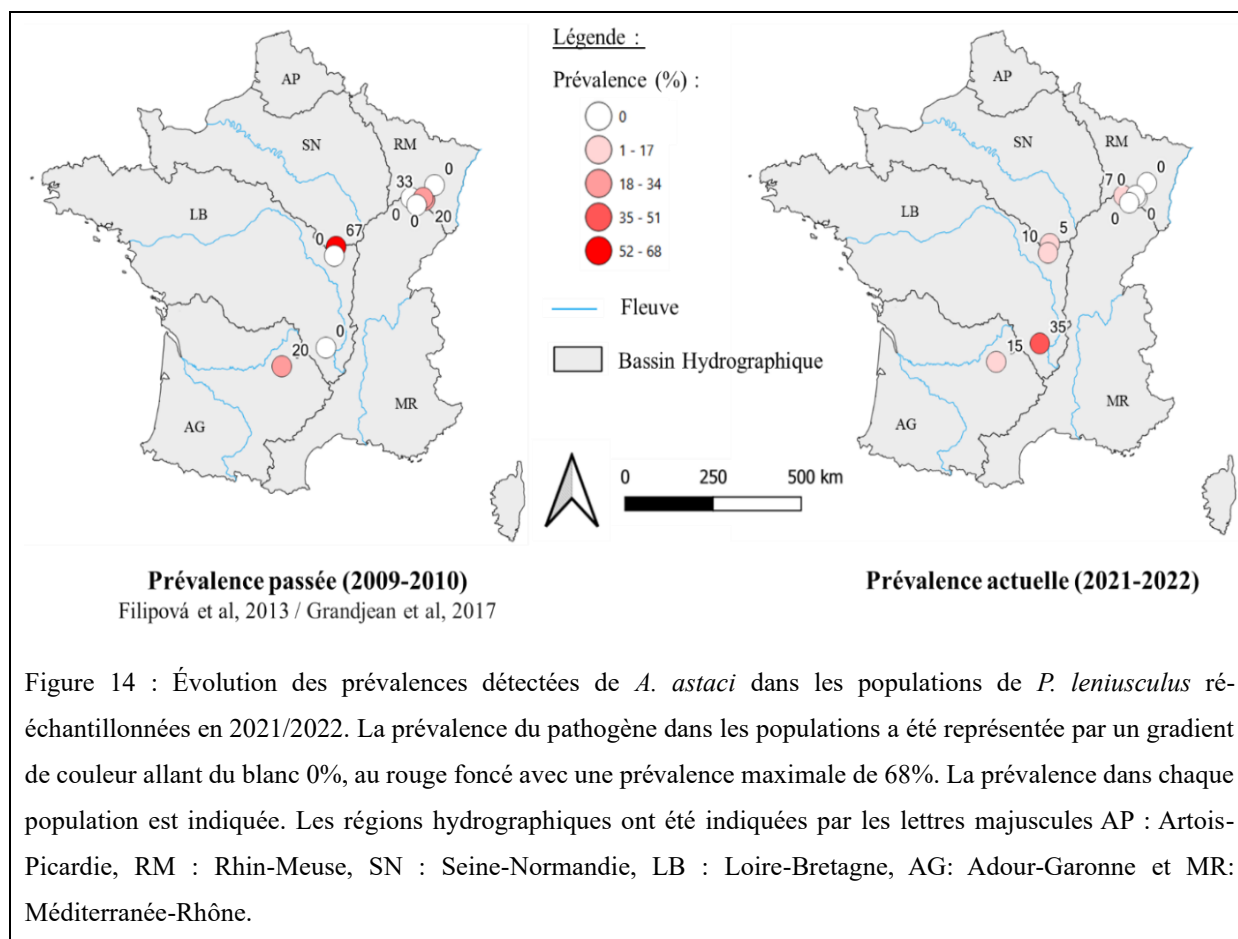
Nos résultats suggèrent également que certaines populations initialement détectées comme négatives à la peste des écrevisses lors des premières analyses se révèlent positives lors des rééchantillonnages. Les populations de la rivière le Garat, du ruisseau la Senouire et du ruisseau de la Saône (no. site 2, 3 et 5) qui ne semblaient pas être infectées en 2010, sont détectées positives en 2022 avec des prévalences allant de 6.7% à 35%. La Senouire présente des spécimens aux niveaux d'infections élevés A3 et A4. L'absence de détection du pathogène en 2010 pourrait être liée à un biais d'échantillonnage, car peu d'individus (5) avaient pu être testés (Schrumpf et al., 2013).

L'augmentation de la densité d'une population pourrait également être à l'origine d'une augmentation de la prévalence. En effet, une population d'écrevisse plus dense limite les conditions d'accès à des ressources, ce qui favorise des contacts plus fréquents entre congénères. Ces contacts répétés peuvent faciliter la transmission de pathogènes et également expliquer les niveaux d'infection élevés. Ainsi, des conditions agonistiques et environnementales stressantes pourraient être à l'origine de l'augmentation de la prévalence et des forts taux d'infection dans la population de la Senouire (Schrumpf et al., 2013). Une autre possibilité pour expliquer la présence nouvelle du pathogène pourrait être liée à la pratique d'alevinage en poisson ou bien du transfert de poissons d'étangs situés en amont. Lorsque le stock de poisson vit en présence d'individus de *P. leniusculus* infectés, les poissons transportés avec l'eau du site d'origine peuvent importer l'agent pathogène dans de nouveaux sites. Le pathogène peut également être transporté par d'autres espèces d'écrevisses envahissantes, puisque les transferts interspécifiques sont possibles (voir chapitre 2).

A contrario, les populations de l'étang du Vouau et du ruisseau des Noires Faigues (no. site 6 et 8) étaient infectées avec des prévalences allant de 20% à 33% auparavant, mais ne montrent plus de signe de présence d'*A. astaci* (Tableau 4, Figure 14). Entre 2004 et 2010, Matasová et al. (2011) ont suivi 3 populations de *Faxonius limosus* infectées à différents niveaux (fort, moyen et bas). Les auteurs ont montré une absence de variation dans le temps de la prévalence du pathogène issue des populations fortement ou très faiblement infestées. Toutefois, ils ont observé une décroissance significative à long terme liée à la saisonnalité, dans les populations moyennement infectées (Matasová et al., 2011). Cette décroissance pourrait être liée à une diminution de la densité de population au cours des années d'étude et/ou à la temporalité de l'échantillonnage. En effet, lorsqu'une écrevisse infectée mue, elle perd sa cuticule dans laquelle est présente *A. astaci*. L'écrevisse est alors beaucoup moins, voire plus infectée, ce qui ne permet pas la détection efficace avec la méthode d'analyse couramment utilisée (Vrålstad et al., 2009). Ainsi, l'oomycète mettra un certain temps avant de recoloniser

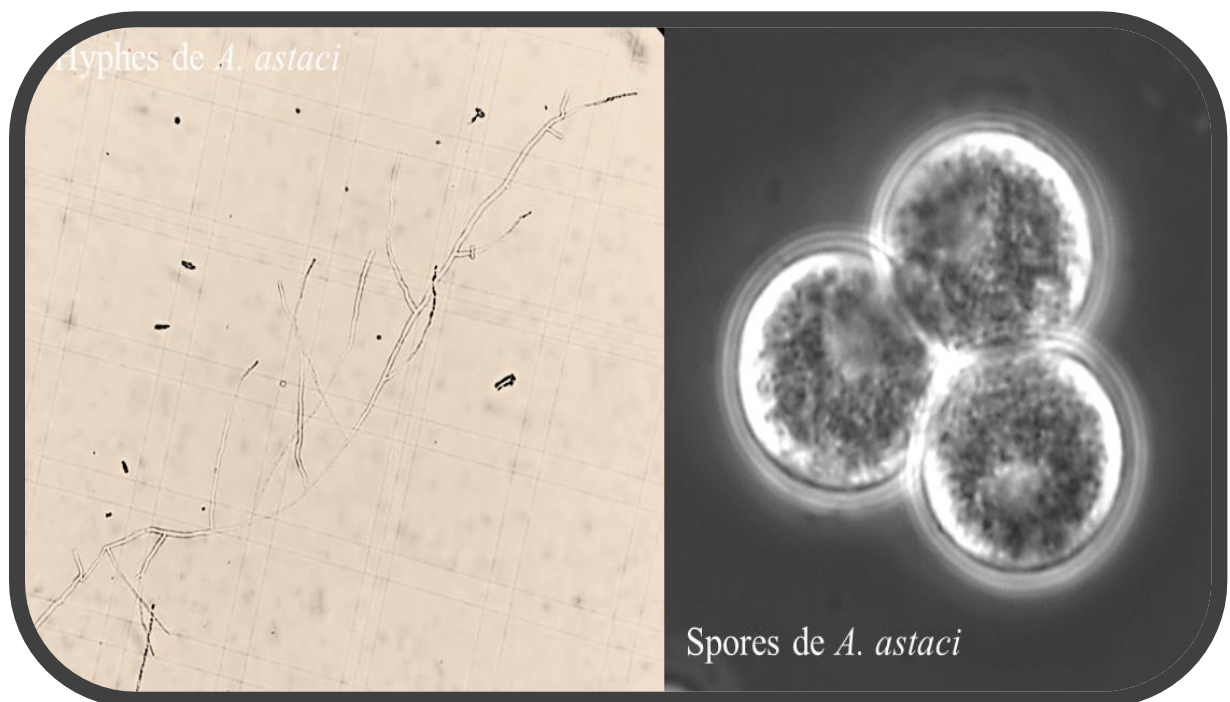


la cuticule de son hôte. Plus récemment (Mojžišová et al. (2022) ont également démontré la relative stabilité des taux d'infestation chez *F. limosus* en République tchèque à partir d'un suivi de 20 populations sur une période de 10 à 16 ans. Pour conclure, la prévalence de *A. astaci* dans les populations envahissantes réservoirs semble être impacté par les caractéristiques intrinsèques (fréquence de mues, cycle de vie ...), mais aussi la densité des populations qui influence les comportements des individus (Matasová et al., 2011; Mojžišová et al., 2022). De plus, des facteurs abiotiques (la saisonnalité, la température, la pollution ...) sont à l'origine de stress pour les animaux présents dans un écosystème. Chez les écrevisses américaines, ce stress peut affaiblir l'hôte, ce qui favorise la croissance du pathogène et pourrait expliquer la détection de niveaux élevés d'infection chez des organismes tolérants.



Chapitre 3 :

Transferts interspécifiques d'*Aphanomyces astaci* entre
espèces cooccurrentes



Contexte :

L'augmentation du commerce d'animaux ornementaux est devenue l'une des principales voies d'introduction d'espèces envahissantes et de leurs pathogènes, relâchées en zones urbaines ou naturelles (Grandjean et al., 2021; Laffitte et al., 2023, 2024; Mojžišová et al., 2024). L'introduction de nouvelles espèces d'écrevisses s'accompagne généralement de la translocation d'*A. astaci*. Depuis plusieurs décennies, des analyses phylogénétiques ont été réalisées pour mieux décrire et comprendre la relation entre *A. astaci* et ses hôtes nord-américains. Ainsi, l'amplification aléatoire de la réaction en chaîne polymorphe ADN-polymérase (PCR-RAPD) a été la première technique moléculaire ayant permis la description de la diversité génétique d'*A. astaci* uniquement utilisable à partir de cultures pures du pathogène. Cinq groupes génétiques distincts ont ainsi pu être caractérisés. Le groupe A, a été isolé à partir de spécimens de l'écrevisse indigène européenne *A. astacus* et, est probablement lié à la première introduction d'*A. astaci* en Europe au cours du 19^e siècle (Huang et al., 1994). Le groupe B a été isolé de l'écrevisse signal *P. leniusculus* (Huang et al., 1994) et semble être jusqu'à présent responsable de nombreuses épidémies chez des espèces indigènes européennes (Grandjean et al. 2017, Laffitte et al. 2024). Le groupe C a également été isolé de spécimens suédois de *P. leniusculus* (originaires du Canada) (Huang et al., 1994). Le groupe D, a été isolé de l'écrevisse rouge des marais *P. clarkii* (Diéguez-Urbeondo et al., 1995), tandis que le groupe E a été isolé de l'écrevisse américaine *F. limosus* (Kozubíková et al., 2011). Au cours des dix dernières années, le nombre de méthodes de génotypage permettant de caractériser *A. astaci* à partir d'échantillons environnementaux n'a cessé d'augmenter, permettant l'identification des souches impliquées dans les épidémies et d'évaluer leurs diversités génétiques en s'affranchissant de la culture du pathogène. Ainsi l'application de ces marqueurs directement à partir de tissus d'individus, a augmenté de façon considérable les études épidémiologiques et a permis d'obtenir des corrélations fortes entre présence d'écrevisses invasives et souches associées dans les mortalités massives de populations d'écrevisses autochtones. Parmi ces nombreux marqueurs, les plus utilisés pour caractériser les souches pathogènes responsables des épidémies utilisent des approches de génotypage de microsatellites (Grandjean et al., 2014) et de séquençage de gènes mitochondriaux (Makkonen et al., 2018) (Voir chapitre IV). Le développement de ces outils moléculaires permet donc de mettre en évidence des transferts interspécifiques de souches. Ce chapitre s'intéressera donc aux transmissions interspécifiques de souches d'*A. astaci* entre différentes espèces d'écrevisses nord-américaines vivant en sympatrie. La première étude porte sur la distribution de *A. astaci* dans 18 sites à Budapest dans



laquelle 5 espèces d'écrevisses nord-américaines sont présentes, et vivent parfois en sympatrie. Elle a permis de mettre en avant une combinaison inhabituelle de génotypes qui pourrait résulter de transferts interspécifiques du pathogène. La deuxième étude fait état du transfert de souche d'*A. astaci* entre deux espèces cooccurrentes, *F. rusticus* et *P. leniusculus* dans un cours d'eau affluent de l'Aveyron près de Rodez en France.

- a) Diversité et distribution de *Aphanomyces astaci* dans un point chaud européen d'introduction d'écrevisses ornementales

Diversity and distribution of *Aphanomyces astaci* in a European hotspot of ornamental crayfish introductions

Michaela Mojžišová, András Weiperth, Radek Gebauer, Maud Laffitte, Jiří Patoka, Frédéric Grandjean, Antonín Kouba, Adam Petrusek

Article publié dans *Journal of Invertebrate Pathology*

Contexte :

- Le commerce d'ornement a favorisé l'introduction d'espèces aquatiques non indigènes, notamment les écrevisses en Europe
- Budapest, en Hongrie, est devenu un lieu majeur pour les introductions et l'installation d'écrevisses d'aquarium
- Les conditions locales (eaux thermales) facilitent l'établissement et la propagation des espèces introduites et de leurs pathogènes associés

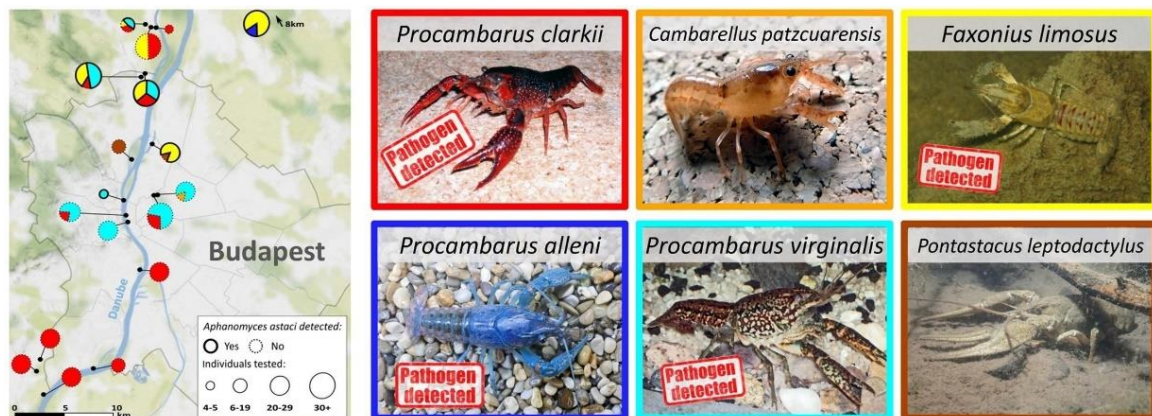
Résultats :

- Six espèces d'écrevisses ont été échantillonnées dans 18 sites autour de Budapest, dont cinq *Cambaridae* (*C. patzcuarensis*, *F. limosus*, *P. alleni*, *P. clarkii*, *P. virginalis*) et une espèce indigène (*P. leptodactylus*)
- L'agent pathogène a été confirmé dans cinq des sites échantillonnés et chez quatre espèces hôtes : *P. virginalis*, *P. clarkii*, *F. limosus*, et pour la première fois à l'état naturel en Europe chez *P. alleni*
- Le génotypage a révélé des associations inhabituelles de génotypes de *A. astaci* avec des écrevisses hôtes, indiquant une transmission interspécifique
- Dans un site envahi (le ruisseau Barát), un changement de génotype dominant de *A. astaci* a été observé entre 2018 et 2020

Conclusion :

- L'introduction continue d'espèces exotiques et la propagation de *A. astaci* menacent la biodiversité et les écosystèmes locaux.
- Les associations imprévisibles de génotypes de *A. astaci* et d'espèces hôtes rendent difficile la traçabilité des sources d'infection lors de mortalités massives d'écrevisses
- Les fluctuations saisonnières et les changements de prévalence des souches de *A. astaci* compliquent la gestion de l'infection.

Résumé graphique :





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

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

Diversity and distribution of *Aphanomyces astaci* in a European hotspot of ornamental crayfish introductions

Michaela Mojžišová^a, András Weiperth^b, Radek Gebauer^c, Maud Laffitte^d, Jiří Patoka^e,
Frédéric Grandjean^d, Antonín Kouba^c, Adam Petrusek^{a,*}

^a Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, Prague 2, CZ-12800, Czechia

^b Department of Freshwater Fish Ecology, Institute of Aquaculture and Environmental Safety, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Páter Károly utca 1, Gödöllő, HU-2100, Hungary

^c Faculty of Fisheries and Protection of Waters, CENAKVA, University of South Bohemia in České Budějovice, Zátisí 728/II, Vodňany, CZ-38925, Czechia

^d Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, Université de Poitiers, 3 rue Jacques Fort, TSA 51106, Poitiers Cedex, FR-86073, France

^e Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiological Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, Prague – Suchbát, CZ-16500, Czechia

ARTICLE INFO

Keywords:

Crayfish plague
Interspecific transmission
Invasive crayfish
Genotyping
Aquarium animals
Ornamental species

ABSTRACT

Ornamental trade has become an important introduction pathway of non-native aquatic species worldwide. Correspondingly, there has been an alarming increase in the number of established crayfish of aquarium origin in Europe over the previous decade. The oomycete *Aphanomyces astaci*, the pathogen causing crayfish plague responsible for serious declines of European crayfish populations, is dispersed with introduced North American crayfish. The role of ornamental taxa in introducing and spreading different genotypes of this pathogen in open waters remains unclear. We investigated the distribution, prevalence, and diversity of *A. astaci* in Budapest, Hungary, which became a hotspot of aquarium crayfish introductions. Their establishment in this area was facilitated by locally abundant thermal waters. We screened for *A. astaci* in six host taxa from 18 sites sampled between 2018 and 2021: five cambarids (*Cambarellus patzcuarensis*, *Faxonius limosus*, *Procambarus allenii*, *P. clarkii*, *P. virginalis*) and one native astacid (*Pontastacus leptodactylus*). The pathogen was confirmed at five sampled sites in four host taxa: *P. virginalis*, *P. clarkii*, *F. limosus*, and for the first time in European open waters also in *P. allenii*. Genotyping was successful only in individuals from two different brooks where multiple host species coexisted but revealed unexpected patterns. Mitochondrial B-haplogroup of *A. astaci*, previously usually reported from *Pacifastacus leniusculus* or infected European species, was detected in *P. virginalis* at both sites, and in both *F. limosus* and *P. virginalis* sampled from a thermally stable tributary of Barát brook in 2018. In contrast, A-haplogroup of *A. astaci* was detected in coexisting *F. limosus*, *P. virginalis* and *P. clarkii* sampled in the same watercourse just a few hundred meters downstream in 2020. Additional genotyping methods indicated that a previously unknown *A. astaci* strain was associated with the latter haplogroup. One *P. virginalis* individual from 2020 was apparently co-infected by strains representing both mitochondrial haplogroups. The results indicated multiple sources of *A. astaci* in Budapest, likely directly associated with the introduction of ornamental species, interspecific transmission of this pathogen among ornamental hosts, and potential for a quick spatial or temporal turnover of dominant *A. astaci* strains at a certain locality. This highlights that in regions with high richness of potential *A. astaci* hosts, host taxon/pathogen genotype combinations become unpredictable, which might prevent reliable genotyping of pathogen sources in local crayfish mass mortalities.

* Corresponding author at: Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, Prague 2, CZ-12800, Czechia.

E-mail addresses: michaela.mojzisova@natur.cuni.cz (M. Mojžišová), weiperth@gmail.com (A. Weiperth), rgebauer@frov.jcu.cz (R. Gebauer), maud.laffitte@univ-poitiers.fr (M. Laffitte), patoka@af.czu.cz (J. Patoka), frederic.grandjean@univ-poitiers.fr (F. Grandjean), akouba@frov.jcu.cz (A. Kouba), petrusek@natur.cuni.cz (A. Petrusek).

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108040>

Received 3 September 2023; Received in revised form 28 November 2023; Accepted 7 December 2023

Available online 10 December 2023

0022-2011/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.



1. Introduction

The ornamental trade has become one of the main introduction pathways of non-native aquatic species worldwide (Olden et al., 2021), spreading not only the ornamental species themselves but also associated “hitchhikers” including pathogens, commensals or contaminant species (Patoka et al., 2016; Duggan et al., 2018; Ložek et al., 2021). The ornamental animals, along with their parasites, may be introduced into the wild unintentionally, such as when escaping from garden ponds (Patoka et al., 2015, 2017), or they are deliberately released by their owners (Hulme et al., 2008). Such releases are motivated by various reasons, including a desire to improve the pet welfare, disposal of large or aggressive specimens, surplus individuals of species with high reproductive rates, or species whose keeping is officially prohibited (Padilla and Williams, 2004; Gertzen et al., 2008; Patoka et al., 2018). Most traded ornamental aquarium species are of tropical origin (Raghavan et al., 2013; Evers et al., 2019; Novák et al., 2020) and would not survive in temperate waters, such as those of Central Europe. However, warm-water habitats, such as natural and man-made thermal or industrial cooling waters, may provide refuge in temperate zones (Weiperth et al., 2020a; Emde et al., 2016; Haraszthy, 2022), attracting the owners to release their pets there. As a result, these habitats are under greater propagule pressure, facilitating the establishment of introduced animals and making such sites ‘hotspots’ for exotic species (Duggan et al., 2006; Emde et al., 2016).

The culture and trade of freshwater ornamental crustaceans have a much shorter tradition than fish keeping but has grown in importance in recent years (Chucholl, 2013; Faulkes, 2015; Patoka et al., 2016). Crayfish are a diverse and popular animal group kept in aquaria, so there has been an alarming increase in the number of established crayfish species and populations of aquarium origin in Europe over the last decade (Kouba et al., 2014; Weiperth et al., 2020a; Bláha et al., 2022; Laffitte et al., 2023). Ornamental crayfish are often released to urban waters (e.g., Patoka et al., 2016; Weiperth et al., 2020a), habitats that are under substantial pressure from non-native species in general (van Ham et al., 2013; Teurlinckx et al., 2019). Despite potential climatic constraints that may prevent establishment of tropical species, several popular ornamental crayfish are able to successfully overwinter in temperate regions (Haubrock et al., 2019; Veselý et al., 2015).

Besides direct competition for food resources or shelters (Vorbürger and Ribi, 1999; Lele and Părvulescu, 2017), introduced crayfish also may spread crayfish plague, the disease responsible for serious declines of native European crayfish populations (Holdich et al., 2009). This is because numerous traded crayfish originate from North America (Chucholl, 2013; Patoka et al., 2014; Chucholl and Wendler, 2017), share coevolutionary history with the causative agent of crayfish plague, the oomycete *Aphanomyces astaci*, and may therefore act as its chronic carriers (Söderhäll and Cerenius, 1999; Svoboda et al., 2017).

Intraspecific variation within the crayfish plague pathogen, i.e., the presence of genotypes (or genotype groups) that can be distinguished by various molecular tools, allows tracing the source of infection in crayfish plague outbreaks to the original crayfish hosts, at least in the European invaded range (Ungureanu et al., 2020; Mojžišová et al., 2020). However, there is some evidence of interspecific transmission of *A. astaci* strains between North American hosts, both from captivity (Mrugała et al., 2015) and from the wild in the invaded range (James et al., 2017a; Mojžišová et al., 2022). Therefore, the tracking can be complicated when multiple invasive *A. astaci* carriers come into contact (Mojžišová et al., 2022).

As the growing interest in the ornamental crayfish trade in Europe poses an increasing threat of the spread of crayfish plague, studies have been conducted to investigate the presence and transmission of *A. astaci* in pet shops or in crayfish from hobby breeders in Europe (Mrugała et al., 2015; Panteleit et al., 2017), as well as in ornamental crayfish cultured and sold in Indonesia (Putra et al., 2018). These studies have documented infections with the crayfish plague pathogen in various

ornamental crayfish sold in Europe but were severely limited by the number of shops and breeders. So far, only the genotype group D has been detected with certainty in sold ornamental crayfish (Mrugała et al., 2015; Panteleit et al., 2017). The results of Mrugała et al. (2015) indicated a likely horizontal transmission of this genotype group between three *Procambarus* species in captivity. Considering the range of cambarid species offered for ornamental purposes, at least some of which are probably harvested from the wild (Chucholl, 2013), it may be assumed that the richness of *A. astaci* genotypes spread in the aquarium trade is substantially wider than currently known. Indeed, the diversity of *A. astaci* in wild populations of American crayfish species in the USA is substantial (Martín-Torrijos et al., 2021). However, the role of ornamental taxa in introducing and spreading different genotypes of this pathogen into open waters remains unclear.

Ornamental crayfish have been released in different parts of Europe (Kouba et al., 2014; Weiperth et al., 2017; Scheers et al., 2020; Haubrock et al., 2021). In particular, Hungary has become the hotspot of exotic crayfish diversity thanks to locally abundant thermal waters (Weiperth et al., 2017, 2019, 2020a; Bláha et al., 2022). So far, at least four non-native crayfish species of aquarium origin (Cambaridae: red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, Everglades crayfish *P. alleni*, marbled crayfish *P. virginalis*, Mexican dwarf crayfish *Cambarellus patzcuarensis*) have become established in the urban waters of Budapest but even more ornamental crayfish species of the genus *Cherax*, including formally undescribed New Guinean species, have occasionally been captured there (Weiperth et al., 2019, 2020a). In addition, the Danube in Budapest hosts populations of the native narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* and the invasive spiny cheek crayfish *Faxonius limosus*, the latter having reached the city by spreading along this river (Ludányi et al., 2016; Weiperth et al., 2020b; Weiperth 2022a). These species may be in direct contact with marbled crayfish and red swamp crayfish, which have recently started to colonise the main arm of the Danube between river kilometres 1660 and 1630 as well as its several side arms.

The presence of the crayfish plague pathogen *A. astaci* in Hungary was confirmed by molecular detection in signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* and in *F. limosus* in the mid-2000s (Kozubíková et al., 2010), and during a survey primarily focusing on environmental DNA screening in a mixed population of *F. limosus* and *P. virginalis* in a thermally stable nameless tributary of Barát brook in Budapest (Rusch et al., 2020). No information is available about the variation of *A. astaci* in these host populations, or in any other in the region.

In our study, we investigated the distribution, prevalence, and diversity of *A. astaci* in several established populations of non-native crayfish species in the urban waters of Budapest and its vicinity, focusing especially on ornamental aquarium taxa. Although likely produced and imported for ornamental purposes from Southeast Asian aquacultures (Patoka et al., 2015), the native range of all studied non-native crayfish is in North America, and specimens infected by *A. astaci* of all those hosts have been traded at least occasionally in pet shops (Mrugała et al., 2015). Given the high local diversity of potential host species, which apparently resulted from numerous independent releases, we expected *A. astaci* infections in several ornamental species known from the area. Furthermore, we hypothesized that unusual host species/pathogen genotype combinations would be found, resulting from the interspecific transmission of *A. astaci* in the ornamental cultures or after contact between different exotic crayfish species released into open waters. Finally, we assessed whether yet unknown *A. astaci* genotypes could have been introduced along with the ornamental crayfish.

2. Materials and methods

2.1. Sampled localities and crayfish species

Altogether, six crayfish species from two families (Astacidae: *Pontastacus leptodactylus*; Cambaridae: *Procambarus clarkii*, *P. virginalis*, *P.*



alleni, *Faxonius limosus*, *Cambarellus patzcuarensis*) were collected from 18 sites in or near Budapest, the capital of Hungary, between 2018 and 2021 (Table 1, Fig. 1). Sampling took place from various habitats, including the Danube river (eight different sampling sites, including bays), several of its tributaries, and stagnant urban water bodies such as park ponds and thermal pools (Table 1). The localities covered most sites with known presence of exotic crayfish at the time of sampling. We also included several specimens of the only locally occurring native crayfish (*P. leptodactylus*), as chronic infections by various genotypes of *A. astaci* were repeatedly recorded in that species (see Ungureanu et al., 2020), and infected individuals were documented further downstream in the Danube (Părvulescu et al., 2012; Schrimpf et al., 2012).

At nine sampling sites, two or more crayfish species occurred in syntopy. We sampled three co-occurring species from two tributaries of the Danube (a nameless thermally stable tributary of Barát brook, further labelled “Barát” for short: sites 5 and 6, and Dera brook: site 2), and two co-occurring species at six more sites (Table 1, Fig. 1). Crayfish from most sites were sampled only once, but Gombás brook (site 1), Barát (site 6) and Városliget thermal pond (site 8) were sampled in two, two and three different years, respectively. Furthermore, different stretches (50–100 m long) of two invaded watercourses were sampled in different years (Table 1). In Dera brook, a stretch ca 1 km upstream from its mouth (site 2) was screened for crayfish in 2018, a one closer to the river (site 3) in 2020, and the section just above the confluence with the Danube (site 4) in 2021. In Sulák brook, the section ca 5 km upstream from its mouth (site 16) and the section just next to the confluence (site 18) were sampled in 2018, and a middle section ca 3.7 km upstream from the Danube (site 17) in 2020.

Most crayfish individuals were captured into baited traps made of PET bottles or during manual searching with hand-held nets; *P. alleni* individuals were caught by electrofishing (Weiperth et al., 2020a). The collected specimens were preserved whole in plastic jars filled with 96 % ethanol or deep-frozen and stored at -80°C until DNA extraction. The number of analysed individuals per species and sampling site (from two to 30; Table 1) depended primarily on the capture success but also on *A. astaci* infection status. Whenever possible, we aimed to process 20 individuals of a given species. If more specimens were available from sites with documented *A. astaci* presence, additional ones were screened in the attempt to obtain individuals with high infection load suitable for pathogen genotyping.

2.2. Molecular detection and genotyping of *Aphanomyces astaci*

In total, 476 crayfish individuals were screened for *A. astaci* infection (Table 1), mostly *P. clarkii* (162 individuals / 12 sites), *P. virginalis* (145 / 8), and *F. limosus* (98 / 6). The remaining three species were less represented (*P. leptodactylus*: 12 / 2, *P. alleni* 4 / 1, *C. patzcuarensis*: 3 / 2), but we analysed available specimens of these taxa as well. Details on each screened individual are provided in Supplementary Table S1.

The molecular methods followed the protocols described in detail in our previous study, in which we also screened non-native populations of North American crayfish species for *A. astaci* prevalence and diversity (Mojžišová et al., 2022). DNA was isolated from up to 50 mg of crayfish cuticle with DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Soft abdominal cuticle and halves of uropods were dissected from large crayfish specimens; whole uropods, telson and the whole abdomen without muscles were processed from those smaller than 3 cm. We visually screened the analysed crayfish for visible cuticle melanisation and if present (in two cases only), those melanised spots were included among tissues used for DNA analyses. Details about specific body parts processed from each specimen are provided in Supplementary Table S1.

The *A. astaci* detection was performed with a TaqMan Minor Groove Binder (MGB) quantitative PCR (qPCR) assay used in a BioRad iQ5 thermal cycler, according to Vrålstad et al. (2009), with minor modifications of the protocol as in Svoboda et al. (2014). To check for potential inhibition, approx. 25 % of DNA isolates were randomly selected from

every population, 10-fold diluted and repeatedly tested for *A. astaci* presence; these showed no signs of PCR inhibition. The results were evaluated using iQ5 Optical System Software version 2.0 (Bio-Rad).

Four-fold dilution series of standards (with starting concentration of 5×10^5 PCR-forming units, PFU) were used to calibrate the standard curve and to quantify the pathogen DNA in PFU in the reaction, according to Vrålstad et al. (2009). The semiquantitative agent levels (A0–A7), representing the infection intensity, were determined from the strength of the qPCR signal as described in Vrålstad et al. (2009) and Kozubíková et al. (2011). Samples with agent levels A2 or higher were considered *A. astaci*-positive.

To ensure that results were not substantially biased by potential amplification of *Aphanomyces fennicus*, a species known to cross-react with the originally used qPCR assay (Viljamaa-Dirks and Heinikainen, 2019), we re-analysed a subset of 59 DNA isolates (indicated in Supplementary Table S1) by a newly released TaqMan MGB qPCR assay (Strand et al., 2023) that detects *A. astaci* but not *A. fennicus*. The selected isolates represented all presumably infected host species and populations and a range of agent levels, including specimens in which very low or trace amounts of *A. astaci* DNA were indicated by the Vrålstad et al. (2009) assay. We followed the EMM² protocol of Strand et al. (2023) for TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) with 50 cycles and annealing temperature of 58°C . The use of standards and controls in the reaction, and interpretation of the results were the same as with the original Vrålstad et al. (2009) assay.

Isolates with relatively low *A. astaci* DNA concentrations, as is usual for asymptomatic North American hosts (e.g., Filipová et al., 2013; James et al., 2017b), are unsuitable for the pathogen genotyping. For this purpose, we only selected twelve DNA isolates with an agent level of at least A3 (>400 PFU) representing three host species (*P. clarkii*, *P. virginalis*, *F. limosus*; Table 2), all from sites of syntopy. One *P. virginalis* individual was from Dera brook, the remaining ones from Barát (one *P. virginalis* and three *F. limosus* collected in 2018, and four *P. virginalis*, one *F. limosus* and two *P. clarkii* collected in 2020).

The diversity of *A. astaci* in these isolates was characterized by three complementary molecular methods targeting different parts of the genome: sequencing of two mtDNA markers (Makkonen et al., 2018), genotyping by qPCR assays that differentiate main genotype groups known from Europe (Di Domenico et al., 2021), and by variation of nine microsatellite markers (Grandjean et al., 2014). To enhance genotyping success, all twelve DNA isolates were concentrated to the final volume of 50 μL by precipitation with the GlycoBlue Coprecipitant (Thermo Fisher Scientific) as described in Mojžišová et al. (2022).

To determine *A. astaci* haplogroups, we amplified fragments of both small and large mitochondrial ribosomal subunits (rnsS, rnlL) of *A. astaci*, as described in Makkonen et al. (2018). PCR products were sequenced in both directions, and concatenated sequences were compared with the reference *A. astaci* haplotypes (Makkonen et al., 2018; Martín-Torrijos et al., 2018, 2021). Not only does this method allow for differentiation of *A. astaci* mitochondrial haplogroups, but it also provides a sequencing-based confirmation of the species identity of the pathogen (Casabella-Herrero et al., 2021), independent of the nuclear ITS marker used in qPCR-based detection.

As the second genotyping method, we used five qPCR TaqMan assays (Di Domenico et al., 2021) based on anonymous nuclear loci, which were developed for quick tentative assignment of isolates to main *A. astaci* genotype groups known from Europe (A, B, C, D, and E; see Svoboda et al., 2017; Ungureanu et al., 2020), and should reliably identify genotype groups A, D and E, originally characterized from axenic laboratory strains by random amplification of polymorphic DNA (RAPD; Huang et al., 1994). The analyses were performed on an iCycler iQ5 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the original protocol except for the annealing temperature that was set to 60°C for all assays. The results were evaluated using iQ5 Optical System Software version 2.0 (Bio-Rad). Isolates where the fluorescence signal

Table 1

Sampling sites, studied host species, number of analysed specimens, and results of *Aphanomyces astaci* screening and genotyping based on mitochondrial small and large ribosomal subunit (rnnS, rnnL), five quantitative PCR probes (qPCR), and microsatellite markers (SSR). Geographic coordinates (WGS84) indicate an approximate centre of the sampling area in the given watercourse or waterbody. Results of *A. astaci* screening are based on the qPCR assay according to Vrálstad et al. (2009), details for each individual and provided in Supplementary Table S1.

No.	Locality	Thermal	Coordinates	Host species	Sampled in	N	<i>A. astaci</i> positive	Agent level	mtDNA rnnL	rnnS	qPCR	SSR
1	Gombás brook in Vác	No	47.7688N, 19.1376E	<i>F. limosus</i>	Aug-18	3	0	–	–	–	–	–
					Jul-20	22	1	A2	–	–	–	–
					Aug-18	1	0	–	–	–	–	–
					Apr-May 2019	2	0	–	–	–	–	–
					Aug-20	1	1	A3	–	–	–	–
2	Dera brook	No	47.6456N, 19.0688E	<i>F. limosus</i>	Jul-18	2	0	–	–	–	–	–
					Jul-18	4	0	–	–	–	–	–
					Jul-18	5	3	A2-A3	–	B	–	–
3	middle stretch	No	47.6426N, 19.0740E	<i>F. limosus</i>	Jul-20	20	0	–	–	–	–	–
					Jul-20	20	0	–	–	–	–	–
4	above confluence	No	47.6421N, 19.0787E	<i>P. clarkii</i>	Jul-21	5	0	–	–	–	–	–
					Jul-21	5	0	–	–	–	–	–
5	tributary of Barát brook	Yes +	47.6060N, 19.0603E	<i>F. limosus</i>	Jul-18	29	24	A2-A4	B	B	B	–
					Jul-18	3	0	–	–	–	–	–
					Jul-18	26	18	A2-A3	B	–	–	–
6	lower stretch	Yes +	47.6092N, 19.0619E	<i>P. clarkii</i>	Jul-18	3	0	–	–	–	–	–
					Jul-20	21	18	A2-A3	A	–	C	–
					Jul-20	27	27	A2-A3	A	A	C	–
7	Városliget	Yes ++	47.5184N, 19.0842E	<i>P. virginalis</i>	Sep-20	20	0	–	–	–	–	–
					C.	3	0	–	–	–	–	–
					<i>patuxarensis</i>	3	0	–	–	–	–	–
8	large thermal pond	Yes ++	47.5149N, 19.0809E	<i>P. clarkii</i>	Jul-18	6	0	–	–	–	–	–
					Jul-21	10	0	–	–	–	–	–
					Jul-18	20	0	–	–	–	–	–
9	Danube	No	47.5539N, 19.0699E	<i>P. virginalis</i>	Jul-20	20	0	–	–	–	–	–
					Oct-20	3	0	–	–	–	–	–
					<i>leptodaetylus</i>	3	0	–	–	–	–	–
10	Obuda island bay	No	47.5561N, 19.0722E	<i>F. limosus</i>	Jul-20	17	1	A2	–	–	–	–
					Jul-20	17	1	A2	–	–	–	–
					<i>P. leptodaetylus</i>	9	0	–	–	–	–	–
11	tip of Margaret island	No	47.5155N, 19.0427E	<i>P. virginalis</i>	Jul-18	4	3	A2	–	–	–	–
					Jul-18	4	3	A2	–	–	–	–
					<i>P. virginalis</i>	4	3	A2	–	–	–	–
12	outflow of Városliget thermal ponds	Yes +++	47.4997N, 19.0459E	<i>P. virginalis</i>	Nov-20	20	0	–	–	–	–	–
					Nov-20	20	0	–	–	–	–	–
					<i>P. clarkii</i>	6	0	–	–	–	–	–
13	200 m down-stream from 12	No	47.4972N, 19.0465E	<i>P. virginalis</i>	Oct-20	20	0	–	–	–	–	–
					Oct-20	20	0	–	–	–	–	–
					<i>P. virginalis</i>	20	0	–	–	–	–	–
14	Lágymányosi bay	No	47.4630N, 19.0589E	<i>P. clarkii</i>	Jul-20	20	0	–	–	–	–	–
					Jul-20	20	0	–	–	–	–	–
					<i>P. clarkii</i>	20	0	–	–	–	–	–
15	small side arm	No	47.3909N, 19.0085E	<i>P. clarkii</i>	Aug-20	14	0	–	–	–	–	–
					Aug-20	14	0	–	–	–	–	–
					<i>P. clarkii</i>	14	0	–	–	–	–	–
16	Sulák brook	No	47.3963N, 18.9492E	<i>P. clarkii</i>	Jul-18	20	0	–	–	–	–	–
					Jul-18	20	0	–	–	–	–	–
					<i>P. clarkii</i>	20	0	–	–	–	–	–
17	middle stretch	No	47.3856N, 18.9435E	<i>P. clarkii</i>	Jul-20	20	0	–	–	–	–	–
					Jul-20	20	0	–	–	–	–	–
					<i>P. clarkii</i>	20	0	–	–	–	–	–
18	above confluence	No	47.3627N, 18.9477E	<i>P. clarkii</i>	Jul-18	20	0	–	–	–	–	–
					Jul-18	20	0	–	–	–	–	–
					<i>P. clarkii</i>	20	0	–	–	–	–	–

+: a small tributary of Barát brook with a spring of year-round stable temperature 18.5 °C that affects the thermal regime downstream.

++: ponds affected by thermal inflow exceeding 35 °C.

+++: shoreline of the river Danube affected by thermal inflow by an underground pipe.

*: evidence of co-infection between two *A. astaci* genotypes in one *P. virginalis* host (see Table 2).

exceeded the threshold after cycle 40 (i.e., C_t value > 40.0) were not considered positive.

Finally, we amplified nine microsatellite markers (simple sequence repeats; SSR) from two DNA isolates with the highest pathogen load, which guaranteed the success of this genotyping method, following the protocol described in Grandjean et al. (2014). We used the QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for the preparation of the reaction mix, but we amplified each of the nine loci separately to ensure most efficient scoring, as in Mojžišová et al. (2022). Fragment analysis

was performed on a 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), and allele sizes were determined in GeneMarker software version 1.95 (SoftGenetics LLC, State College, PA, USA). In case of ambiguous or unusual results, the amplification of the respective loci was repeated to ensure the reproducibility of the patterns. The results were compared with various *A. astaci* multilocus genotypes characterized with these microsatellite markers (Grandjean et al., 2014 amended in Mojžišová et al., 2020; Maguire et al., 2016; Mrugała et al., 2017; James et al., 2017b; Panteleit et al., 2019; Table 3).



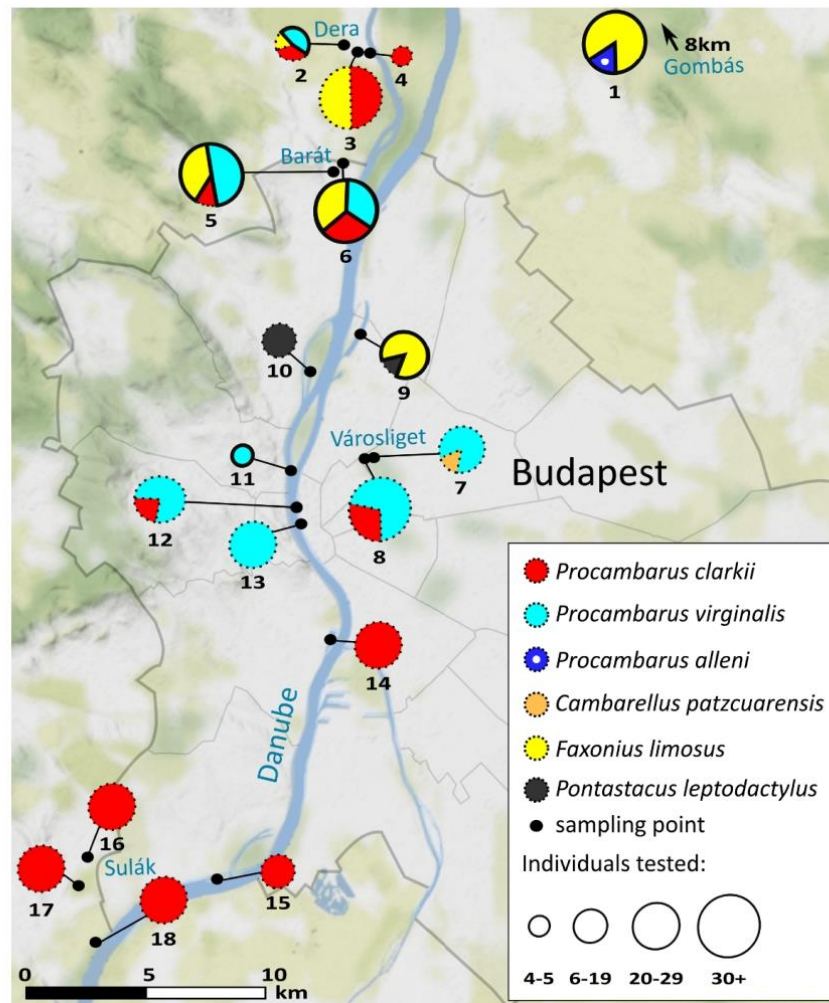


Fig. 1. Position of sampling sites in Budapest environs, sampled species, and their infection status. Crayfish host species are differentiated by colour, dotted borders indicate no detection of *Aphanomyces astaci*, full thick borders indicate detection of this pathogen in at least one individual of a given species at a site. Circle sizes reflect the number of analysed crayfish per site. Details about sampled sites and results of analyses are provided in Table 1.

The nomenclature of *A. astaci* genotyping results used in the text and tables follows Grandjean et al. (2014), Makkonen et al. (2018), and Svoboda et al. (2017). Specifically, we refer to *A. astaci* mitochondrial haplogroups (indicated by uppercase letters) and haplotypes (unique sequence variants indicated by lowercase letters) defined by partial sequences of mitochondrial ribosomal subunits in Makkonen et al. (2018). These partly match the corresponding uppercase letters indicating the RAPD-defined *A. astaci* genotype groups (Huang et al., 1994; Svoboda et al., 2017). Microsatellite (SSR) multi-locus genotypes that can be assigned to one of these genotype groups are also labelled with the corresponding capital letters.

3. Results

3.1. Distribution of infected crayfish hosts

Both ITS-based qPCR detection assays confirmed the infection by *A. astaci* in four crayfish species, all belonging to the North American family Cambaridae: *P. clarkii*, *F. limosus*, *P. virginalis*, and *P. alleni*. The infected crayfish were collected from three brooks (Gombás, Dera, and Barát tributary) in the northern part of the study area, and from the Danube or one of its bays (Table 1, Fig. 1). No infections were detected in *P. leptodactylus* and *C. patzcuarensis*; however, the number of analysed individuals of these species was very low. Furthermore, despite repeated sampling at some of the sites, we hardly found any infected *P. clarkii* or *P. virginalis* in the centre and southern part of the city (Fig. 1). The only exception to this spatial pattern were *P. virginalis* specimens sampled

Table 2

List of isolates used for *Aphanomyces astaci* genotyping, and results of sequencing of mtDNA markers (large and small ribosomal subunits: rnlL and rnlS; after Makkonen et al., 2018) and qPCR assays targeting nuclear markers (A to E; after Di Domenico et al., 2021). PFU indicates quantity of *A. astaci* DNA in each isolate (as PCR-forming units in ITS-based qPCR detection assay following Vrålstad et al., 2009) before concentration by GlycoBlue Coprecipitant from initial volume to 50 µL (see Methods for details). Numerical results for qPCR assays (C_t values) indicate the cycle numbers at which the minimal threshold values for reliable fluorescence detection were crossed.

Locality	Year	Species	Specimen code	PFU	Initial vol. (µL)	mtDNA		qPCR assays (cycle threshold)				
						rnlL	rnlS	A	B	C	D	E
Dera	2018	<i>Procambarus virginalis</i>	DER-PV1	534	125	–	B	–	–	–	–	–
			BAR-FL4	505	136	B	B	–	–	–	–	–
			BAR-FL9	548	100	B	B	–	–	–	–	–
			BAR-FL21	1133	147	B	B	–	37.1	–	–	–
Barát	2020	<i>Procambarus virginalis</i>	BAR-PV12	690	144	B	–	–	–	–	–	–
			BAR-FLN16	590	156	A	A	–	–	**	–	–
			BAR-PVN10	34,380	122	A*	A*	–	38.7	35.0	–	–
			BAR-PVN15	964	155	A	A	–	–	38.5	–	–
		<i>Procambarus virginalis</i>	BAR-PVN21	10,650	151	A	A	–	–	**	–	–
			BAR-PVN26	2030	181	A	A	–	–	39.5	–	–
			BAR-PCN1	481	147	A	–	–	–	40.0	–	–
			BAR-PCN17	404	123	A	–	–	–	–	–	–
		<i>Procambarus clarkii</i>										

*: weak traces of co-amplification of mitochondrial b-haplotype along with the dominant a-haplotype.

** : weak signal of the assay "C", not exceeding the set threshold.

directly from the main arm of the Danube at the tip of the Margaret Island in the city centre (river km 1651, site 11); three out of four DNA isolates from that site tested positive for *A. astaci*.

At most other sites with documented *A. astaci* presence, only a few infected specimens were confirmed. Only single infected *F. limosus* individuals were detected in the side arm of the Danube (Újpesti bay, river km 1654, site 9) and in Gombás brook (site 1). At the latter locality, however, infection was also confirmed in one specimen of the coexisting *P. alleni*. In Dera brook (sites 2–4), three out of five locally sampled *P. virginalis* were *A. astaci*-positive but the pathogen was not detected in *P. clarkii* or *F. limosus* that also occurred there. In all those infected crayfish specimens, the individual pathogen load remained very low to low (agent levels A2–A3; Table 1).

An entirely different pattern was observed in Barát (sites 5–6 in Fig. 1) where many infected crayfish were collected both in 2018 and 2020. In the latter year, the infection prevalence exceeded 85 % in all three locally occurring species (*P. clarkii*, *F. limosus*, and *P. virginalis*), and individuals with agent levels A4 and even A5 were exceptionally recorded (Table 1).

Additional analysis of selected DNA isolates using a new *A. astaci* detection assay recently published by Strand et al. (2023) confirmed the overall patterns reported above and indicated that the results were not substantially biased by false positives. The presence of *A. astaci* was confirmed at all sites where it was indicated by the Vrålstad et al. (2009) assay (including the single infected *P. alleni* individual). However, for some samples, the results of the Strand et al. (2023) assay indicated a lower concentration of target DNA; this resulted in a shift of the resulting agent levels to a lower category in 26 out of 59 re-analysed samples (Supplementary Table S1). In two isolates that were positive just above the limit of detection (one *P. virginalis* from Dera and one *P. clarkii* from Barát), re-analysis with the new assay did not confirm the presence of *A. astaci* DNA (agent level A0), and in six other isolates the new assay showed trace amounts of target DNA but below the reliable limit of detection (agent level A1). In the remaining 51 isolates, both assays congruently confirmed the presence of *A. astaci*.

3.2. Genotyping of *Aphanomyces astaci*

We obtained at least some data to characterize *A. astaci* in all twelve DNA isolates from infected crayfish (*P. virginalis*, *F. limosus* and *P. clarkii*) from Dera and Barát, for which we attempted to genotype the pathogen. However, the amplification success of various markers (mitochondrial ribosomal subunits, anonymous nuclear markers targeted by qPCR assays, and nuclear microsatellite loci) varied substantially, presumably

due to low pathogen DNA concentrations.

Based on the partial sequences of two mitochondrial ribosomal subunits, we successfully assigned the DNA isolates from infected crayfish hosts selected for the pathogen genotyping to *A. astaci* haplogroups (Tables 1, 2). Although in four cases the amplification was successful for only one of those two markers, it was always the one containing phylogenetically informative sites allowing mitochondrial haplogroup differentiation (Table 2). A *Procambarus virginalis* specimen from Dera carried B-haplogroup, and the same was also detected in *P. virginalis* and *F. limosus* sampled in Barát in 2018. For one specimen of the latter species (carrying the mitochondrial haplotype b, based on sequences of both rnlL and rnlS markers), a positive result of the qPCR genotyping assay "B" targeting an anonymous nuclear locus (Table 2) corroborated tentative assignment of the respective *A. astaci* strain to RAPD-defined genotype group B, usually associated with *P. leniusculus* as its typical North American host (Makkonen et al., 2019; Ungureanu et al., 2020; but see Mojžišová et al., 2022).

In contrast, all specimens of all three crayfish species coexisting in Barát sampled in 2020 (*P. virginalis*, *P. clarkii*, *F. limosus*), in which the crayfish plague pathogen could be further characterized, carried mitochondrial A-haplogroup, known from multiple genetically distinct genotypes of *A. astaci* differing in nuclear markers (Makkonen et al., 2018; Di Domenico et al., 2021). The nuclear qPCR genotyping was consistently positive for the assay "C" (Table 2), indicating the involvement of some uncommon *A. astaci* strain. Its uniqueness was further supported by the microsatellite genotyping (Table 3). This method was successful for two highly infected *P. virginalis* specimens (agent level A5), and revealed an unusual combination of alleles, including new allele sizes at loci Aast2 (162 bp) and Aast4 (105 bp).

Despite the apparent temporal shift in *A. astaci* strain dominance in Barát (from B-haplogroup in 2018 to as yet unknown strain(s) of A-haplogroup in 2020), all three genotyping methods indicated that the former haplogroup had not completely disappeared from Barát by 2020. Specifically, all methods revealed that one of the highly infected *P. virginalis* specimens (BAR-PVN10) was co-infected with at least two different *A. astaci* strains, one representing the A-haplogroup (apparently dominant in Barát at the time of sampling), and another representing the B-haplogroup (which dominated in the brook two years earlier).

Co-infection was clearly indicated by the qPCR assays targeting the anonymous nuclear markers. The assays "B" and "C" both gave positive results when run on BAR-PVN10, although the signal from assay "C" was much stronger (Table 2). These results were consistent with the fact that peaks corresponding to alleles known from a reference strain of B-



Table 3
Variation at nine microsatellite (SSR) loci in two isolates from highly infected *Procambarus virginalis* from the Barát tributary, and comparison with reference multilocus genotypes representing strains of different genotype groups (originally defined by RAPD from axenic cultures) and mitochondrial haplotypes (based on ribosomal mmtL and mmtS subunits) known from various crayfish hosts. The column 'Source' indicates whether the strain was characterized from axenic cultures (C) or host tissue isolates (T), when *A. astaci* genotype was characterized from infected native European crayfish, the respective host species is marked by an asterisk. The allele sizes of BAR-PVN10 marked in bold are presumably due to co-infection with an *Aphanoanthes astaci* strain of genotype group B. Abbreviations in the column 'Ref.' refer to original publications: Gr14: Grandjean et al. (2014), Ja17: James et al. (2017b), Ma16: Maguire et al. (2016), Mr17: Mrugala et al. (2017), Mo20: Mojžišová et al. (2020), Pa19: Panteleít et al. (2019).

SSR genotype	Code	Genotype group	Haplo-type	Original host species	Source	Aast 2	Aast 4	Aast 6	Aast 7	Aast 9	Aast 10	Aast 12	Aast 13	Aast 14	Ref.
new	BAR-PVN21	unspecified	a	<i>Procambarus virginalis</i>	T	142/162	87/105	148/157	191/207	164/182	132/142	226	194/202	248	
mixed	BAR-PVN10	mixed	a	<i>Procambarus virginalis</i>	T	142/162	87/105	148/157	191/207/215	164/182	132/142	226/240	194/202	248	
A1	EviraG462/06	A	a	<i>Astacus astacus</i> *	C	160	103	157	207	180	142	226/240	194	246	Gr14
A2	V103557	A	a	<i>Astacus astacus</i> *	C	160	103	157	207	180	142	–	194	246	Gr14
B	V103555	B	b	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	C	142	87	148	215	164/182	132	226/240	202	248	Gr14
B2	Mura B	B	b	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	T	142	87	148	215	164/180	132/142	226/240	202	248	Ma16
B3	Mochdre, UK	B	b	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	T	142	87	148	215	164	132	226/240	202	248	Ja17
C	V103558	C	a	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	C	154	87	148	191	164/168	132	226	202	248	Gr14
D	V103556	D	d1	<i>Procambarus clarkii</i>	C	138	131	148	203	180	142	234	194	250	Gr14
D2	Chiba, Japan	D	d1	<i>Procambarus clarkii</i>	T	138	131	148	203	180	156	234	194	250	Mr17
E	Evira4805	E	e	<i>Faxonius limosus</i>	C	150	87/89	148/157	207	168/182	132/142	240	194/202	248	Mo20
rust1	SSR-rust1	unspecified	a	<i>Faxonius rusticus</i>	C	142	87	148	191	164/168	132	240	202	248	Pa19
Up	SSR-Up	unspecified	a	<i>Austropotamobius torrentium</i> *	T	142/150	87	148	205/215	164	132/138	226	202	248	Mo20

haplogroup were observed for BAR-PVN10 at two nuclear microsatellite loci (locus Aast7: allele 215, in addition to two other peaks at 191 and 207 bp; and locus Aast12: allele 240, in addition to 226; Table 3). These additional peaks could be obtained in repeated polymerase chain reactions, but were consistently lower than those of the other alleles at the same locus, and were not observed for another highly infected *P. virginalis* specimen (BAR-PVN21) from the same population. Finally, the chromatograms from Sanger sequencing of both ribosomal subunits amplified from the isolate BAR-PVN10 also showed evidence of co-amplification of alleles representing both mitochondrial haplogroups. Secondary minor peaks were observed indicating a specific single nucleotide polymorphism in the small ribosomal subunit and a one-base-pair shift due to a single nucleotide deletion in the large subunit, which are the point mutations differentiating A- and B-haplogroups (i.e., haplotypes a and b, based on concatenated mmtL and mmtS sequences) of *A. astaci* (Makkonen et al., 2018).

4. Discussion

Our screening of the distribution and prevalence of the crayfish plague pathogen in Budapest urban waters supports the assumption that this conservationally important invasive pathogen is indeed spread and released to the wild with the ornamental crayfish. We detected infections in four out of five non-native species of North American origin present in the environs of Budapest, three of which (*P. clarkii*, *P. virginalis* and *P. allenii*) are certainly of aquarium origin (Weiperth et al., 2019, 2020a). Our study represents the first documented infection in established non-native populations of *P. allenii*, and adds to a few studies confirming infections of *P. virginalis* in the wild (Keller et al., 2014; Andriantsoa et al., 2019). We did not detect any infection in the Budapest population of *Cambarellus patzcuarensis* but the low number of analysed specimens do not allow any conclusions about its infection status. The species itself has already been shown to carry *A. astaci* in ornamental trade (Mrugala et al., 2015), and infections in its congeners were documented from the southeast USA (Martín-Torrijos et al., 2021) and Mexico (Martín-Torrijos et al., 2023).

Infection by *A. astaci* in all four host species was confirmed by the newly published qPCR assay of Strand et al. (2023), and in *P. clarkii*, *P. virginalis* and *F. limosus* also by sequencing of one or both of the mitochondrial markers studied. The results did not indicate the presence of *A. fernicus* (or any other non-target taxon) cross-reacting with the Vrålstad et al. (2009) assay. The apparent decrease in sensitivity of the new assay for some isolates (not reported in Strand et al., 2023) seems to have been caused largely by sample degradation over time, as subsequent parallel analyses of selected DNA isolates showed similar performance of both assays (M. Mojžišová, unpubl. data).

The data on *A. astaci* genetic variation, although limited, indicate that horizontal transmission of the pathogen occurred between some of the coexisting host species. The observed replacement of the dominant haplogroup in Barát between 2018 and 2020 suggests that introductions of this pathogen occur repeatedly (as do the introductions of its hosts), and that multiple *A. astaci* genotypes circulate in the "pet trade reservoir". As the infected crayfish co-occur in the area with other potential host crayfish species (native *P. leptodactylus*, and the widespread invader *F. limosus*), which allows for the horizontal transmission of pathogens, it can be argued that the genotyped strains of *A. astaci* may not originate from the aquaria. However, this source is likely for several reasons.

First, the marker combination observed in *P. virginalis* specimens from Barát is unlike any documented from Europe so far (Ungureanu et al., 2020). The combination of mitochondrial A-haplogroup and the positive result of nuclear qPCR assay "C" of Di Domenico et al. (2021) is itself unusual, having been previously only documented for RAPD-defined genotype group C isolated from the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (strain Kv of Huang et al., 1994) and for the strains isolated from the rusty crayfish *Faxonius rusticus* (Panteleít et al., 2019). Those particular strains differ from the infection characterized from Barát in



Budapest at some microsatellite loci (Table 3), so their involvement can be ruled out, although we cannot be certain without obtaining a single-spore axenic culture that the allele combination observed in the marbled crayfish specimen BAR-PVN21 represents a single *A. astaci* strain (numerous loci were heterozygous, which could result from a coinfection by different strains of the same haplogroup). However, the variation of strains within the A-haplogroup, which is widespread in the original *A. astaci* range in the USA (Martín-Torrijos et al., 2021), is likely high, so the discovery of additional genotypes differing at various nuclear loci is expectable.

Second, the combination of *A. astaci* haplogroups documented from Budapest (A and B) with the host species, in which they were found (*P. clarkii*, *P. virginalis*, *F. limosus*), was unexpected. *Procambarus clarkii* is a typical host of D-haplogroup (Makkonen et al., 2018; Martín-Torrijos et al., 2021), and *F. limosus* of E-haplogroup (Mojžišová et al., 2022). Neither A- nor B-haplogroups (or other specific *A. astaci* genotypes) have been detected in those hosts in Europe (Ungureanu et al., 2020), with a single exception of B-haplogroup detected in one Czech population of *F. limosus* coexisting with *P. leniusculus* (Mojžišová et al., 2022), clearly due to local horizontal transmission. The latter is the original host of such strains both in Europe (Huang et al., 1994; Ungureanu et al., 2020) and the USA (Makkonen et al., 2019). It occurs in the Danube basin upstream of Budapest (Lipták and Vitézková, 2014; Weiperth, 2022b), starting to colonise the Moson Danube side arm system and the main arm of the Danube near Gönyű (1785 river km) at the Hungarian-Slovak border, i. e., ca 100 km away (Weiperth, 2022b). However, chronic infections of *P. leptodactylus* by corresponding *A. astaci* genotypes have been reported from Eastern Europe and Turkey (Kokko et al., 2018; Ungureanu et al., 2020), and the pathogen may have spread through the population of this species from the upstream regions where it is in contact with *P. leniusculus* already. Therefore, it cannot be ruled out that such chronic infections also occur in the Danube population of *P. leptodactylus* in Budapest (we only sampled a limited number of specimens, none of which were infected). However, this species does not occur in the small brooks from which we genotyped *A. astaci* infections of the ornamental crayfish. It is thus unlikely that *P. leptodactylus* served as the source of infection. On the contrary, it can be assumed that other pathogen strains may be easily transferred to *P. leptodactylus* population in the Danube from the locally present infected *F. limosus* or *P. virginalis*.

The spatial distribution of infected crayfish among the study sites was uneven. In several populations with *P. clarkii* and *P. virginalis*, some of the most popular aquarium crayfish in the recent past (but at present formally banned in the EU by Regulation No. 1143/2014), we detected no trace of the pathogen. However, *P. virginalis* was infected at other sites, and we repeatedly observed a particularly high *A. astaci* prevalence in Barát tributary. This uneven pattern might be due to different sources of released crayfish, as some pet shops (as well as home aquaria) may be free of this pathogen, while elsewhere in captivity, it persists and spreads even between different host species (Mrugała et al., 2015; Panteleit et al., 2017). The founder effect is certainly one of the key factors influencing *A. astaci* prevalence in various non-native crayfish populations across Europe (e.g., Kozubíková et al., 2009; Tilmans et al., 2014). However, local environmental conditions might have also affected the presence and/or survival of the crayfish plague pathogen, even if originally co-introduced with the crayfish hosts. Specifically, the temperature in the Városliget thermal pond (site no. 8), one of the localities where both marbled and red swamp crayfish thrive, may exceed 38 °C in some parts of the season (Weiperth et al., 2020a), which seems incompatible with *A. astaci* long-term survival (Svoboda et al., 2020). Such site, if serving as a source for further crayfish introductions (either directly or indirectly), would likely provide stock free of this pathogen. The seemingly paradoxical lack of *A. astaci* detection at several sites with established cambarid crayfish in the Danube (sites 12 to 15) downstream from infected populations may be attributed to a dilution effect. The pathogen spores released from infected hosts are carried by large volumes of water in this major river, and the local crayfish

populations are likely neither dense enough nor sufficiently contiguous to facilitate efficient pathogen spread.

The change of the dominant haplogroup infecting crayfish in Barát between 2018 and 2020 is noteworthy. The limited data about the temporal changes of *A. astaci* prevalence in local populations of invasive hosts indicate that long-term persistence of the pathogen is common but temporal fluctuations leading to a decrease of the prevalence below the limit of detection may occur (Matasová et al., 2011; Mojžišová et al., 2022). The observation of one *P. virginalis* specimen apparently co-infected with strains from both haplogroups nevertheless indicates that B-haplogroup has not completely disappeared from the local host populations. This adds to other pieces of evidence that the horizontal transmission between chronically infected host species occasionally occurs (Mrugała et al., 2015; James et al., 2017a; Mojžišová et al., 2022), and syntopic or regional co-occurrence of hosts carrying multiple pathogen strains may result in co-infections by different *A. astaci* strains, both in chronically infected hosts (Maguire et al., 2016; Martín-Torrijos et al., 2021) and in a crayfish plague outbreak (Casabella-Herrero et al., 2023).

We cannot determine whether the pattern documented in Barát resulted from fluctuations in the frequency of different coexisting pathogen strains, or whether we observed a gradual replacement of a B-haplogroup strain introduced first with a more successful A-haplogroup strain introduced later. The success of the latter in Barát may be due to its innate high transmission rate, local environmental conditions that facilitate the spread of this particular strain or *A. astaci* in general (e.g., year-round stable thermal regime, stress on local crayfish), or both. To further characterize the pathogen strain, its isolation to axenic culture (e.g., using the methodology applied by Martín-Torrijos et al., 2021) would be needed. Whatever the reason for its success is, the *A. astaci* prevalence in Barát was very high, and therefore this site can be considered of the highest risk from the pathogen transmission point of view.

In the case of Budapest, a large city where most of the released aquarium pets end up in thermal urban waters, the likelihood of direct transmission of *A. astaci* to susceptible crayfish threatened by crayfish plague seems low (except for *P. leptodactylus* in the Danube, which nevertheless shows some ability to coexist with this pathogen, both in the Danube and elsewhere in its range; e.g., Panteleit et al., 2018; Ungureanu et al., 2020). However, some of the popular sites where exotic pets are released, such as natural thermal waters, are located close to well-preserved natural areas (e.g., Lipták et al., 2016; Bláha et al., 2022), where the local presence of native crayfish populations is more likely. In such cases, novel pathogen genotypes may start spreading to native hosts, contribute to their declines, and add to the pool of virulent *A. astaci* strains found in European waters. Tracing such novel strains back to the original sources of infection may only be possible with improved knowledge of the pathogen's diversity in both wild host populations and captivity.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors are grateful to Anna Farkas, Blanka Gál, Bettina Szajbert, Edit Répás, Gréta Sahin, Petra Dragán, Veronika Gábris, Balázs Tóth, Béla Csányi, Richárd Seprős, Tibor Danyik and Zsombor Márk Bányai for assistance with fieldwork. Crayfish sampling has been authorized by the Ministry of Agriculture (permits no.: HHGf/561-1/2016, HHGf/561-1-2018, 1-HAGF/25/2022). Funding: This work was partially funded by Charles University [project SVV 260680] supporting MM; Czech Science Foundation [grant 19-04431S] supporting AK; Technology Agency of



the Czech Republic [project 'DivLand' no. SS02030018] supporting JP. The research was conducted in accordance with the objectives of the European consortium DANUBIUS RI. JP was further supported by the Indonesian Center for Research on Bioinvasions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108040>.

References

- Andriantsoa, R., Tonges, S., Panteleit, J., Theissinger, K., Carneiro, V.C., Rasamy, J., Lyko, F., 2019. Ecological plasticity and commercial impact of invasive marbled crayfish populations in Madagascar. *BMC Ecol.* 19, 8. <https://doi.org/10.1186/s12998-019-0224-1>.
- Bláha, M., Weiperth, A., Patoka, J., Szajbert, B., Balogh, E.R., Staszny, Á., Ferincz, Á., Lente, V., Maciaszek, R., Kouba, A., 2022. The pet trade as a source of non-native decapods: the case of crayfish and shrimps in a thermal waterbody in Hungary. *Environ. Monit. Assess.* 194, 795. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10361-9>.
- Casabella-Herrero, G., Martínez-Ríos, M., Viljamaa-Dirks, S., Martín-Torrijos, L., Diéguez-Urbeondo, J., 2021. *Aphanomyces astaci* mtDNA: insights into the pathogen's differentiation and its genetic diversity from other closely related oomycetes. *Fung. Biol.* 125, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.11.010>.
- Casabella-Herrero, G., Higuera-Gamíndez, M., Azcona, V.A., Martín-Torrijos, L., Diéguez-Urbeondo, J., 2023. *Austropotamobius pallipes* can be infected by two haplotypes of *Aphanomyces astaci*: A key example from an outbreak at an ex-situ conservation facility. *J. Invertebr. Pathol.* 201, 107989. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107989>.
- Churchill, C., 2013. Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biol. Invasions* 15, 125–141. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0273-2>.
- Churchill, C., Wendler, F., 2017. Positive selection of beautiful invaders: long-term persistence and bio-invasion risk of freshwater crayfish in the pet trade. *Biol. Invasions* 19, 197–208. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1272-5>.
- Di Domenico, M., Curini, V., Caprioli, R., Giansante, C., Mrugala, A., Mojžišová, M., Cammà, C., Petrušek, A., 2021. Real-time PCR assays for rapid identification of *Aphanomyces astaci* genotypes. *Front. Ecol. Evol.* 9, 597585. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.597585>.
- Duggan, I.C., Rixon, C.A.M., MacIsaac, H.J., 2006. Popularity and propagule pressure: Determinants of introduction and establishment of aquarium fish. *Biol. Invasions* 8, 377–382. <https://doi.org/10.1007/s10530-004-2310-2>.
- Duggan, I.C., Champion, P.D., MacIsaac, H.J., 2018. Invertebrates associated with aquatic plants bought from aquarium stores in Canada and New Zealand. *Biol. Invasions* 20, 3167–3178. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1766-4>.
- Emde, S., Kochmann, J., Kuhn, T., Dorge, D.D., Plath, M., Miesen, F.W., Klimpel, S., 2016. Cooling water of power plant creates 'hot spots' for tropical fishes and parasites. *Parasitology* 115, 85–98. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4724-4>.
- Evers, H.G., Pinnegar, J.K., Taylor, M.L., 2019. Where are they all from? – sources and sustainability in the ornamental freshwater fish trade. *J. Fish Biol.* 94, 909–916. <https://doi.org/10.1111/jfb.13930>.
- Faulkes, Z., 2015. The global trade in crayfish as pets. *Crustacean Res.* 44, 75–92. <https://doi.org/10.18353/crustacea.44.0.75>.
- Filipová, L., Petrušek, A., Matasová, K., Delaunay, C., Grandjean, F., 2013. Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in population of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: Evaluating the threat to native crayfish. *PLoS One* 8, e70157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070157>.
- Gertzen, E., Familiar, O., Leung, B., 2008. Quantifying invasion pathways: fish introductions from the aquarium trade. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65, 1265–1273. <https://doi.org/10.1139/F08-056>.
- Grandjean, F., Vrålstad, T., Diéguez-Urbeondo, J., Jelić, M., Mangombi, J., Delaunay, C., Filipová, L., Rezincuc, S., Kozubíková-Balcarová, E., Guyonnet, D., Viljamaa-Dirks, S., Petrušek, A., 2014. Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Vet. Microbiol.* 170, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.020>.
- Haraszthy, L. (Ed.), 2022. Invasive Animal Species in Hungary. Duna-Ipoly National Park Directorate – Ministry of Foreign Affairs and Trade of Hungary, Budapest.
- Haubrock, P.J., Kubec, J., Veselý, L., Burić, M., Tricarico, E., Kouba, A., 2019. Water temperature as a hindrance, but not limiting factor for the survival of warm water invasive crayfish introduced in cold periods. *J. Great Lakes Res.* 45, 788–794. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.05.006>.
- Haubrock, P.J., Oficialdegui, F.J., Zeng, Y., Patoka, J., Yeo, D.C., Kouba, A., 2021. The redclaw crayfish: A prominent aquaculture species with invasive potential in tropical and subtropical biodiversity hotspots. *Rev. Aquac.* 13, 1488–1530. <https://doi.org/10.1111/raq.12531>.
- Holdich, D.M., Reynolds, J.D., Souty-Grosset, C., Sibley, P.J., 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 394–395, 11. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009025>.
- Huang, T., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1994. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* 126, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90243-7).
- Hulme, P.E., Bacher, S., Kenis, M., Klotz, S., Kühn, I., Minchin, D., Nentwig, W., Olenin, S., Panov, V., Pergl, J., Pyšek, P., Roques, A., Sol, D., Solari, W., Vila, M., 2008. Grasping at the routes of biological invasions: a framework for integrating pathways into policy. *J. Appl. Ecol.* 45, 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01442.x>.
- James, J., Mrugala, A., Oidtmann, B., Petrušek, A., Cable, J., 2017a. Apparent interspecific transmission of *Aphanomyces astaci* from invasive signal to virile crayfish in a sympatric wild population. *J. Invertebr. Pathol.* 145, 68–71. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.02.003>.
- James, J., Nutbeam-Tuffs, S., Cable, J., Petrušek, A., Mrugala, A., Vínuela-Rodríguez, N., Oidtmann, B., 2017b. The prevalence of *Aphanomyces astaci* in UK invasive signal crayfish: implications for native crayfish conservation. *Parasitology* 144, 411–418. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002419>.
- Keller, N.S., Pfeiffer, M., Roessink, I., Schulz, R., Schrimpf, A., 2014. First evidence of crayfish plague agent in populations of the marbled crayfish (*Procambarus fallax formosus*). *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 414, 15. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014032>.
- Kokko, H., Harlioglu, M.M., Aydin, H., Makkonen, J., Gökmen, G., Akcu, Ö., Jussila, J., 2018. Observations of crayfish plague infections in commercially important narrow-clawed crayfish populations in Turkey. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 419, 10. <https://doi.org/10.1051/kmae/2018001>.
- Kouba, A., Petrušek, A., Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 413, 05. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014007>.
- Kozubíková, E., Filipová, L., Kozák, P., Duris, Z., Martín, M.P., Diéguez-Urbeondo, J., Oidtmann, B., Petrušek, A., 2009. Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. *Conserv. Biol.* 23, 1204–1213. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01240.x>.
- Kozubíková, E., Puky, M., Kiszely, P., Petrušek, A., 2010. Crayfish plague pathogen in invasive North American crayfish species in Hungary. *J. Fish Dis.* 33, 925–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01199.x>.
- Kozubíková, E., Vrålstad, T., Filipová, L., Petrušek, A., 2011. Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan MGB real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.* 97, 113–125. <https://doi.org/10.3354/dao02411>.
- Lafitte, M., Baudry, T., Guilmet, M., Andrieu, T., Poulet, N., Duperray, T., Delaunay, C., Collas, M., Moumen, B., Grandjean, F., 2023. A new invader in freshwater ecosystems in France: the rusty crayfish *Faxonius rusticus* (Girard, 1852). *Biol. Invas.* Rec. 12, 457–468. <https://doi.org/10.3391/bir.2023.12.2.10>.
- Lele, S.F., Párvulescu, L., 2017. Experimental evidence of the successful invader *Oreoneutes limosus* outcompeting the native *Astacus leptodactylus* in acquiring shelter and food. *Biology* 72, 877–885. <https://doi.org/10.1515/biol-2017-0094>.
- Lipták, B., Mrugala, A., Pekárik, L., Mutković, A., Gufu, D., Petrušek, A., Kouba, A., 2016. Expansion of the marbled crayfish in Slovakia: beginning of an invasion in the Danube catchment? *J. Limnol.* 75, 305–312. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1313>.
- Lipták, B., Vitázková, B., 2014. A review of the current distribution and dispersal trends of two invasive crayfish species in the Danube basin. *Wat. Res. Manag.* 4, 15–22.
- Ložek, F., Patoka, J., Bláha, M., 2021. Another hitchhiker exposed: *Dicerocephala boschnai* (Platyhelminthes: Temnocephalida) found associated with ornamental crayfish *Cherax* spp. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 422, 25. <https://doi.org/10.1051/kmae/2021023>.
- Ludányi, M., Peeters, E.E., Kis, B., Roessink, I., 2016. Distribution of crayfish species in Hungarian waters. *Glob. Ecol. Conserv.* 8, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.09.009>.
- Maguire, I., Jelić, M., Klobučar, G., Delaunay, C., Delpy, M., Grandjean, F., 2016. Prevalence of pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Dis. Aquat. Org.* 118, 45–53. <https://doi.org/10.3354/dao02955>.
- Makkonen, J., Jussila, J., Panteleit, J., Keller, N.S., Schrimpf, A., Theissinger, K., Kortet, R., Martín-Torrijos, L., Sandoval-Sierra, J.V., Diéguez-Urbeondo, J., Kokko, H., 2018. MtDNA allows the sensitive detection and haplotyping of the crayfish plague disease agent *Aphanomyces astaci* showing clues about its origin and migration. *Parasitology* 26, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000227>.
- Makkonen, J., Kokko, H., Gökmen, G., Ward, J., Umeke, J., Kortet, R., Petrušek, A., Jussila, J., 2019. The signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in Lake Tahoe (USA) hosts multiple *Aphanomyces* species. *J. Invertebr. Pathol.* 166, 107218. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107218>.
- Martín-Torrijos, L., Kawai, T., Makkonen, J., Jussila, J., Kokko, H., Diéguez-Urbeondo, J., 2018. Crayfish plague in Japan: A real threat to the endemic *Cambaroides japonicus*. *PLoS One* 13, e0195353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195353>.
- Martín-Torrijos, L., Martínez-Ríos, M., Casabella-Herrero, G., Adams, S.B., Jackson, C.R., Diéguez-Urbeondo, J., 2021. Tracing the origin of the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, to the Southeastern United States. *Sci. Rep.* 11, 9332. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88704-8>.
- Martín-Torrijos, L., Hernández-Pérez, A., Monroy-López, J.F., Diéguez-Urbeondo, J., 2023. *Aphanomyces astaci* in Mexico: A new haplotype from dwarf crayfish *Cambarellus montezumae*. *J. Invertebr. Pathol.* 201, 108000. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108000>.
- Matasová, K., Kozubíková, E., Svoboda, J., Jarosík, V., Petrušek, A., 2011. Temporal variation in the prevalence of the crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*) in three Czech spiny-cheek crayfish populations. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 401, 14. <https://doi.org/10.1051/kmae/2011029>.
- Mojžišová, M., Mrugala, A., Kozubíková-Balcarová, E., Vlach, P., Svobodová, J., Kouba, A., Petrušek, A., 2020. Crayfish plague in Czechia: Outbreaks from novel



- sources and testing for chronic infections. *J. Invertebr. Pathol.* 173, 107390 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107390>.
- Mojžišová, M., Svobodová, J., Kozubíková-Balcarová, E., Štruncová, E., Stift, R., Bílý, M., Kouba, A., Petrušek, A., 2022. Long-term changes in the prevalence of the crayfish plague pathogen and its genotyping in invasive crayfish species in Czechia. *NeoBiota* 74, 105–127. <https://doi.org/10.3897/neoBiota.74.79087>.
- Mrugala, A., Kozubíková-Balcarová, E., Chucholl, C., Resino, S.C., Viljamaa-Dirks, S., Vukić, J., Petrušek, A., 2015. Trade of ornamental crayfish in Europe as a possible introduction pathway for important crustacean diseases: crayfish plague and white spot syndrome. *Biol. Invasions* 17, 1313–1326. <https://doi.org/10.1007/s10530-014-0795-x>.
- Mrugala, A., Kawai, T., Kozubíková-Balcarová, E., Petrušek, A., 2017. *Aphanomyces astaci* presence in Japan: A threat to the endemic and endangered crayfish species *Cambaroides japonicus*? *Aquat. Conserv.* 27, 103–114. <https://doi.org/10.1002/aqc.2674>.
- Novák, J., Kalous, L., Patoka, J., 2020. Modern ornamental aquaculture in Europe: early history of freshwater fish imports. *Rev. Aquacult.* 12, 2042–2060. <https://doi.org/10.1111/raq.12421>.
- Olden, J.D., Whattam, E., Wood, S.A., 2021. Online auction marketplaces as a global pathway for aquatic invasive species. *Hydrobiologia* 848, 1967–1979. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04407-7>.
- Padilla, D.K., Williams, S.L., 2004. Beyond ballast water: aquarium and ornamental trades as sources of invasive species in aquatic ecosystems. *Front. Ecol. Environ.* 2, 131–138. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0131:BBWAAO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0131:BBWAAO]2.0.CO;2).
- Panteleit, J., Keller, N.S., Kokko, H., Jussila, J., Makkonen, J., Theissinger, K., Schrimpf, A., 2017. Investigation of ornamental crayfish reveals new carrier species of the crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *Aquat. Invasions* 12, 77–83. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.1.08>.
- Panteleit, J., Keller, N.S., Diéguez-Urbeondo, J., Makkonen, J., Martín-Torrijos, L., Patrula, V., Pirvu, M., Preda, C., Schrimpf, A., Părvulescu, L., 2018. Hidden sites in the distribution of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in Eastern Europe: Relicts of genetic groups from older outbreaks? *J. Invertebr. Pathol.* 157, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.05.006>.
- Panteleit, J., Horváth, T., Jussila, J., Makkonen, J., Perry, W., Schulz, R., Theissinger, K., Schrimpf, A., 2019. Invasive rusty crayfish (*Faxonius rusticus*) populations in North America are infected with the crayfish plague disease agent (*Aphanomyces astaci*). *Freshw. Sci.* 38, 425–433. <https://doi.org/10.1086/703417>.
- Părvulescu, L., Schrimpf, A., Kozubíková, E., Cabanillas Resino, S., Vrålstad, T., Petrušek, A., Schulz, R., 2012. Invasive crayfish and crayfish plague on the move: First detection of the plague agent *Aphanomyces astaci* in the Romanian Danube. *Dis. Aquat. Org.* 98, 85–94. <https://doi.org/10.3354/dao02432>.
- Patoka, J., Kalous, L., Kopecký, O., 2014. Risk assessment of the crayfish pet trade based on data from the Czech Republic. *Biol. Invasions* 16, 2489–2494. <https://doi.org/10.1007/s10530-014-0682-5>.
- Patoka, J., Kalous, L., Kopecký, O., 2015. Imports of ornamental crayfish: the first decade from the Czech Republic's perspective. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 416, 04. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014040>.
- Patoka, J., Bláha, M., Devetter, M., Rylková, K., Čadková, Z., Kalous, L., 2016. Aquarium hitchhikers: Attached commensals imported with freshwater shrimps via the pet trade. *Biol. Invasions* 18, 457–461. <https://doi.org/10.1007/s10530-015-1018-9>.
- Patoka, J., Bláha, M., Kalous, L., Kouba, A., 2017. Irresponsible vendors: Non-native, invasive and threatened animals offered for garden pond stocking. *Aquat. Conserv.* 27, 692–697. <https://doi.org/10.1002/aqc.2719>.
- Patoka, J., Magalhães, A.L.B., Kouba, A., Faulkes, Z., Jerlikho, R., Vitule, J.R.S., 2018. Invasive aquatic pets: failed policies increase risks of harmful invasions. *Biodivers. Conserv.* 27, 3037–3046. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1581-3>.
- Putra, M.D., Bláha, M., Wardiatno, Y., Krisanti, M., Yonvitner, Y., Jerlikho, R., Kamal, M.M., Mojžišová, M., Bystrický, P.K., Kouba, A., Kalous, L., Petrušek, A., Patoka, J., 2018. *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) and crayfish plague as new threats for biodiversity in Indonesia. *Aquat. Conserv.* 28, 1434–1440. <https://doi.org/10.1002/aqc.2970>.
- Raghavan, R., Dahanukar, N., Tlustý, M.F., Rhyne, A.L., Kumar, K.K., Molur, S., Rosser, A., 2013. Uncovering an obscure trade: threatened freshwater fishes and the aquarium pet markets. *Biol. Conserv.* 164, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.04.019>.
- Rusch, J.C., Mojžišová, M., Strand, D.A., Svobodová, J., Vrålstad, T., Petrušek, A., 2020. Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota* 58, 1–32. <https://doi.org/10.3897/neoBiota.58.49358>.
- Scheers, K., Boets, P., Abeel, T., Van den Neucker, T., 2020. First records of alien crayfish of the *Procambarus acutus* species complex in Belgium. *Biol. Invas. Rec.* 9, 562–569. <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.3.11>.
- Schrimpf, A., Părvulescu, L., Copilaş-Ciocianu, D., Petrušek, A., Schulz, R., 2012. Crayfish plague pathogen detected in the Danube Delta – a potential threat to freshwater biodiversity in southeastern Europe. *Aquat. Invasions* 7, 503–510. <https://doi.org/10.3391/ai.2012.7.4.007>.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1999. The crayfish plague fungus: history and recent advances. *Freshw. Crayfish* 12, 11–35.
- Strand, D.A., Jinnerot, T., Aspán, A., Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Rolén, E., Vrålstad, T., 2023. Molecular detection of *Aphanomyces astaci* – An improved species specific qPCR assay. *J. Invertebr. Pathol.* 201, 108008. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108008>.
- Svoboda, J., Strand, D.A., Vrålstad, T., Grandjean, F., Edsman, L., Kozák, P., Kouba, A., Fristad, R.F., Bahadır Koca, S., Petrušek, A., 2014. The crayfish plague pathogen can infect freshwater-inhabiting crabs. *Freshw. Biol.* 59, 918–929. <https://doi.org/10.1111/fwb.12315>.
- Svoboda, J., Mrugala, A., Kozubíková-Balcarová, E., Petrušek, A., 2017. Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *J. Fish Dis.* 40, 127–140. <https://doi.org/10.1111/jfd.12472>.
- Svoboda, J., Fischer, D., Kozubíková-Balcarová, E., Šlátková, A., Brücková, M., Kouba, A., Petrušek, A., 2020. Experimental evaluation of the potential for crayfish plague transmission through the digestive system of warm-blooded predators. *J. Fish Dis.* 43, 129–138. <https://doi.org/10.1111/jfd.13109>.
- Teurlinckx, S., Kuiper, J.J., Hoevenaer, E.C., Lurling, M., Brederveld, R.J., Veraart, A.J., Janssen, A.B.G., Mooij, W.M., de Senerpont Domis, L.N., 2019. Towards restoring urban waters: Understanding the main pressures. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 36, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2018.10.011>.
- Tilmans, M., Mrugala, A., Svoboda, J., Engelsma, M., Petit, M., Soes, M.D., Oidtmann, B., Nutbeam-Tuffs, S., Roessink, I., Petrušek, A., 2014. Survey of the crayfish plague pathogen presence in the Netherlands reveals a new *Aphanomyces astaci* carrier. *J. Invertebr. Pathol.* 120, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.06.002>.
- Ungureanu, E., Mojžišová, M., Tangerman, M., Ion, M.C., Părvulescu, L., Petrušek, A., 2020. The spatial distribution of *Aphanomyces astaci* genotypes across Europe: Introducing the first data from Ukraine. *Freshw. Crayfish* 25, 77–87. <https://doi.org/10.5869/fc.2020.v25i.1.077>.
- van Ham, C., Genovesi, P., Scalera, R. (Eds.), 2013. Invasive Alien Species: the Urban Dimension, Case Studies on Strengthening Local Action in Europe. IUCN European Union Representative Office, Brussels. <https://portals.iucn.org/library/node/29131>.
- Vesely, L., Burič, M., Kouba, A., 2015. Hardy exotics species in temperate zone: can "warm water" crayfish invaders establish regardless of low temperatures? *Sci. Rep.* 5, 16340. <https://doi.org/10.1038/srep16340>.
- Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., 2019. A tentative new species *Aphanomyces fenicicus* sp. nov. interferes with molecular diagnostic methods for crayfish plague. *J. Fish Dis.* 42, 413–422. <https://doi.org/10.1111/jfd.12955>.
- Vorburger, C., Ribí, G., 1999. Aggression and competition for shelter between a native and an introduced crayfish in Europe. *Freshw. Biol.* 42, 111–119. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1999.00465.x>.
- Vrålstad, T., Knutsen, A.K., Tengs, T., Holst-Jensen, A., 2009. A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.* 137, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.022>.
- Weiperth, A., Gál, B., Kuriková, P., Bláha, M., Kouba, A., Patoka, J., 2017. *Cambarellus patucaensis* in Hungary: The first dwarf crayfish established outside of North America. *Biologia* 72, 1529–1532. <https://doi.org/10.1515/biolog-2017-0159>.
- Weiperth, A., Gál, B., Kuriková, P., Langrová, I., Kouba, A., 2019. Risk assessment of pet-traded decapod crustaceans in Hungary with evidence of *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) in the wild. *North West. J. Zool.* 15, 42–47.
- Weiperth, A., Bláha, M., Szajbert, B., Seprős, R., Bányai, Z., Patoka, J., Kouba, A., 2020a. Hungary: A European hotspot of non-native crayfish biodiversity. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 421, 43. <https://doi.org/10.1051/kmae/2020035>.
- Weiperth, A., Kouba, A., Csányi, B., Danyik, T., Farkas, A., Gál, B., Józsa, V., Patoka, J., Juhász, V., Părvulescu, L., Mozsár, A., Seprős, R., Staszny, Á., Szajbert, B., Ferincz, Á., 2020b. Az idegenhonos tíz lábú rákok (Crustacea: Decapoda) helyzete Magyarországon [The present status of non-native decapod (Crustacea: Decapoda) species in Hungary]. *Halászat* 113, 61–69 [In Hungarian with English summary].
- Weiperth, A., 2022a. Spiny-cheek Crayfish *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817), in: Harasthy L. (Ed.), Invasive Animal Species in Hungary. Duna-Ipoly National Park Directorate – Ministry of Foreign Affairs and Trade of Hungary, Budapest, pp. 119–121.
- Weiperth, A., 2022b. Signal Crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), in: Harasthy L. (Ed.), Invasive Animal Species in Hungary. Duna-Ipoly National Park Directorate – Ministry of Foreign Affairs and Trade of Hungary, Budapest, pp. 105–107.



b) Transmissions interspécifiques d'*Aphanomyces astaci* au sein de populations mixtes comprenant deux espèces d'écrevisse *Faxonius rusticus* et *Pacifastacus leniusculus*

En France, l'introduction d'une nouvelle espèce, l'écrevisse à tâche rouge *F. rusticus*, a récemment été recensée en Aveyron (Laffitte et al., 2023, Chapitre 1). Comme décrit précédemment, cette espèce cooccure avec l'écrevisse signal, *P. leniusculus* dans le ruisseau d'Inières en Aveyron ce qui donne la possibilité de transferts interspécifiques d'*A. astaci*. Parmi les méthodes de génotypage les plus couramment utilisées pour la discrimination des souches (Chapitre IV), nous en avons utilisé trois : deux portent sur des marqueurs nucléaires (microsatellites et qPCR) et l'une sur des marqueurs mitochondriaux par séquençage. Les microsatellites (SSR) permettent de confirmer les groupes génétiques décrits par RAPD : SSR-A, SSR-B, SSR-C, SSR-D et SSR-E (Grandjean et al., 2014). Ils peuvent être appliqués directement à partir d'extrait d'ADN d'individus infectés. Cependant, les auteurs ont montré qu'il est nécessaire d'avoir des niveaux d'infection compris entre A3 et A7 (selon l'échelle de Vralstad et al. 2009) pour leur efficacité. La méthodologie basée sur de la Q-PCR développée par Di Domenico et al, (2021), qui permet également de discriminer plusieurs groupes génétiques. Le séquençage des gènes mitochondriaux SSU/LSU (Makkonen et al. 2018) qui s'est révélé très polymorphe notamment dans l'aire de distribution des écrevisses nord-américaine a également été utilisé. Dans cette étude, 2 spécimens de chaque espèce étaient suffisamment infectés (niveau A5) pour utiliser ces méthodologies (plus de 1000 PFU pour la qPCR et plus de 200 PFU pour les microsatellites et le séquençage de l'ANDmt) (Mojžišová et al., 2020).

Matériel et Méthode :

Microsatellites

Pour chaque écrevisse, neuf marqueurs microsatellites ont été utilisés, afin de décrire les profils de *A. astaci* selon le protocole original développé par Grandjean et al. (2014). L'analyse des fragments a été réalisée sur un analyseur génétique SeqStudio Life Technologies (Applied Biosystems) et les tailles des allèles ont été déterminées avec le logiciel Stryper (Peccoud, 2023). Ensuite, par comparaison avec les microsatellites décrits (Grandjean et al., 2014), le génotype de chaque isolat a été déterminé. De plus, l'analyse des microsatellites a également été réalisée sur la souche Or 7a), isolé en 2016 aux États-Unis sur un spécimen de *F. rusticus*.



Génotypage par qPCR

Comme décrit dans Di Domenico et al, (2021), la réaction PCR a été réalisée sur cinq marqueurs nucléaires (Minardi et al., 2018), dans deux laboratoires différents, le laboratoire EBI de Poitiers et le département d'écologie à la faculté des sciences de Charles University à Prague. Le mélange réactionnel de 25 µL était composé de 2X de Master Mix environnemental TaqMan™ 2.0 (ThermoFisher), des deux amorces (0,5 µM), de la sonde TaqMan (0,2 µM), de 5 µL d'ADN matrice et d'eau sans nucléase afin de compléter le volume. Comme dans le protocole original, l'essai qPCR pour A-B et D-E a été réalisé en duplex. Le programme PCR comprenait un cycle de 20 sec à 95°C, 50 cycles de 15 sec à 95°C et 60 sec à 60°C, et un cycle final de 60 sec à 40°C. Le signal de fluorescence a été mesuré pendant l'étape d'hybridation. Comme contrôles positifs à la réaction, des matrices issues de cultures pures ou de tissus infectés provenant des différents génotypes ont été ajoutées à chaque amplification. Un contrôle négatif (spécimen non infecté par *A. astaci*) a également été ajouté. L'analyse a également été réalisée sur la souche Or 7a), isolée en 2016 aux États-Unis sur un spécimen de *F. rusticus*

Séquençage de l'ADNmt

Afin d'isoler les différentes séquences de chaque échantillon, un clonage bactérien a été réalisé. Une ligation dans un plasmide des séquences mitochondriales SSU/LSU (Makkonen et al., 2018 ; Martín-Torrijos et al., 2021) a été réalisée. Après avoir transformé les *E. coli* BL21 avec les plasmides générés, l'étalement sur milieu sélectif a permis d'isoler chaque séquence. L'haplotype de chaque clone a été déterminé par l'amplification et le séquençage de l'ADNmt (Makkonen et al., 2018 ; Martín-Torrijos et al., 2021), conformément au protocole décrit dans (Laffitte et al., 2024). Les séquences sens et antisens obtenues ont ensuite été alignées avec le logiciel BioEdit et comparées aux séquences de la littérature. Un séquençage illumina de fragment issu de l'amplification PCR des quatre échantillons a également été réalisé.

Résultats et discussion :

Le profil des allèles des microsatellites pour les quatre spécimens analysés a révélé deux génotypes différents, SRR-B pour les individus PaL-INIE2 (*P. leniusculus*) et FaR-INIE2 (*Faxonius rusticus*) et un génotype relativement complexe pour les deux individus PaL-INIE1 et FaR-INIE1. Ce profil plus complexe montre de nombreux locus hétérozygotes (5/9) ce qui est assez inhabituel si l'on se fie à l'ensemble des études de caractérisation génétiques des souches. De plus, pour l'échantillon FaR-INIE1, le locus Aasta 9 présente trois allèles alors que l'espèce *A. astaci* est diploïde (Figure 15). Ce profil allélique pourrait donc correspondre à la



présence de deux génotypes appartenant aux groupes SSR-B et SSR-Rust matérialisant un transfert interspécifique de souches. Celui-ci est confirmé pour l'individu FaR-INIE2 qui porte le génotype spécifique à l'espèce *P. leniuculus* (Grandjean et al., 2014).

Code	FaR-INIE1	FaR-INIE2	PaL-INIE1	PaL-INIE2	36	1	78	Outbreak	C
Source	INIE1	INIE2	INIE1	INIE2	Or7#c)	UEF7203-6	C18a	UP1-4	Kv1 (V1 03558)
Hôte	FaR	FaR	PaL	PaL	FaR	PaL	FaL	AaA	PaL
AST 2	142/148	142	142/148	142	142	142	142	142/148	152
AST 4	87	87	87/89	87	87	87	87/105	87	87
AST 6	148	148	148	148	148	148	148/157	148	148
AST 7	205/215	215	205/215	215	191/205	215	191/207	205/215	191
AST 9	164/168/182	164/182	164/168	164/182	164/168	164/182	164/182	164	164/168
AST 10	132/138	-	132/138	132	132	132	132/142	132/138	132
AST 12	226/240	226/240	226/240	226/240	240	226/240	226	226	226
AST 13	202	202	202	202	202	202	194/202	202	202
AST 14	248	248	248	248	248	248	246/248	248	248
Génotype	mixte	SSR-B	mixte	SSR-B	SSR-Rust	SSR-B	SSR-A	SSR-UP	SSR-C
Clonage de l'ADNmt	b	b	b	b	a	b	a	a	a
Séquencage Illumina ADNmt	b	b	b	b	-	-	-	-	-
QPCRg	B-C	B-C	B-C	B	C	B	A	B	C

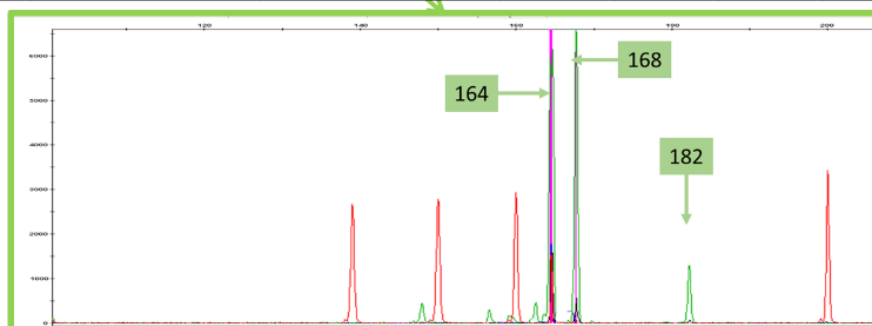


Figure 15 : composition allélique issue des neuf loci microsatellites pour les 4 spécimens de *P. leniuculus* et *F. rusticus*, pour les génotypes de référence, dont le génotype SSR-Rust nouvellement décrit par Panteleit et al. (2019). Les haplotypes mitochondriaux issus du clonage et du séquençage illumina sont reportés, ainsi les groupes génétiques de la QPCR génotypage. Pour chaque échantillon, le code, la source et l'hôte à partir duquel la souche a été analysée (adapté de Grandjean et al., 2014).

Les résultats de la Q-PCR génotypage, réalisée en collaboration avec Michaela Mojžišová (PhD) et Adam Petrussek (Professeur à l'université Charles de Prague, République tchèque), ont permis de détecter deux signaux différents de fluorescence dans trois des quatre individus testés. Le profil QPCR d'un des individus de *P. leniuculus* montre la présence d'une seule souche du groupe nucléaire B ce qui était attendu et confirme les résultats issus de l'analyse microsatellites. Par contre, les 3 autres individus montrent des profils correspondant aux groupes B et C (Figure 16). Ainsi, ces individus pourraient donc être co-infectés par deux



souches différentes, apportées initialement par les deux espèces hôtes. L'individu FaR-INIE2 semble cependant plus faiblement infecté par la souche du groupe, ce qui pourrait expliquer le fait qu'avec les microsatellites, seule la souche du groupe SSR-B a été caractérisée. L'analyse des gènes ADNmt a révélé que les spécimens testés étaient porteurs de l'haplotype b.

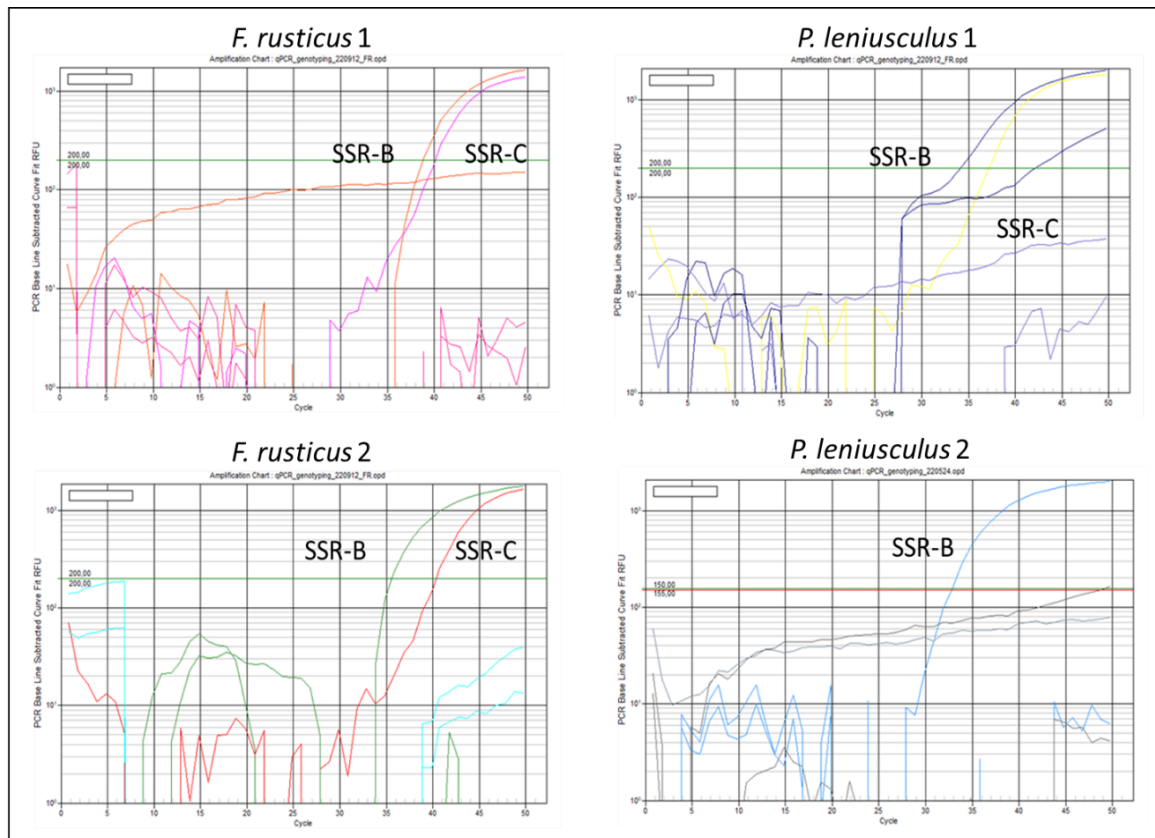


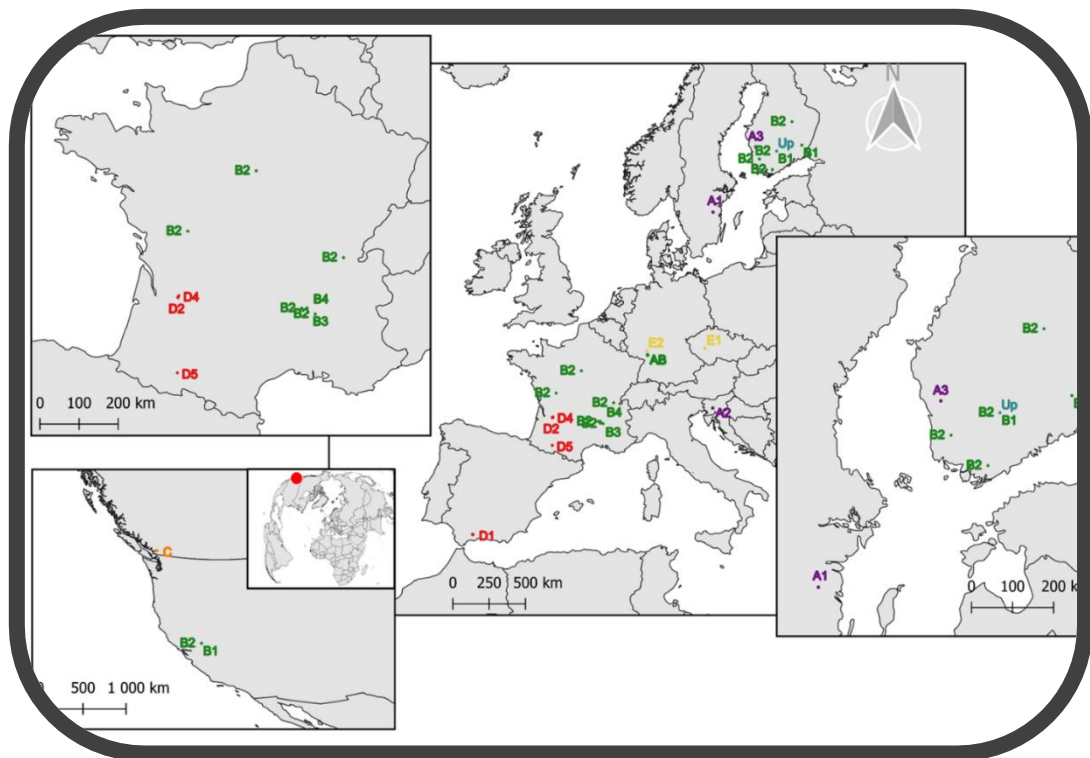
Figure 16: Profils des QPCR génotypages réalisés à partir des spécimens *P. leniusculus* et *F. rusticus* infectés sur le cours d'eau d'Inières.

Cette étude soutient l'hypothèse de transfert horizontal interspécifique entre espèces hôtes coexistantes. En effet, les résultats du test PCR (Di Domenico et al., 2021) ont clairement indiqué une combinaison inhabituelle de deux groupes génétiques chez trois spécimens, le groupe nucléaire B (spécifique à *P. leniusculus*) et C (spécifique à *F. rusticus*). Jusqu'à présent, ce groupe C n'a été documenté qu'à deux reprises, historiquement à partir d'un spécimen de *P. leniusculus*, avec la souche Kv1 (Huang et al., 1994) et plus récemment chez *F. rusticus* (Panteleit et al., 2019). Cependant, les profils microsatellites des souches de Inières semblent différer avec ceux de la souche Kv1, notamment pour les locus AST2 et AST7. À l'inverse, ils présentent des similitudes avec les profils de la souche Or 7a), isolé en 2016 aux États-Unis sur un spécimen de *F. rusticus* (Panteleit et al., 2019). La cooccurrence de ces deux espèces envahissantes dans le ruisseau est une configuration favorable à l'échange de souches de

pathogènes et à la co-infection d'individus par deux souches. Pour confirmer cette hypothèse il serait nécessaire d'isoler chacune des souches en culture axénique en suivant le protocole décrit par Martínez-Ríos et al. (2023), et d'établir leur profil génétique. Les qPCR génotypage ont révélé que pour les 3 spécimens présentant une combinaison inhabituelle de groupes génétiques, le groupe nucléaire B semblait dominant par rapport au groupe C, ce qui pourrait expliquer nos résultats. La compétition entre différentes souches pathogènes joue un rôle central dans la dynamique de propagation des maladies au sein des populations hôtes. Une souche dominante, potentiellement plus virulente, pourrait tuer l'hôte plus rapidement, limitant ainsi sa transmission. À l'inverse, une souche moins virulente pourrait persister plus longtemps dans la population. Ce phénomène est documenté dans plusieurs systèmes hôtes pathogènes -, où une virulence accrue conduit souvent à une réduction du potentiel épidémique en raison de la mortalité précoce des individus infectés (Alizon et al., 2009; Ebert, 1998). C'est l'hypothèse du « compromis » qui stipule que la virulence est une conséquence inévitable de la transmission des parasites. Cependant, d'après Alizon et al. (2009), de nombreux processus, comme l'adaptation des pathogènes à la compétition intra-hôte, les interactions avec le système immunitaire et les changements dans les modes de transmission sont des mécanismes qui impactent également l'évolution de la virulence et de la transmission. En outre, la compétition entre différentes souches peut exercer une pression évolutive sur celles-ci, modifiant ainsi leur virulence ou leur capacité de transmission au fil du temps (Martín-Torrijos et al., 2021). De plus, la compatibilité entre une souche pathogène et son hôte est un facteur déterminant de la réussite de l'infection et de la domination dans une population d'une souche. Par exemple, certaines souches de *Aphanomyces astaci* sont mieux adaptées à infecter certaines espèces d'écrevisses exotiques (Diéguez-Urbeondo et al., 1995). Pour finir, les conditions environnementales, telles que la température de l'eau, la qualité de l'habitat et d'autres facteurs écologiques, influencent également la dominance des souches pathogènes (Huang et al., 2018). Par exemple, des températures plus élevées peuvent favoriser la prolifération de souches appartenant au groupe de génotype D. Ces interactions complexes entre compétition, virulence et compatibilité avec l'hôte peuvent conduire à l'élimination des génotypes moins adaptés aux conditions locales. Ainsi, il serait crucial d'effectuer un suivi régulier des populations d'écrevisses et du pathogène dans la zone d'Inières, afin de mieux comprendre l'évolution de la compétition entre ces souches et leur impact sur la propagation de la maladie. Un suivi longitudinal permettrait de mesurer les changements dans la virulence et la transmission, ainsi que d'évaluer les effets des facteurs environnementaux sur ces dynamiques. Cela offrirait des informations essentielles pour la gestion de l'invasion et leurs pathogènes associés.

Chapitre 4 :

Diversité intragroupe génétique chez *Aphanomyces astaci*



Contexte :

La coexistence de populations sympatriques d'écrevisses nord-américaines au sein d'une même station a révélé un phénomène préoccupant : le transfert interspécifique de souches du pathogène *A. astaci* (Mojžišová et al., 2024 ; Chapitre III). Ce processus pourrait faciliter la circulation de souches plus virulentes et avoir des impacts négatifs sur les populations natives. En effet, la diffusion de souches particulièrement virulentes augmenterait les risques de mortalité massive au sein de ces populations. La caractérisation génétique du pathogène *A. astaci* revêt donc une importance cruciale pour suivre sa dissémination au sein des espèces exotiques, mais aussi pour surveiller les transferts interspécifiques dans le cadre de populations sympatriques et comprendre les dynamiques de propagation du pathogène (Grandjean et al., 2014 ; Martín-Torrijos et al., 2021 ; Mojžišová et al., 2024). Le développement de méthodes de génotypage performantes est donc nécessaire afin d'établir les profils génétiques des différentes souches de pathogène.

La méthode de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) a été la première méthode développée par Huang et al., en 1994, ayant permis de mettre en évidence la diversité génétique de *A. astaci* (Chapitre III). La méthode, basée sur l'amplification de fragments d'ADN à l'aide d'un mélange d'amorces choisi au hasard (Figure 17). Elle a permis de caractériser 5 groupes génétiques (RAPD-A, B, C, D et E). Par la suite, une méthode utilisant des enzymes de restriction, l'ALFP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a été développé (Figure RAPD), confirmant ainsi les groupes génétiques décrits par RAPD (Rezinciuc et al., 2014). Cependant, ces méthodes nécessitent des extraits d'ADN issus d'une culture pure, ce qui a limité leur utilisation dans des études épidémiologiques de grande ampleur en milieu naturel (ANNEXE 2). En effet, l'isolement d'une culture d'*A. astaci* est difficile à obtenir en raison de contamination très fréquente, notamment due à la croissance très lente de l'oomycète sur milieu gélosé. C'est pourquoi une autre approche de génotypage d'*A. astaci* a été mise au point, basé sur l'amplification de marqueurs moléculaires tels que des microsatellites (Figure 17). Les microsatellites sont des régions d'ADN hautement variables qui sont présentes dans le génome du pathogène. En analysant la longueur et la séquence de ces microsatellites, cela permet de définir des profils génétiques spécifiques pour chaque souche d'*A. astaci*. L'amplification de microsatellites est un protocole répétable et indépendant de la culture, permettant l'identification des génotypes d'*A. astaci* à partir d'extrait d'ADN isolé directement de la cuticule des individus. Les 9 marqueurs développés, permettent de distinguer les génotypes précédemment caractérisés par les RAPD : SSR-A, SSR-B, SSR-C, SSR-D et SSR-E



(Grandjean et al., 2014), et d'en décrire de nouveaux. Par exemple, le génotype SSR-UP a été isolé à partir d'un spécimen de *A. torrentium* proche des souches des groupes B et C. Ces marqueurs microsatellites, ont été largement utilisés pour comprendre la transmission horizontale d'*A. astaci* entre différents taxons d'hôtes, en particulier lors d'épidémies de peste (Collas et al., 2016; Laffitte et al., 2023, 2024; Mojžišová et al., 2024; Mojžišová, et al., 2022).

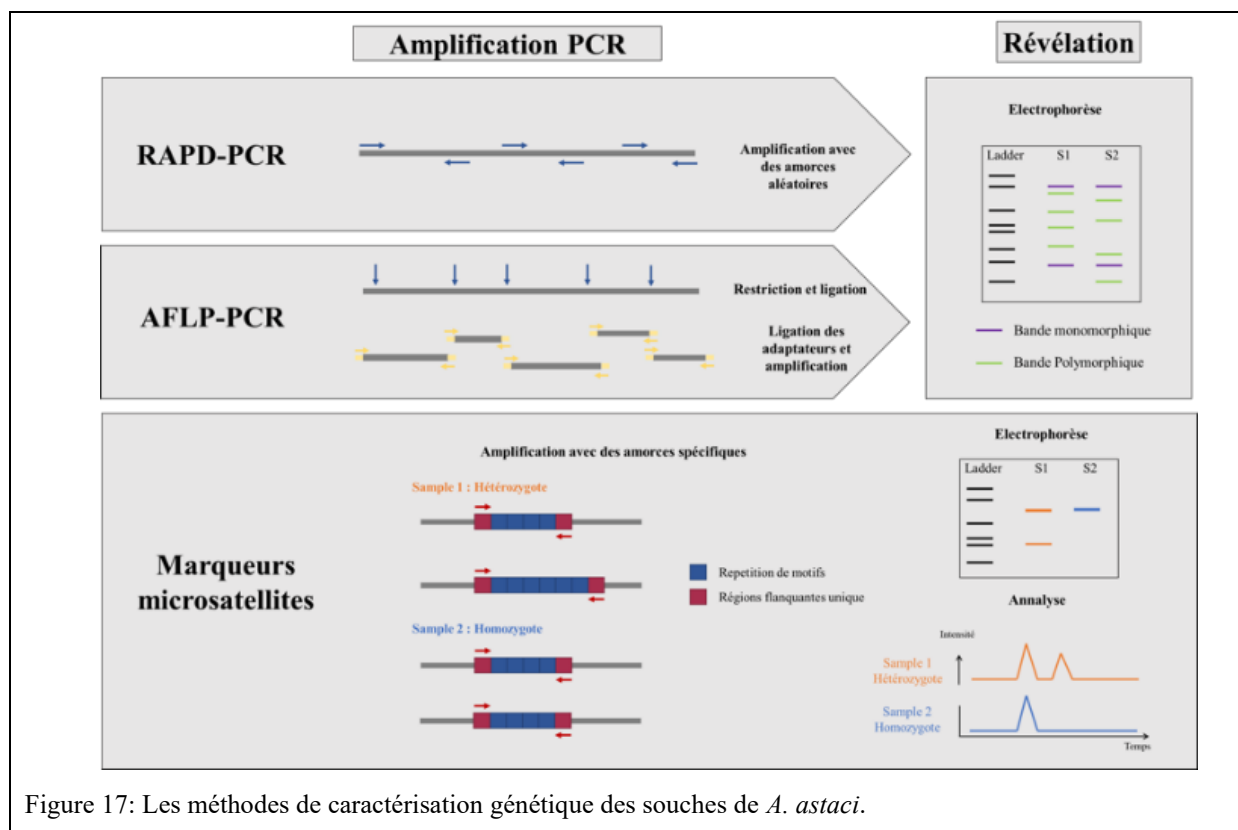
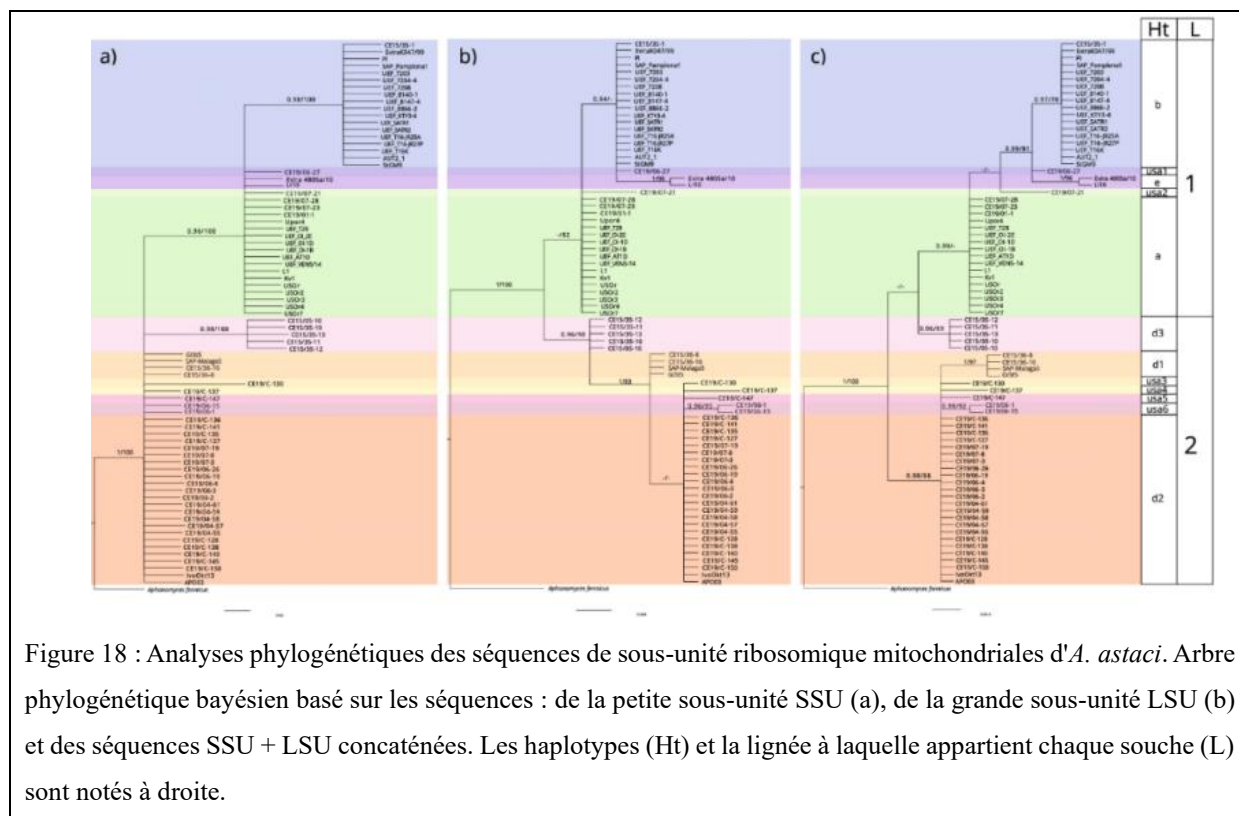


Figure 17: Les méthodes de caractérisation génétique des souches de *A. astaci*.

Par la suite, l'ADN mitochondrial est devenu un outil clef pour appréhender l'évolution et la migration géographique de nombreux organismes. Makkonen et al. (2016) ont ainsi identifié des séquences mitochondriales variables entre différentes souches. En effet, la petite (SSU) et la grande (LSU) sous-unités ribosomiques mitochondriales se sont révélées informatives pour évaluer la diversité génétique de *A. astaci*, à la fois dans les cultures pures, mais aussi dans les échantillons cliniques. À ce jour, l'ADNmt a permis de révéler six haplotypes en Europe et au Japon (a, b, d1, d2, d3 et e-haplotypes) et six haplotypes aux États-Unis (Usa 1, 2, 3, 4, 5, 6), répartis en deux lignées (Figure 18). L'ensemble des résultats concernant la diversité génétique de *A. astaci* ont été regroupés dans la Tableau 5. Les méthodes permettant de caractériser les souches développées jusqu'à présent sont complémentaires et sont utilisées concomitamment afin de croiser l'ensemble des informations obtenues.



Durant les dernières décennies, les études phylogénétiques de différentes souches d'*A. astaci* ont permis de mieux appréhender les interactions entre les différentes espèces d'hôtes et les souches de *A. astaci*. En Europe, la grande majorité des épidémies sont causées par l'un des quatre groupes de génotypes définis par RAPD, A, B, D ou E (Huang et al., 1994 ; Diéguez-Uribeondo et al., 1995 ; Kozubíková et al., 2011). Les diverses méthodes de génotypage d'*A. astaci* ont jusqu'à présent révélé une faible variabilité génétique au sein des groupes définis par la technique RAPD. Bien que complémentaires, les marqueurs microsatellites semblent cependant être une méthode plus performante que le séquençage de l'ADNmt pour analyser la diversité génétique des espèces clonales, comme *A. astaci* (Blair et al., 2006). Ainsi, l'objectif de cette étude était de développer de nouveaux microsatellites afin de détecter de la variabilité intragroupe au sein des souches d'*A. astaci*. Ces outils permettent non seulement de différencier les génotypes du pathogène, mais aussi de comprendre l'origine des épidémies et de suivre leur propagation dans les écosystèmes affectés.

Tableau 5: Tableau récapitulatif de la diversité génétique au sein du genre *A. astaci*. Les groupes génétiques définis à l'aide des trois méthodes principales, la RAPD-PCR, les microsatellites et le séquençage de l'ADNmt. De plus, la localisation de chaque groupe génétique est spécifiée ainsi que les espèces porteuses du pathogène (Grandjean et al., 2014; Jussila et al., 2017, 2021; Makkonen et al., 2018; Martín-Torrijos et al., 2018; Martín-Torrijos, Martínez-Ríos, et al., 2021; Mojžišová et al., 2020; Panteleit et al., 2019; Svoboda et al., 2017). Les astérisques correspondent à des exemples de transmission interspécifiques entre divers hôtes nord-américains dans le milieu naturel (Mojžišová et al., 2024).

Génotypes				Localisation	Espèces autochtones	Espèces américaines
Groupe	RAPD-PCR	Microsatellite	Haplotype			
A	RAPD-A	SSR-A	a	Europe et États-Unis	<i>A. astacus</i> <i>A. pallipes</i> <i>A. torrentium</i> <i>P. leptodactylus</i>	<i>F. rusticus</i> <i>F. limosus</i> <i>F. obscurus</i> <i>F. etnieri</i> <i>P. hybus</i> <i>P. acutus</i> <i>P. virginalis</i> * <i>P. clarkii</i> *
C	RAPD-C	SSR-C	a	Canada		<i>P. leniusculus</i>
UP	-	SSR-UP	a	Europe	<i>A. astacus</i> <i>A. torrentium</i> <i>P. leptodactylus</i>	
B	RAPD-B	SSR-B	b	Europe, Japon et États-Unis	<i>A. astacus</i> <i>A. pallipes</i> <i>A. torrentium</i> <i>P. leptodactylus</i>	<i>P. leniusculus</i> <i>P. virginalis</i> * <i>F. limosus</i> * <i>F. rusticus</i> *
E	RAPD-E	SSR-E	e	Europe	<i>A. astacus</i> <i>A. torrentium</i>	<i>F. limosus</i> <i>F. immunis</i>
D1	RAPD-D	SSR-D	d1	Europe et Japon	<i>A. pallipes</i> <i>A. torrentium</i>	<i>P. clarkii</i>
D2	RAPD-D	SSR-D	d2	Europe et États-Unis	<i>A. pallipes</i>	<i>C. shufeldtii</i> <i>P. clarkii</i> <i>P. abiusus</i> <i>P. fallax</i>
D3	RAPD-D	SSR-D	d3	Europe et Japon	<i>C. japonicus</i>	<i>P. clarkii</i>
Usa-1	-	-	Usa-1	États-Unis		<i>F. tricuspis</i>
Usa-2	-	-	Usa-2	États-Unis		<i>C. striatus</i>
Usa-3	-	-	Usa-3	États-Unis		<i>P. raneyi</i>
Usa-4	-	-	Usa-4	États-Unis		<i>Faxonius sp</i>
Usa-5	-	-	Usa-5	États-Unis		<i>C. shufeldtii</i>
Usa-6	-	-	Usa-6	États-Unis		<i>P. clarkii</i> <i>P. raneyi</i>

New microsatellite markers for detecting intragroup genetic variability in *Aphanomyces astaci*

Maud Laffitte, Brice Da Silva, Caterina Francesconi, Ljudevit Luka Boštjančić, Lena Bonnassin, Carine Delaunay, Kathrin Theissinger, Jean Peccoud, Frederic Grandjean

In Preparation

Contexte :

- La caractérisation génétique d'*A. astaci* est essentielle pour comprendre l'histoire coévolutive entre Hôtes/pathogènes, d'identifier les sources d'infection, et suivre les épidémies.

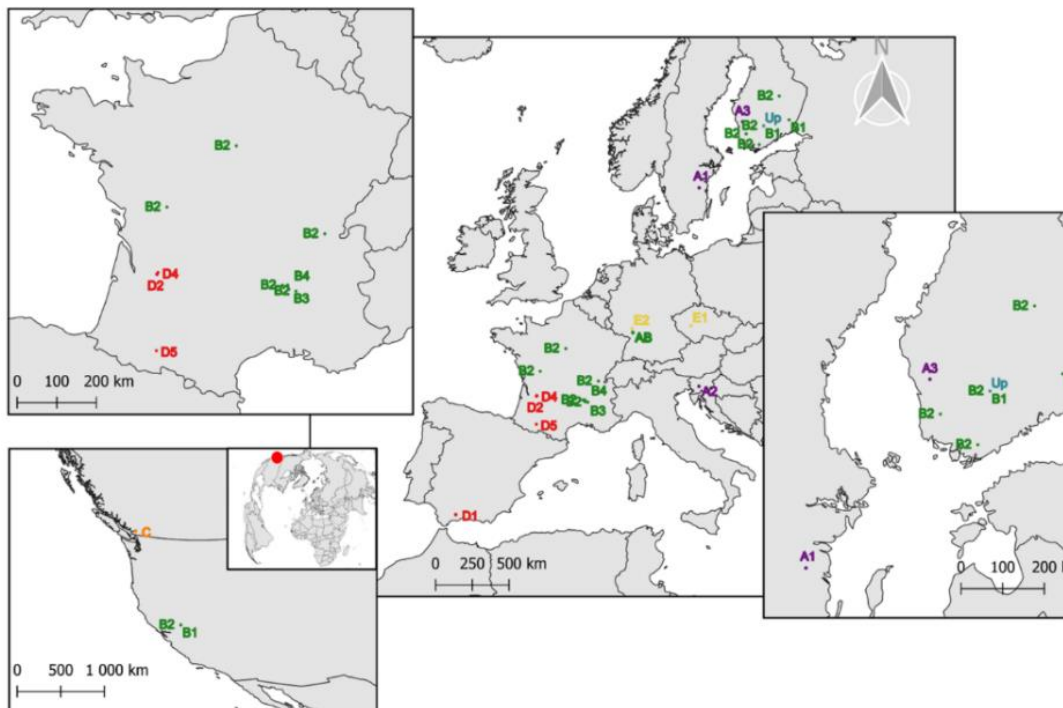
Résultats :

- Le développement de 15 marqueurs microsatellites très polymorphes a permis de révéler une variabilité intragroupe (SSR-A et SSR-B).
- Les génotypes SSR-B1 et SSR-B2 sont les plus fréquemment détectés en Europe et aux États-Unis.
- Le groupe SSR-UP a été décrit chez *P. leniusculus*, laissant supposer que cette espèce serait porteuse de 3 génotypes, SSR-B, SSR-C et SSR-UP
- Les trois souches de génotype SSR-A testées ont présenté de la variabilité intragroupe, ce qui laisse supposer d'une plus grande diversité génétique au sein de ce groupe.

Conclusion :

- Fort polymorphisme de ces nouveaux marqueurs
- Les résultats de cette étude sont cruciaux pour la gestion des populations d'écrevisses, en particulier pour cibler les efforts de contrôle sur les espèces envahissantes réservoirs de la peste et des transferts interspécifiques de souches

Résumé graphique :



New microsatellite markers for detecting intragroup genetic variability in *Aphanomyces astaci*

Maud Laffitte^a, Brice Da Silva^a, Caterina Francesconi^b, Ljudevit Luka Boštjančič^b, Lena Bonnassin, Carine Delaunay^a, Kathrin Theissinger^b, Jean Peccoud^a, Frederic Grandjean^a

^aLaboratoire Ecologie et Biologie des Interactions - Poitiers University - 3 Rue Jacques Fort, 86000, Poitiers, France

^b LOEWE Centre for Translational Biodiversity Genomics - Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre - Georg-Voigt-Str. 14-16, 60325 Frankfurt am Main, Germany

Corresponding Author *

Introduction :

During the last decades, fungal and fungal-like pathogens have impacted freshwater ecosystems causing several worldwide pandemics, leading to significant declines and even causing extinctions. One of the pathogens threatening aquatic ecosystems in Europe is the Oomycete *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague and one of the best-known pathogens of aquatic invertebrate. Specialises in freshwater crayfish, it has been classified among the 100th world's worst invasive alien species due to its virulence and severe impact on indigenous crayfish species (Simberloff & Rejmanek, 2019). This pathogen shares coevolutionary history with north American species and rapidly spread around the world through translocations of these chronic carriers. As a result, *A.astaci* is responsible in Europe of numerous mortality episodes and represents a real danger for native crayfish who, once infected, die within a few days.

Estimates of its first introduction in Europe are based on records of epidemics in native crayfish populations after translocations of North American species. The first known introduction occurred during the mid-19th century in Lombardy region of northern Italy (Alderman 1996). Subsequent large-scale introductions of the three majors North American carriers, the spiny-cheek crayfish *Faxonius limosus* (since 1890), the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (since 1959) and the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (since 1973), triggered further outbreaks of crayfish plague (Huang et al., 1994; Diéguez-Urbeondo et al., 1997). More recently, translocations of illegal species have led to new mass mortality episodes in many countries (Filipová et al., 2013; Mojžišová et al., 2024; Mrugała et al., 2014).

Improvements in *A. astaci*-specific molecular methods allowed the screening of crayfish populations, enabling direct detection in infected crayfish tissues and environmental samples (Oidtmann et al., 2006; Strand et al., 2023; Vrålstad et al., 2009). Furthermore, genetic



characterization of the *A. astaci* pathogen is crucial for understanding genetic diversity and monitoring the spread of populations in aquatic ecosystems. Development of genotyping methods is necessary to establish genetic profiles for identifying sources of infection, tracking epidemics, and implementing appropriate management measures. Initially, five genotype groups (A-E) have been identified by random amplified polymorphic DNA (RAPD) realised on axenic laboratory cultures of *A. astaci* (Diéguez-Urbeondo et al., 1995; Huang et al., 1994; Kozubíková, Viljamaa-Dirks, et al., 2011; Rezinciuc et al., 2014). Then, with the emergence of PCR technology, new *A. astaci* genotyping methods, including microsatellite markers, sequence-based approaches and Real-Time-PCR genotyping, become more prevalent due to their sensitivity, specificity, and efficiency. Applicable to clinical samples (infected crayfish tissue), these new methods revealed additional genetic variability in both disease outbreaks (Grandjean et al., 2014; Martín-Torrijos et al., 2018) and chronically infected crayfish (Martín-Torrijos, Martínez-Ríos, et al., 2021; Mrugała, Kawai, et al., 2017). Ungureanu et al. (2020) have summarized the *A. astaci* genotypes distribution in Europe from many sources, crayfish mass mortalities, chronically infected crayfish hosts and axenic laboratory cultures. Tracking *A. astaci* genotypes is crucial for investigating the natural history of crayfish plague in its invaded range, as well as understanding the sources and introduction pathways of the pathogen. The A genotype was described with a strain isolated from an infected Noble crayfish, *Astacus astacus* during a mortality event in Sweden (Huang et al., 1994). According to Alderman (1996), this group could be the first to have been introduced during the 19th century and likely responsible for the initial crayfish plague outbreaks in Europe. Group B, initially isolated from the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Huang et al., 1994), is widely distributed and linked to mortalities in various European regions. Group D, isolated from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Diéguez-Urbeondo et al., 1995), has mostly been detected in southwestern Europe, while E-group, originally isolated from the spiny-cheek crayfish *Faxonius limosus* (Kozubíková et al., 2011), has been reported in central Europe and Baltic countries that corresponding to the distribution of its crayfish host. Until now, almost all the European outbreaks that have been analysed have been associated with one RAPD-defined genotype groups, either isolated from invasive crayfish (genotypes B, D and E, Huang et al., 1994; Diéguez-Urbeondo et al., 1995; Kozubíková et al., 2011) or linked to historical mortalities (group A; Huang et al., 1994).

The several genotyping methods for *A. astaci* so far have shown limited genetic variability within RAPD-defined groups. Only the microsatellites methods developed by Grandjean et al in 2014 have revealed variability within group A. In addition, this method



unveiled a previously unidentified genotype, the genotype SSR-UP, isolated from a crayfish *Austropotamobius torrentium* in the Czech Republic, that other approaches have failed to distinguish. In the genomes of living organisms tandemly repeated simple sequences (SSR) are deeply informative and powerful tools in particular for species exhibiting low levels of genetic variability, recently derived populations and geographically close populations (Blair et al., 2006). Microsatellites markers seem to be ideal for characterizing genetic diversity in clonal species as *A. astaci*.

The aims of this study were to develop fifteen new microsatellites makers for *A. astaci* genotyping (i) to confirm the RAPD-defined genotype groups (ii) characterize genetic intra-group variability (iii) and to better understand the distribution and transmission of the crayfish plague pathogen in Europe and through the world. As the diversity of *A. astaci* remains largely unexplored, it is crucial to improve methods of genetic characterisation to work on the conservation management of endangered native crayfish. In this way, developing new microsatellites markers allowed to understand the transmission of the pathogen in epidemiologic study within invasive and native crayfish populations and to trace the origins of plague epidemics.

Matériels et Méthodes :

2.1. Oomycete strains and crayfish samples

The *A. astaci* strain collection was provided by the Translational Biodiversity Genomics laboratory, Senckenberg in Frankfurt (tableau 1). Furthermore, strains genotyped by Grandjean et al., in 2014 were used as reference, respectively L1, Pl, Kv, PC and Evira 4805a (Huang et al., 1994, Vrålstad et al., 2009, Diéguez-Uribeondo et al., 1995, Rezinciuc et al., 2013, Kozubíková et al., 2011a). Five other closely related oomycete taxa *Aphanomyces frigidophilus* (APO2A), *A. laevis/repetans* (D3), *Saprolegnia*. Ferax (Li19), *A. euteiches* (ATCC 201684) were also included in the analyses in order to evaluate cross-species amplification between selected markers (Table 2) (Sandoval-Sierra et al., 2014). In addition, DNA from crayfish sample were used in this study from highly infected *Procambarus clarkii* specimens and from one *A. pallipes* mass mortality episode that occurred in France (Table 1).

2.2 Microsatellites markers development and selection

Microsatellites makers were developed according to Megléc et al. (2014), with the recently sequenced AP03 strain genome (GenBank accession number GCA_000520075.1),



belonging to genetic group D and isolated from a *A. pallipes* population in La Garrotxa National Park in North-Eastern Pyrenees (Makkonen et al., 2016). The QDD version 3.1 program allowed to detect sequences with repeat units and to design primers between 18 and 27 bp to amplify fragments between 100 and 300 bp. Indeed 304 pairs of primers with a repeating unit number between 12 and 25 were selected. These primers were BLAST against others *A. astaci* genome from different genetic groups, the A-group: strain VI03557, B-group: strain VI3555 and E-group Evira4805 available in AphanoDB <https://www.polebio.lrsv.ups-tlse.fr/aphanoDB/>. 107 pair of primers revealing polymorphism between at least two strains were selected and the thirty with the highest number of repeats were tested by PCR according to Grandjean et al in 2014. At the end of these analyses, 15 pairs were retained to describe polymorphism (Table 2). The forward primers required for amplification of each selected locus were labelled by three fluorescent dye, 6-FAM, HEX and TET to analyses fragments sizes variations (Table 2).

2.3. Genotyping of the *Aphanomyces astaci* strain collection

The Internal Transcribed Spacer of each strain from the collection (Supplementary Table 1) was first sequenced in order to verify that they belonged to the genus *Aphanomyces astaci* (Martín-Torrijos, Martínez-Ríos, et al., 2021). Then, the haplotype of each sample was determined by the amplification and the sequencing of the SSU and LSU mitochondrial genes (Makkonen et al., 2018). Furthermore, the collection were characterize with old microsatellites using the original protocol (Grandjean et al., 2014) and fragment analysis were performed on a SeqStudio Genetic analyzer Life Technologies (Applied Biosystems).

To highlight genetic variability within the genus *A. astaci*, the strain collection was genotyped with the 15 new microsatellites markers. For this purpose, we have performed a PCR using the QIAGEN Multiplex PCR Kit according to the manufacturer's protocol instructions. The reaction was carried out in a final volume of 10µL with 1X multiplex master mix, 1X of Sol Q and 2µM of each primer for microsatellite loci. À 2,5ng/µL final concentration of pathogen pure culture genomic DNA were added in each tubes. The PCR program included 15 min at 95C°, 40 cycles of 30 sec at 95C°, 90 sec at 54C° and 60 sec at 72C°. Each PCR product was then diluted 10-fold and prepared for sequencing (9µL of Formamide, 0.5µL of Rox 500 and 0.5µL of diluted DNA for one reaction). Fragments were analyzed on a SeqStudio Life Technologies genetic analyzer (Applied Biosystems). Allele size was assessed using STRyper software (Peccoud, 2023).



2.4. Genotyping of *Aphanomyces astaci* in crayfish sample.

Captured crayfish were preserved in 96% ethanol. Tissue from one half of the abdominal cuticle, melanised spot and one uropod was dissected from each specimen using sterile tools (Söderhäll & Cerenius, 1998; Filipová et al., 2013). If the presence of melanisation spots was observed, the melanised parts were dissected as a priority to obtain sufficient DNA for genotyping and sequencing. Dissected tissues from each individual were collected in a single 2 mL tube and dried at 70°C until the ethanol had evaporated completely. The extraction of genomic DNA from crayfish cuticle was established according to the protocol of the "DNeasy Blood and Tissue Qiagen" kit (Filipová et al., 2013). The agent level was determined with the QPCR method developed by Vrålstad et al., in 2009. Then, we performed a PCR using the QIAGEN Multiplex PCR Kit same as above. The reaction was carried out in a final volume of 10 µL with 1X multiplex master mix, 1X of Sol Q and 2 µM of each primer for microsatellite loci. A final concentration between 2,5-6 ng/µL of infected crayfish sample DNA were added in each tube. After the PCR program, as previously, each PCR product was diluted 10-fold and prepared for a fragments analyze and allele size was assessed using STRyper software (Peccoud, 2023).

2.5 Genetic distance

To assess the similarity in alleles composition of analyzed *A. astaci* strains we calculated microsatellites genetic distance based on Cavalli-Sforza and Edward's chord measure (Oddone et al 2009 et Grandjean et al 2014). This analysis was conducted using GENETIX version 4.0.5.2 (Belkhir et al 1996-2004).



Table 1 : List of the *Aphanomyces astaci* strain collection and crayfish samples genotype. The origin, the crayfish host, the isolation date, the multilocus genetic group and the haplotype are provided. If the sample was previously use in a study, reference is notified

Code	Name of the strain	Date of isolation	Origine	Host species	Genotype group	Spécific intragroup génotype	Haplotype	Reference
<i>DNA strain collection of Aphanomyces astaci</i>								
A	L1	1962	Lake Ämmern, Sweden	<i>A. astacus</i>	SSR-A	SSR-A1	a	Huang et al. 1994
E	Li10	2011	Litavka River, Czech republic	<i>A. astacus</i>	SSR-E	SSR-E	e	Kozubíková-Balcarová et al. (2013)
7	KTY3-4	2008	Kuopio, Finland	<i>A. astacus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Makkonen et al 2018
19	T16-JR25C	2013	-	<i>A. astacus</i>	SSR-B	SSR-B1	b	-
29	VEN5/14 b)	2014	Lake Venesjärvi, Finland	<i>A. astacus</i>	SSR-A1	SSR-A3	a	Makkonen et al 2018
26	AT1D	2014	Lake Borovnisica, Slovenia	<i>A. torrentium</i>	SSR-A1	SSR-A2	a	Jussila et al 2017 ; Makkonen et al 2018
UP	UP1-4	2014		<i>A. torrentium</i>	SSR-Up	SSR-Up		
B	PI	1970	Lake Tahoe, USA	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Huang et al. 1994
C	Kv1 (VI03558)	1978	Lake Pitt, USA	<i>P. leniusculus</i>	SSR-C	SSR-C	c	Huang et al. 1994
1	UEF7203-6	2003	Lake Kukia, Finland	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B1	b	Makkonen et al 2012
6	UEF8147-4	2003	Lake Pyhäjärvi, Finland	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Makkonen et al 2012
8	SATR1	2012	Lake Saimaa, Finland	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B1	b	Jussila et al 2013
14	T16B	2013	Lake Tahoe, USA	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B1	b	Makkonen et al 2019
67	Sot 2a)	2003	Lake Pyhäjärvi, Finland	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Makkonen et al. (2012; 2018)
68	Sot 2b)	2003	Lake Pyhäjärvi, Finland	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Makkonen et al. (2012; 2018)
72	Puu 3f)	2018	Lake Puujärvi, Finland	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Makkonen et al. (2012; 2018)
71	Sel 1a)	2018	Lake Pyhäjärvi, Finland	<i>P. leniusculus</i>	SSR-Up	SSR-Up	a	Unpublished
32	O11 c)	2015	Speyer, Germany	<i>F. immunis</i>	SSR-A/SSR-B	SSR-A/B	a	Unpublished
78	C18a	2020	Runkedebunk, Germany	<i>F. immunis</i>	SSR-A/SSR-B	SSR-A/B	a	Unpublished
75	FL4a	2020	Kräppelweiher, Germany	<i>F. limosus</i>	SSR-E	SSR-E	e	Unpublished
36	Or 7a)	2016	Trout, USA	<i>F. rusticus</i>	SSR-R	SSR-R	a	Panteleit et al. in 2019
D	SAP-Málaga5	-	Malaga, Spain	<i>P. clarkii</i>	SSR-D	SSR-D1	d1	Makkonen et al 2018 ; Martin-Torrijos et al. (unpublished)
<i>DNA from crayfish sample of Aphanomyces astaci</i>								
	414	2023		<i>A. pallipes</i>	SSR-B	SSR-B1	b	Unpublished
	RIMA	2016	La petite Rimarde, France	<i>A. pallipes</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Laffitte et al . 2024
	EVE	2023	Eve, France	<i>A. pallipes</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Laffitte et al . 2024
	PERDONO	2021	Ardèche, France	<i>A. pallipes</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Unpublished
	Bap	2021	Bayse de Pouquet	<i>A. pallipes</i>	SSR-D	SSR-D4	d1	Laffitte et al . 2024
	RANT	2014	Fay-sur-lignon, France	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Unpublished
	CHEY	2016	Eyrieux-le-cheylard, France	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B 3	b	Unpublished
	BPAS	2020	Bon Pas, France	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B 4	b	Unpublished
	RUN	2016	Ruisseau noir, France	<i>P. leniusculus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Unpublished
	413	2018	?	<i>A. astacus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Unpublished
	414	2018	?	<i>A. astacus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Unpublished
	422	2018	?	<i>A. astacus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Unpublished
	479	2018	?	<i>A. astacus</i>	SSR-B	SSR-B2	b	Unpublished
	Lac	2021	Lacanaud, France	<i>P. clarkii</i>	SSR-D	SSR-D1	d1	Laffitte et al . 2024
	AYG	2021	Ayguemor, France	<i>P. clarkii</i>	SSR-D	SSR-D2	d1	Laffitte et al . 2024
	Mil2	2021	Saint-germin, France	<i>P. clarkii</i>	SSR-D	SSR-D3	d1	Laffitte et al . 2024

3.Results

3.1. Genetic characterization for the *A. astaci* strain collection

Clinical samples from the *A. astaci* collection isolated from different crayfish species and from multiple localities in Europe and North America were characterized by sequencing the two mtDNA regions LSU/SSU (Makkonen et al., 2018) and using 9 microsatellites markers (Aast2, Aast4, Aast6, Aast7, Aast9, Aast10, Aast12, Aast13, Aast14) (Grandjean et al., 2014). In this study, the haplotype a, was found in strains isolated from three invasive crayfish species (*F. immunis*, *F. rusticus* and *P. leniusculus*) and two native species (*A. astacus* and *A. torrentium*) following mass mortalities. Haplotype b was found in strains isolated from a single invasive crayfish species (*P. leniusculus*) and a native species (*A. astacus*) following mass mortalities. Finally, haplotype e was found in a strain isolated from *F. limosus* and *A. astacus*, haplotype c from *P. leniusculus*, and haplotype d1 from *P. clarkii* (Table 1). The 9 microsatellite loci of Grandjean et al. (2014) revealed the existence of 6 previously described genotypes belonging to the SSR-A1, SSR-B, SSR-C, SSR-D, SSR-E and SSR-Up groups (Table 1). In addition, we confirmed the new genotype associated to the species *F. rusticus* (named in this paper SSR-R) and described by Panteleit et al. in 2019. This genotype is similar to genotype B for loci Aast2, Aast4, Aast6, Aast9, Aast10, Aast13, Aast14 and is however different for loci Aast7 for which it is heterozygous and shares an allele with SSR-Up genotype and for loci Aast12 who is homozygous (Table 2). Furthermore, strain 32 and 78, isolated from *F. immunis* in Germany, have shown heterozygous profiles with alleles characteristic of the SSR-A (loci Aast6, Aast7, Aast10, Aast13, Aast14) and SSR-B (loci Aast2, Aast6, Aast9, Aast10, Aast13, Aast14).

		SSR group from Grandjean et al., 2014	SSR-A			SSR-Up		SSR-R	SRR-AB		SRR-B									SSR-C	SSR-D	SSR-E			
		Strain code	A (SSR-A2) 26 29			outbreak 71		36	78 32		B 1 6 7 8 14 19 67 68 72									C	D	E 75			
		Name of the strain	VI 03557	AT1D	VEN5/14 b)	UP1-4	Sel 1a)	Or7#(c)	C18a	OI1 c)	VI 03555	UEF7203-6	UEF8147-4	KTY3-4	SATR1	T16B	T16-JR25C	Sot 2a)	Sot 2b)	Puu 3f)	Kv1 (VI 03558)	VI 03556	Evira 4805a	FL4a	
Code	Primers	Host / Repeat motif	AsA	AuT	AsA	AuT	PaL	FaR	FaI	FaI	PaL	PaL	PaL	AsA	PaL	PaL	AsA	PaL	PaL	PaL	PaL	PrC	AsA	FaL	
SSR-2014																									
Aast2	F - GCTTGATGCTGTCTGGGT R - CAAAACGCTCATCCAAGCTA	AT(8)	158	158	158	142/148	142/148	142	142	142	142	142	142	142	142	142	142	142	142	142	152	138	148	148	
Aast4	F - TAGTGGTTCCTTTATCTCAAATGC R - CAGGACCCATGGGTTGTATGT	TA(8)	103	103	103	87	87	87	87/105	87/105	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	131	87/89	87/89	
Aast6	F - ACACCTTGAACAAGCCAGTG R - CAAGTCGACGAGGAGTACTCG	CGA(8)	157	157	157	148	148	148	148/157	148/157	148	148	148	148	148	148	148	148	148	148	148	148	148/157	148/157	
Aast7	F - CTGAATGGTGCTACTAGTACAATCG R - GCCCAATGGGATAGAGACTC	TA(8)	207	207	207	205/215	205	191/205	191/207	191/207	215	215	215	215	215	215	215	215	215	215	191	203	207	207	
Aast9	F - TCGGAAAGTTTGCCACTTG R - GCCAGGTATACGTTCTTACA	AT(7)	180	180	180	164	164	164/168	164/182	164/182	164/182	164/182	164/182	164/182	164/182	164/182	164/182	164/182	164/182	164/182	164/168	180	168/182	168/182	
Aast10	F - CATGACGACGACGATGAACC R - COTCCAATCAACGAAGAAGA	AT(7)	142	142	142	132/138	132/138	132	132/142	132/142	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	142	132/142	132/142	
Aast12	F - CCATGGCAACATCATCAAG R - CAGTGATATCGACTGTGTG	CA(6)	-	-	-	226	226	240	226	226	226/240	226/240	226/240	226/240	226/240	226/240	226/240	226/240	226/240	226/240	226	234	234/240	240	
Aast13	F - TCGACGTGTGTTGGCTTGA R - GCGTTCCTTAGTGTGTGTGA	TG(10)	194	194	194	202	202	202	194/202	194/202	202	202	202	202	202	202	202	202	202	202	202	194	194/202	194/202	
Aast14	F - CATTTCACGGGAATGTACA R - GTTCAGTGTGTCATTCATGTC	TG(6)	246	246	246	248	248	248	246/248	246/248	248	248	248	248	248	248	248	248	248	248	248	250	248	248	
New SSR																									
Aa1	F - ATATGGACAGCAAGGCAGC R - GACTGACAGCAACGTGTGTCTA	AT(41)	226	226	226	-	204/218	204	204/216	204/216	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	228	204/218	204/218	
Aa2	F - GGGTGCTTCCATGACCTT R - CCAATAAATCTCAATGTGCG	AT(32)	142	142	142	-	130	118/130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	150	142	130	130	
Aa3	F - TCCATTGAATCATGAAGC R - CGAAACTGGAGAATGCTTGG	AT(23)	206	206	206	-	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	160/178	150	150/152	
Aa4	F - AAATCGAGCTCGTCGAGAA R - AACGCGCTGATGAAAGTAA	AT(26)	224	224	224	-	214/218	214	216	216	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	226/242	214	210/214	
Aa5	F - TCAAAAGCCACTATATCC R - CACCATGTTGTGATCTTGA	AT(20)	170/172	170/172	170/172	-	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	182/200	170	170	
Aa6	F - CATTCCTCATGTGTCAAG R - CGATGATCATACAGTACAATCCAA	AT(20)	146	146	146	-	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	160	146	146	
Aa7	F - TCAGTGGAGGATAGCTGTG R - CATGTTTCAAGACGAGCAAA	AT(25)	178	178	178	-	172/174	168	178	178	172/174	172/174	172/174	172/174	172/174	172/174	172/174	172	172/174	172/174	168/174	174/198	168/178	168/178	
Aa8	F - GGCACATAATGGTACGGCT R - GTTGTACCGAGTTGTGGGG	AT(25)	304	304	304	-	260	296/302	260/302	260/302	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260/302	294	260/302	260/302	
Aa9	F - TACTCTGATCGAATCTGGG R - CTGTTTGGCAAGCATGGAC	AT(21)	278	278	278	-	274/278	274/278	274/278	274/278	274	274	274	274	274	274	274	274	274	274	274/288	272/286	274/278	274/278	
Aa10	F - CGCCGAGAGTCAGTCATA R - GGATCATCAATGGCTACAACC	AT(20)	167	167	167	-	159	-	159/175	-	159	159	159	159	159	159	159	159	159	159	159/175	163/179	159	159	
Aa11	F - GTCTGTGATGTCGGGATATC R - TCCATGAAATCGCTCAGTTT	AT(20)	158	158	158	-	158	154	150/158	150/158	154/158	154	154/158	154/158	154	154	154	154/158	154/158	154/158	160	156/158	154/158	154/158	
Aa12	F - AAATCGATATTGTTTCGACAAAGTG R - TGAATCGAATGCTATTTGG	AT(17)	200	198/200	198/200	-	182/218	182	182/206	182/206	218	218	218	218	218	218	218	218	218	218	194/218	186/196	184/204	184/204	
Aa13	F - TTGTGTGATCGTCGAGCGTC R - AGACGAGGTGTACGCACAT	AT(19)	233	233	233	-	225	225/231	227/233	227/233	225	225	225	225	225	225	225	225	225	225	225/231	243	235/239	235/239	
Aa14	F - GAAGGATGACCAAGTAGTAGCCA R - ATAATCAAGTGGAAACACCG	AT(19)	278/284	276/278	280	-	272/282	280	274/284	274/284	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274	276/284	274/280	274/280	
Aa15	F - AAGCCGTGATCCAGCTCTT R - ATCAGGAGCCTCGCTTT	AT(19)	123	123	123	-	121	119/121	113/119	113/119	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	115	113/121	113/121	
Haplotypes			a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	c	d2	e	e	

Table 2: Microsatellites table for the *A. astaci* strain collection. Locus code, reaped motifs, reverse and forward primers are noted in this table for 9 microsatellites developed by Grandjean et al in 2014 and the 15 new. The specific combination of alleles is given for the *A. astaci* strain collection and organized by genotype group following the classification of Grandjean et al in 2014 (SRR-A, B, C, D, E, UP). One more multilocus genotype (SSR-R) isolate from the *F. rusticus* strain is describe in this table. Furthermore, for each strain the haplogroup is specified.

Table 3 : Microsatellites variability within SRR-B genotype for infected crayfish tissues. Three loci were selected to screen heavily infected crayfish by SSR-B genotype (Aa12, Aa14, Aa15).

SSR genotype	SSR-B1					SSR-B2															SSR-B3	SSR-B4
Strain code	1	8	14	TDU	19	B	7	Crayfish	Crayfish	Crayfish	Crayfish	Crayfish	Crayfish	Crayfish	6	72	67	68	Crayfish	Crayfish	Crayfish	Crayfish
Name of the strain	UEF7203-6	SATR1	T16B	414	T16-JR25C	VI 03555	KTY3-4	413	414	422	479	Rima	Eve	Pedrono	UEF8147-4	Puu 3f)	Sot 2a)	Sot 2b)	Rant	Run	Chey	Bpas
Host / Repeat motif	PaL	PaL	PaL	AuP	AsA	PaL	AsA	AsA	AsA	AsA	AsA	AuP	AuP	AuP	PaL	PaL	PaL	PaL	PaL	PaL	PaL	PaL
Aa 12	154	154	154	154	154	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	154/158	146/158	152
Aa 14	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	274/282	272/282	280
Aa 15	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	119/121	119/121
Haplotypes	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b



3.2. Development of SSR markers to revealed intra-group variability for the *Aphanomyces astaci* strain collection

Among the candidate markers selected, 15 were successfully amplified under the PCR conditions and revealed polymorphism (Table 2). None of these loci have showed cross-amplification with other oomycetes species tested. Microsatellites from 2014 already allowed to distinguish variations among strains that are representing the genotype A (SSR-A1 and SRR-A2) due to a lack of amplification on the Aast12 locus. Strains 26 and 29 from our collection revealed the same pattern as the reference strain VI03557 that belong the SSR-A2 subgroup. The new developed microsatellite markers have revealed intragroup variability in loci Aa12 and Aa14 and allowed to discriminate 4 patters within the group A (SRR-A1, SSR-A2, SSR-A3 and SSR-A4). These strains were isolated from crayfish caught in three different counties in Europe: Slovenia, Sweden and Finland (Figure 1).

Besides, methods employed thus far (sequencing mtDNA, microsatellites ...) failed to detect any genetic variability within group B. The new developed microsatellite markers have revealed variability for loci Aa11 allowing to distinguish two patterns within the group B SSR-B1 and SSR-B2. 6 out of 10 strains from the collection are heterozygous for the Aa11 loci and the 4 remaining are homozygous. These strains were isolated from the West coast of the United States and from Finland where we both found the two génotypes (SSR-B1 and SSR-B2) (Figure 1). These new markers have also revealed genetic variability within the SSR- E genotype for loci Aa2 and Aa3.

3.3. Genotyping *A. astaci* crayfish sample

Various crayfish samples infected with strains belonging to the B-genotype were tested with the new markers. In France, the most frequently detected genotype is SSR-B2, found in invasive species *P. leniusculus* and during mass mortality episodes with *A. pallipes* and *A. astacus*. However, the SSR-B1 genotype led to a mortality episode in Ardèche in 2023. Furthermore, screening invasive populations has also revealed two new genotypes (SSR-B3 and SRR-B4) in two populations located in Ardecche department (Table 3). Finally, we have analyzed the DNA from, two invasive crayfish *P. clarkii* and a native *A. pallipes* (laffitte et al 2024) infected with the genotype SSR-D, haplotype d1. Microsatellites profiles exhibited variability across all the newly developed microsatellites with a minimum of two alleles detected per locus exanimated (Table 4).



3.4. Genetic similarity

The genetic distance between the analyzed genotypes from the *A. actaci* collection, express as a Cavalli Sforza and Edward chord distance calculated by combining all microsatellites multilocus, varied from 0,013 (SSR-B1 vs SSR-B2) to 1,011 (SSR-D vs SSR-C). The group SSR-A (0.08-0.103) was more variable than group SSR-B (0.013). Indeed, the group SSR-R was more like SSR-B, SSR-C and SSR-UP (0,358-0,399-0,401) than other genotypes (Table 5).

Table 5 : Cavalli-Sforza and Edward's genetic distance among *Aphanomyces astci* genotypes. The genetic distance was calculated including all the genotypes describe in this article. These distances are base on old microsatellites developed by Granjean et al in 2014 and the fifteen new.

	A2	A3	UP	Rust	AB1	AB2	B1	B2	B1	B2	B1	C	D	E1	E2
A1	0.081	0.103	0.925	0.970	0.680	0.680	0.970	1.002	0.970	1.002	0.970	1.002	0.845	0.766	0.766
A2		0.090	0.925	0.970	0.703	0.703	0.970	1.002	0.970	1.002	0.970	1.002	0.845	0.766	0.766
A3			0.925	0.925	0.703	0.703	0.970	1.002	0.970	1.002	0.970	1.002	0.867	0.735	0.735
UP				0.401	0.456	0.487	0.186	0.218	0.186	0.218	0.187	0.384	0.979	0.442	0.465
Rust					0.510	0.510	0.371	0.358	0.371	0.358	0.371	0.399	1.034	0.424	0.437
AB1						0.045	0.446	0.469	0.446	0.469	0.446	0.510	0.938	0.412	0.425
AB2							0.478	0.500	0.478	0.500	0.478	0.555	0.938	0.444	0.457
B1								0.013	0.000	0.013	0.001	0.317	0.989	0.397	0.414
B2									0.013	0.000	0.014	0.317	1.011	0.411	0.428
B1										0.013	0.001	0.317	0.989	0.397	0.414
B2											0.014	0.317	1.011	0.411	0.428
B1												0.321	0.993	0.397	0.414
C													1.011	0.487	0.514
D														0.929	0.961
E1															0.039

Discussion:

Molecular typing of *A. astaci* strains, enhances our understanding of the interactions between this pathogen and various host species. Genetic characterization of the *A. astaci* pathogen is crucial for understanding genetic diversity to establish genetic profiles for identifying sources of infection, tracking epidemics, and implementing appropriate management measures (Filipová et al., 2013; Martín-Torrijos et al., 2019; Mojžišová, Svobodová, et al., 2022; Mrugała, Kawai, et al., 2017; Vrålstad et al., 2009). In this study, we present additional microsatellites, developed in order to better understanding the genetic variability within and between different genotype groups of *A. astaci*. For this purpose, we have designed 15 new markers suitable for crayfish plague genotyping. They have enabled us to confirm the previously identified RAPD-defined genotype groups and reveal additional genetic diversity within these groups. These new markers were successfully applied on both DNA from axenic culture and from infected crayfish sample.

Regarding group B, these new microsatellite markers have uncovered intra-group variability, particularly with the loci Aa12, Aa14, and Aa15. These loci exhibit either homozygosity or heterozygosity depending on the defined patterns. Consequently, the study identified four patterns: SSR-B1, SSR-B2, SSR-B3, and SSR-B4. SSR-B1 and SSR-B2 appear to be the predominant patterns in Europe and have also been identified in strains from the United States. Additionally, SSR-B3 and SSR-B4 were found in specimens of *P. leniusculus* in France. Until now, no research had demonstrated variability within the genetic group B, despite it being one of the most observed groups in Europe. The signal crayfish is the only North American species known to carry group B. Torrijos et al.'s study, which examined the diversity of *A. astaci* strains in the United States, also detected the b haplogroup in a *P. leniusculus* specimen. However, genetic group B has recently been identified in three other species *P. virginialis*, *F. limosus*, and *F. rusticus* through interspecific transfers of *A. astaci* strains. Over time, such transfers could contribute to the emergence of variability within genetic group B.

Moreover, this study has revealed that the Sell1a) strain, isolated from the signal crayfish in Finland, exhibited an identical profile to the SSR-UP profile (Grandjean et al., 2014). This genetic variant was initially described following a mass mortality event in the Czech Republic involving the native species *Austropotamobius torrentium* (Grandjean et al., 2014). The authors of that study hypothesized that *P. leniusculus* played a role in this outbreak, as the SSR-UP genotype shows a strong similarity to the SSR-B and SSR-C genotypes, previously identified in this species. Our findings seem to support this hypothesis, as the Sel 1a strain was isolated



from the signal crayfish. This species is likely a carrier of three genetic groups: predominantly SSR-B, and more rarely SSR-UP (found in Finland and the Czech Republic) and SSR-C (observed in Sweden and Canada) (Grandjean et al., 2014; Huang et al., 1994).

In contrast, genetic group A has been isolated from numerous species across different families, including the *Cambaridae* (genus *Faxonius* and *Procambarus*) and the *Astacidae* (genus *Pacifastacus*) in both the United States and Europe. The SSR-A group belongs to a lineage considered ancestral in Europe, as it was responsible for the first mass mortalities on this continent (Souty-Grosset et al., 2006). This study identified three genetic patterns, SSR-A2, SSR-A3, and SSR-A4, which were found in individuals from the native species *A. torrentium* and *A. astacus*. The previous study by Grandjean et al. in 2014 had already highlighted genetic variability within this group. Indeed, it appears to be more diverse than group B, likely due to its spread within the genus *Faxonius*, which may have driven the genetic divergence of these strains. The identification of intra-group variability, particularly within group A, suggests that this group may have a complex evolutionary history.

These findings have significant implications for the management of crayfish populations. For example, identifying specific genotype groups associated with particular invasive crayfish species can help target control efforts more effectively, reducing the spread of the pathogen to vulnerable native populations (Martín-Torrijos et al. 2021). In addition, the development of these markers also advances our understanding genetic diversity of *A. astaci*. The high level of resolution provided by these markers, as seen in their ability to differentiate between closely related strains, makes them a powerful tool for future studies on the evolution and spread of this pathogen. These markers could be particularly useful in tracing the origins of new outbreaks and understanding the pathways through which *A. astaci* is introduced into new environments (Ungureanu et al. 2020).

In conclusion, the new microsatellite markers developed in this study provide a valuable tool for both basic and applied research on *A. astaci*. They offer a means to explore the genetic diversity of this pathogen more thoroughly, aiding in the conservation of endangered crayfish species and the management of invasive species. Future research should focus on applying these markers to larger and more diverse populations to further elucidate the evolutionary history and epidemiology of *A. astaci*. In the future, it would be very interesting to extend this study to the United States in order to better understand the co-evolutionary history between crayfish and *A. astaci*.

Chapitre 5 :

Réponse immunitaire de l'écrevisse *Astacus astacus* en réponse à une infection



Développer des marqueurs moléculaires pour suivre la réponse immunitaire des écrevisses autochtones *Astacus astacus*.

Maud Laffitte*, Ljudevit Luka Boštjančić, Mohamed Said Ramdani, Hélène Paulhac, Carine Delaunay, Kathrin Theissinger and Frederic Grandjean

In Preparation

Contexte :

- Les écrevisses sont un modèle clé pour l'étude de l'immunité en raison de leur importance pour l'aquaculture et la conservation, notamment dans leur interaction avec le pathogène *Aphanomyces astaci*
- Apparition de cas de résistance à la peste des écrevisses dans plusieurs populations autochtones d'Europe.
- Il est nécessaire de développer des marqueurs immunitaires pour suivre l'évolution de ces résistances

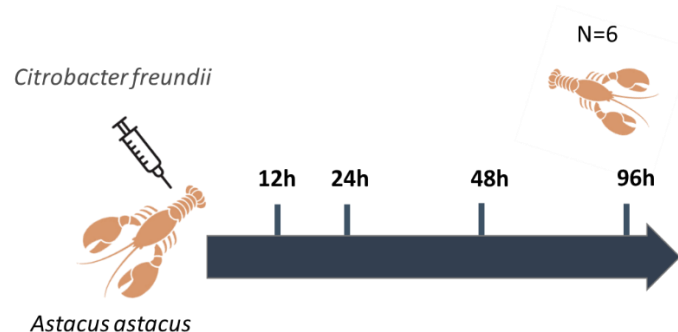
Résultats :

- Augmentation significative du nombre total d'hémocytes (THC) 24 h après l'injection de bactéries
- Activation de la voie de la phénoloxydase au cours de l'infection qui se manifeste par la transcription des gènes codant ces enzymes 12 heures après l'infection, suivie d'une augmentation de l'activité de la PO dans le plasma 96 heures après l'infection
- Surexpression du facteur de transcription CCAAT/enhancer-binding protein beta (CEP) dans l'ensemble des tissus 12 heures après l'infection
- Surexpression de la crustine 1 et de l'innexine dans les branchies 12 heures après l'infection

Conclusion :

- Développement et application de nouveaux marqueurs cellulaires, transcriptomiques et enzymatiques
- Utilisation des marqueurs pour cartographier l'expression des gènes immunitaires et identifier des populations autochtones susceptibles de mieux résister face à certains pathogènes
- Améliorer les pratiques de gestion et de repeuplement des populations autochtones
- Les interactions entre *A. astaci* et les espèces européennes sont des modèles dans l'étude de la coévolution entre hôtes et pathogènes

Résumé graphique :



Contexte :

Chez les invertébrés, comme les crustacés, l'immunité innée est le seul mécanisme de défense capable de prévenir, de reconnaître et d'éliminer un pathogène. Parmi les crustacés, les écrevisses sont un modèle majeur dans la compréhension des mécanismes immunitaires, en raison de son importance pour l'aquaculture et la conservation. L'interaction entre les écrevisses et le pathogène *Aphanomyces astaci* est particulièrement étudiée du fait de leur impact sur les populations d'écrevisses européennes notamment. Les espèces américaines, résistantes, sont des modèles très intéressants de courses aux armements évolutives permettant de mieux appréhender les interactions hôtes pathogènes.

Chez les invertébrés, les hémocytes sont les cellules de l'immunité innée, responsables de la phagocytose, de l'encapsulation, de la mélanisation et de la cicatrisation. Elles sont produites et maturées dans l'organe hématopoïétique (HPT) (Bouallegui, 2021 ; Söderhäll et al., 2022). Chez les écrevisses, trois morphotypes ont été décrits : les cellules granulaires (GC) très abondantes, les cellules semi-granulaires (SGC) et les cellules hyalines (HC), rares (Li et al., 2021; I. Söderhäll et al., 2022). Les GC, qui contiennent de nombreux granules, sont les principales cellules qui stockent la prophénoloxydase (PPO) et les enzymes de coagulation. La PPO (forme inactive) et la PO (forme active) sont des enzymes clefs du système immunitaire des écrevisses, car elles jouent un rôle majeur dans la mélanisation qui participe à la neutralisation des pathogènes. L'activation de la PO et la formation de mélanine agissent comme des signaux pour recruter et activer d'autres composants du système immunitaire de l'écrevisse. Cela inclut le recrutement des hémocytes dans la zone d'infection qui participent à la phagocytose ou à l'encapsulation et à la destruction des pathogènes (Johansson et al., 1999; Lin et al., 2007).

Les écrevisses possèdent également d'autres acteurs humoraux de la réponse immunitaire, comme, les peptides antimicrobiens, les ROS (Reactive Oxygen Species), des protéines de choc thermique (HSP), des enzymes hydrolytiques et des innexines. Lors d'une infection par un pathogène, l'ensemble de ces mécanismes médiés par des composants cellulaires et humoraux peuvent être activés par l'organisme. Les écrevisses possèdent des PRR (Pattern Recognition Receptors) présents à la surface des cellules, capable de reconnaître des motifs spécifiques au pathogène, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). La reconnaissance de ces motifs entraîne l'activation des différentes cascades de réponses cellulaires (phagocytoses, encapsulation ...) et humorales (ROS, peptides antimicrobiens ...) (Söderhäll & Cerenius, 1992).



Plusieurs études ont déjà permis de mieux comprendre les mécanismes immunitaires mis en place par l'écrevisse à pattes rouges *Astacus astacus* lors d'une infection par *A. astaci*. Tout d'abord, Becking et al. (2015) ont étudié la réponse immunitaire de cette espèce, en condition contrôlée, en infectant celles-ci par 3 souches des groupes génétiques A, B et E, possédant des virulences variées. Divers paramètres ont été étudiés, la mortalité, la concentration en hémocytes, l'activité de la phénoloxydase et la production de ROS. Ils ont constaté que tous les paramètres testés (taux d'hémocytes circulants, activité PO et production du ROS) évoluaient de la même façon pour les différentes conditions (souches/concentration de spores). Les modulations observées par rapport au témoin étaient d'autant plus marquées que la charge en pathogènes était plus forte. Un décalage de la réponse immunitaire en adéquation avec la virulence des souches a été observé, plus la souche était virulente, plus la réponse intervenait tôt. Une chute hémocytaire rapide a également été observée ainsi qu'une forte augmentation de l'activité PO dans les premiers jours suivant l'infection. Plus récemment, Boštjančić et al., (2022), ont publié une étude transcriptomique qui compare la réponse immunitaire de *A. astacus* et *P. virginalis* infectés par différentes souches d'*A. astaci* (VEN5/14, peu virulente et UEF_T16B, très virulente). Cette étude transcriptomique a été réalisée sur des tissus de l'hépatopancréas qui jouent un rôle majeur dans l'immunité et le métabolisme. Il participe à la clairance des pathogènes, au processus de détoxification et de traitement des contaminants, tels que les métaux lourds (Boštjančić et al., 2022). Leur expérience a révélé différents mécanismes impliqués dans la mise en place de la réponse immunitaire chez les écrevisses sensibles, tels que la reconnaissance du pathogène (récepteur β -1-3 glucane), la transcription (C/EBP- β /KFL), la toxicité avec des peptides antimicrobiens (Custine, AFLs), les voies de la phénoloxydase (PPO, Peroxinectine, arylsulfatase), des HSP, des innexines et de l'apoptose (E3 ubiquitine). Cette étude a permis de générer une liste de gènes différentiellement exprimés au cours de l'infection et les grandes fonctions immunitaires associées. Cependant, elle a été réalisée avec un seul temps de prélèvement post-infection de 3 jours, et ne permet pas de décrire la mise en place des mécanismes immunitaires, notamment lors des temps précoces.

Récemment, des cas de résistance à la peste des écrevisses sont observés dans plusieurs populations autochtones européennes (Francesconi et al., 2021a; Makkonen, Jussila, Kortet, et al., 2012; Martín-Torrijos et al., 2017). Ces découvertes soulèvent des interrogations quant à l'apparition de nouvelles résistances dans d'autres populations ainsi qu'à leur surveillance sur le long terme. Cependant, l'évaluation de la résistance des écrevisses autochtones à la peste reste complexe, en raison de la variabilité de la virulence des souches, mais aussi du peu d'outils développés jusqu'à présent. Ainsi, l'objectif de notre étude est de développer des marqueurs de



la réponse immunitaire des écrevisses autochtones afin de mettre au point des outils permettant de suivre leur réponse individuelle lors d'une infection à différents niveaux, cellulaires, enzymatiques et génétiques. Cette approche est une étape clef qui permettra de caractériser les populations résistantes et de développer des stratégies de conservation plus efficaces. Comme nous n'avons pas pu obtenir des spores lors de la culture de souches d'*Aphanomyces astaci* maintenues au laboratoire depuis plus d'une dizaine d'année, nous avons opté pour une infection bactérienne par *Citrobacter freundii* présente dans le milieu naturel et pathogène pour les écrevisses (Li et al. 2022) retrouvée chez les écrevisses invasives afin de mettre au point la méthodologie et obtenir des résultats préliminaires.

Matériel et méthode :

1) Le modèle d'étude

Au total 80 écrevisses mâles de l'espèce *A. astacus* ont été achetées à la ferme aquacole de Thonnance les Joinvilles (52) en France. La taille et le poids de chaque spécimen variaient entre 12 et 32 g et 7 et 9 cm. Les écrevisses ont été transportées dans une glacière contenant des blocs réfrigérants afin de les maintenir calmes et d'éviter les agressions. Une fois au laboratoire, les écrevisses ont été isolées dans des aquariums de 50 L branchés en séries, dans des conditions contrôlées de températures (15°C) et d'oxygénation. Les écrevisses ont été acclimatées dans les bacs 18 jours.

2) Culture des bactéries *Citrobacter freundii*

Pour tester l'expression basale de ces marqueurs lors d'une infection, nous avons inoculé des écrevisses *A. astacus*, avec *Citrobacter freundii*, une bactérie Gram-négative et pathogène opportuniste qui appartient à la famille des Enterobacteriaceae. La souche *Citrobacter freundii* ATCC 43864 utilisée pour cette expérience a été achetée auprès du laboratoire Humeau sous forme de disque lyophilisé. Dans des conditions stériles, le disque a été dissous dans 1mL de milieu liquide LB puis isolé en strie avec un écouvillon sur une boîte de pétri contenant du milieu LB agar. Les boîtesensemencées ont été placées à 28°C pendant une nuit. Le lendemain, les boîtes contenant des colonies isolées ont été placées à 4°C afin de stopper la croissance bactérienne. La veille de l'infection, une culture liquide issue d'une colonie de *C. freundii* a été réalisée dans un erlenmeyer contenant 100mL de milieu liquide LB et placé à 28 °C, sous agitation durant la nuit. Afin d'obtenir un culot et d'éliminer le milieu de culture, la culture liquide a été centrifugée à 8000 rpm pendant 10 min à 4°C puis le culot a été lavé à trois reprises avec une solution de PBS. Ensuite, une solution de 3.4×10^4 soit environs 1/10 de la LD50 ($2,7 \times 10^5$) chez *P. clarkii* a été réalisée avec du PBS.



3) Design expérimental

Le jour de l'infection, 100 μ L de culture de *Citrobacter freundii* a été injecté avec une aiguille stérile au niveau du 3^{em} segment abdominal de 40 individus. De plus un groupe témoin de 25 individus a été injecté avec 100 μ L de PBS et 15 n'ont pas été injectés. Des prélèvements aléatoires et dissections de spécimens infectés et témoin ont ensuite été réalisés à différents temps postinfection (12h, 24h, 48h et 96h, Figure 19). La survie des individus restants a été relevée quotidiennement pendant 25 jours. Lors des dissections, les individus ont préalablement été placés sur de la glace. L'hémolymph a été prélevée dans le thorax et l'abdomen à l'aide d'une aiguille stérile contenant 1mL d'anticoagulant (0.14 M NaCl, 0.1 M glucose, 30 mM trisodium citrate, 26 mM acide citrique, 10 mM EDTA, pH 4.6). Un aliquot de 50 μ L d'hémolymph a été conservé afin de dénombrer les hémocytes circulants. Pour cela, trois répliques contenant 10 μ L d'hémolymph dilués au $\frac{1}{4}$ et 10 μ L de bleu de trypan ont été réalisés, et analysé par un compteur cellulaire automatique (Countess 3, Invitrogene). Le reste de l'hémolymph prélevé lors de la dissection a été centrifugée à 1300g pendant 10 minutes à 26°C pour séparer le plasma des hémocytes. Ensuite, afin de limiter la souffrance animale, le cerveau a été détaché par une incision entre les yeux. Les branchies, les muscles de la queue et l'hépatopancréas ont été prélevés et conservés dans l'azote liquide, puis stocké à -80°C.

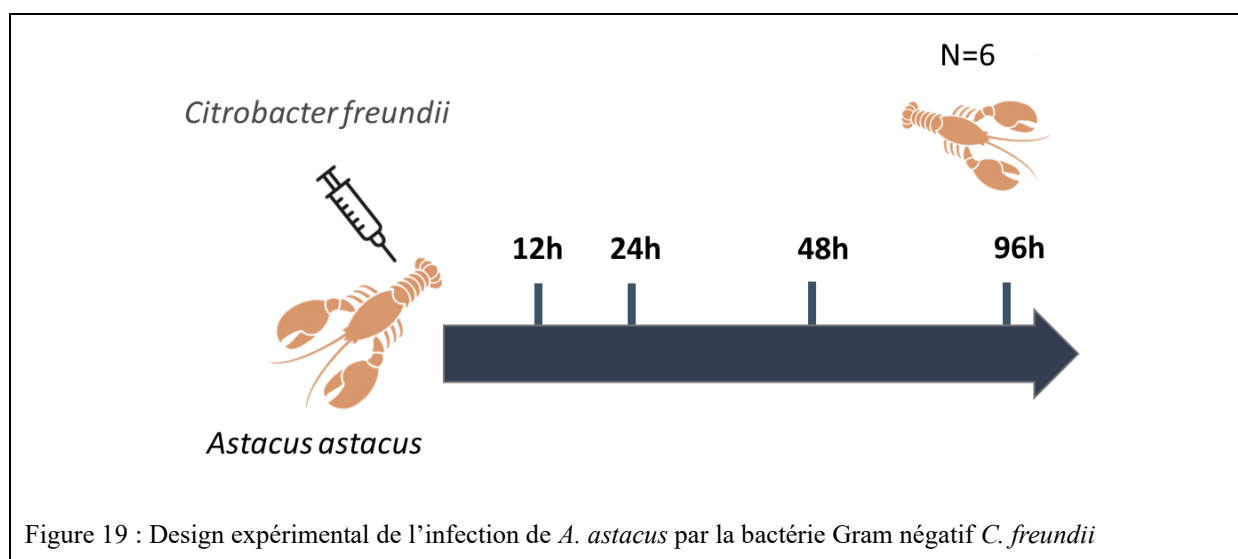


Figure 19 : Design expérimental de l'infection de *A. astacus* par la bactérie Gram négatif *C. freundii*

4) Activité de la phénoloxydase

L'activité de la phénoloxydase a été mesurée au sein des hémocytes et du plasma. Pour chaque individu, 1mL d'hémolymph a été prélevé et complété de moitié par la solution d'anticoagulants. L'hémolymph a été centrifugée 10 minutes à 1300g à 4°C et le plasma aliquoté et conservé dans la glace. Pour les hémocytes, le culot a été resuspendu dans 1mL de

tampon de lavage (10nM cacodylate de sodium, 250mM de sucrose et 20mM de CaCl₂, pH7) avant d'être de nouveau centrifugé 10 minutes à 1300g à 4°C. Ensuite le culot a été resuspendu dans 200µL de buffer d'homogénéisation (10nM cacodylate de sodium, 20mM de CaCl₂, pH7) et soniqué 3x30s à 30mA. Finalement, le volume a été complété avec du tampon d'homogénéisations pour atteindre le volume initial d'hémolymphe prélevée. La solution obtenue a ensuite été centrifugée 20min à 16000g à 4°C et le surnageant conservé sur glace.

De la même façon pour les hémocytes et pour le plasma, l'activité de la phénoloxydase est suivie au cours d'une cinétique de réaction (oxydation du substrat) par densité optique (DO). 50µL d'hémocytes ou de plasma sont déposés dans chacun des puits d'une plaque 96 puits en triplicat et recouverts de 25µL de SDS (12mM). Le SDS est un éliciteur de la phénoloxydase et la L-Dopa le substrat. Pour les témoins négatifs, le SDS est remplacé par de l'eau bidistillée. Ensuite, 25µL de tampon d'homogénéisation est ajouté à chaque puits supplémenté ou non de PTU (1mg/mL. La plaque est alors laissée à incuber 45min à 37°C et 50µL de L-Dopa 20mM dissous dans du tampon d'homogénéisation est ajouté à chaque puits. La plaque est ensuite insérée dans le lecteur de plaque (Countess 3) afin de mesurer la DO à 490nm de chaque puits toutes les 10 minutes pendant 4 heures.

5) Expression des gènes de l'immunité au cours de l'infection

Afin d'étudier l'expression de gènes immunitaire des écrevisses au cours de l'infection, des extractions d'ARN ont été réalisées sur divers tissus (hépatopancréas, branchies et muscles), récoltés au cours de la cinétique, avec le Kit d'extraction RNeasy Lipid Tissue Mini Kit. Les échantillons ont d'abord été broyés à 4°C avec un broyeur à bille (TissusLyserII, Qiagen) dans 1mL de quiazol, avec 3 billes en fer par tube. La suite de l'extraction a respecté les recommandations du fabricant qui préconisait également de réaliser un traitement DNase. Au terme de l'extraction, les échantillons ont été élués dans 50µL d'eau RNase free. La reverse transcription des ARNm en ADNc a été réalisée avec le Kit SuperScript IV Reverse Transcriptase de ThermoFisher, en suivant les instructions du fournisseur. Ensuite, afin de quantifier l'expression de certains gènes immunitaires (Tableau 6) par rapport à l'expression basale de deux gènes de ménages (Tableau 6), nous avons effectué une qPCR. Pour cela, un master mix contenant 2.5 µL d'ADNc, 5µL de Sybr Green 2X, 0.5µL d'amorces forward et reverse (10µM), qsp H₂O a été réalisé. Trois répliques techniques par échantillons ont été testées en qPCR. Le cycle comprenait une phase de pré-incubation de 15min à 95°C, 45 cycles de 15s à 94°C, 30s à 50°C et 30s à 72°C, un cycle de 0.5s à 95°C puis 1 min à 65°C permettant de réaliser la courbe de fusion et pour finir, une phase de refroidissement de 30s à 40°C. Une fois les résultats de qPCR extraits, pour chaque échantillon, le DeltaCT a été calculé par rapport à



la moyenne des CT du gène de références EF1 (Livak & Schmittgen, 2001). Ensuite, le 2DeltaCT a été calculé par rapport à la condition contrôle non infecté afin d'étudier l'expression différentielle de ces gènes lors d'une infection.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des amorces ciblant des transcrits issu de gènes immunitaires testés en qPCR

Nom	Amorces Forward	Tm	Amorces Reverse	Tm	Gène cible	Voies métaboliques
PPO	ACTGGCATCTCGTTACCCC	62.0	GTCGTACCTAGCGACCATCTG	51.2	Prophénoloxydase	Voie de la phénoloxydase
CEP	AGTGGTTGAAAGGCACGACG	62.0	AAACGCCAGCTCCGTACC	58.0	CCAAT/enhancer-binding protein beta	Facteur de transcription
INX	ATCGCCAGAACACCTACGC	60.0	GCCCAGAAATCTGTTAGTCAGGT	50.2	Inexine 2	Jonction cellulaires
HSP	CAAACCTCTGGTCCATGCCAAAC	50.2	TTGTGCCCTTGGGAAGCAGAA	49.2	Heat shock protein	Signal
CRU	GTCCTGTCACAAAGCACGTT	62.9	CAAGATGAGGCGAGTGTGTG	64.7	Crustin 1	Peptide AM
E3U	TCGGATATCTCCACGGGTGC	61.97	CCTCCTCCGTGGAGAATTTGTT	60.29	E3 ubiquitine	Apoptose
EF1	CTGGTACTGGAGAGTTGAAGC	49.7	CAACAACGAGCTGCTTGAC	58.0	Facteur élancement	Transcription

6) Analyses statistiques

Afin d'évaluer la différence de mortalité entre groupes infectés et contrôle, un test de survie de Kaplan-Meier a été réalisé avec le logiciel R (version 4.1.1). Pour cela, le package « survival », « survminer » et « coxme » ont été utilisés afin de réaliser le modèle de survie et les tests statistiques associés. Pour l'ensemble des paramètres immunitaires testés, THC, Activité de la phénoloxydase et l'expression de gènes immunitaires, un test de normalité (Shapiro-Wilk) a d'abord été réalisé. Dans le cas de variables suivant une loi normale (Activité de la phénoloxydase et l'expression de gènes), l'homoscédasticité des variances (test de Bartlett) a également été vérifiée. Dans ce cas, un test ANOVA, et un test post hoc de comparaison de Tuckey a été effectué. La variable THC ne suivant pas de loi normale, un test non paramétrique de Kruskal–Wallis et un test post hoc de Dunn ont été préférentiellement choisis. Pour toutes les analyses, nous avons utilisé R3.0.2.

Résultats :

1) Suivi de la mortalité :

Environ 50% des écrevisses infectées durant l'expérience sont mortes suite à l'injection avec le pathogène *C. freundii* (Figure 20). La première mortalité a été observée 12h après l'injection et les dernières 456 heures, soit 19 jours plus tard. À l'inverse, une seule écrevisse est morte au sein du groupe injecté avec du PBS et aucune dans le groupe contrôle non infecté. Ainsi, le taux de mortalité est significativement plus important pour les écrevisses infectées par



rapport à celles non infectées (contrôle /Injecté PBS vs Infectées : log-rank coef= 15.46, df =2 , p=4e-04). Également, il ne semble pas y avoir de différence significative entre le groupe injecté avec du PBS et le groupe contrôle non injecté.

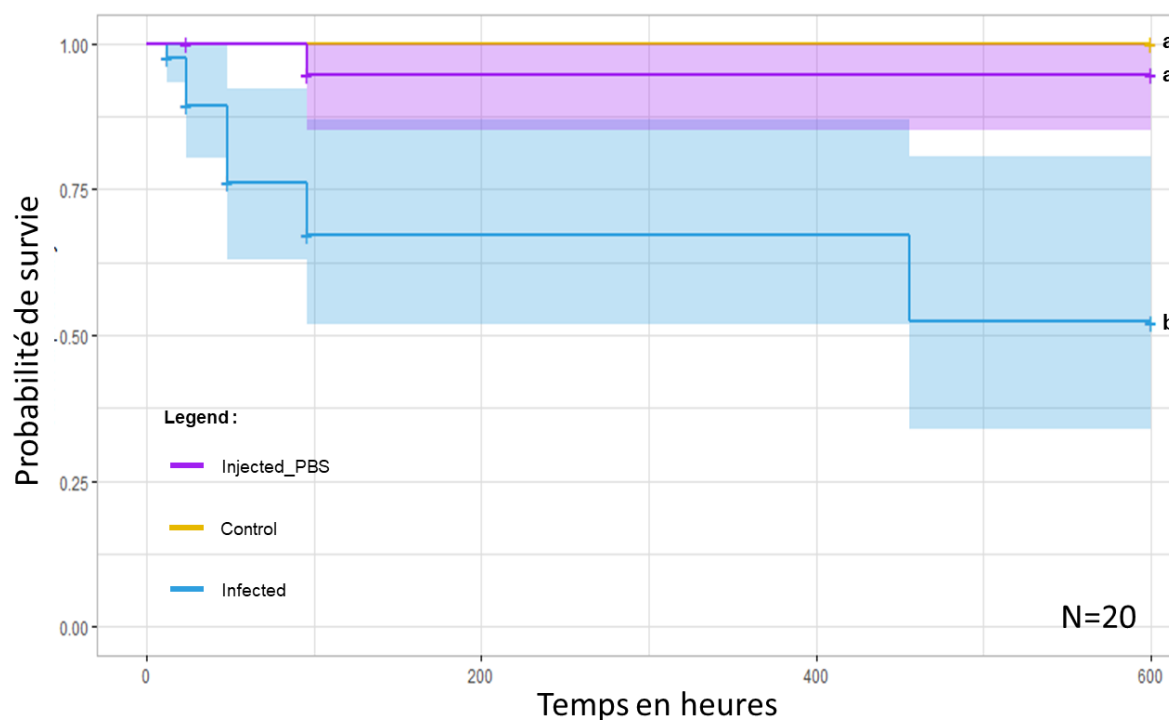
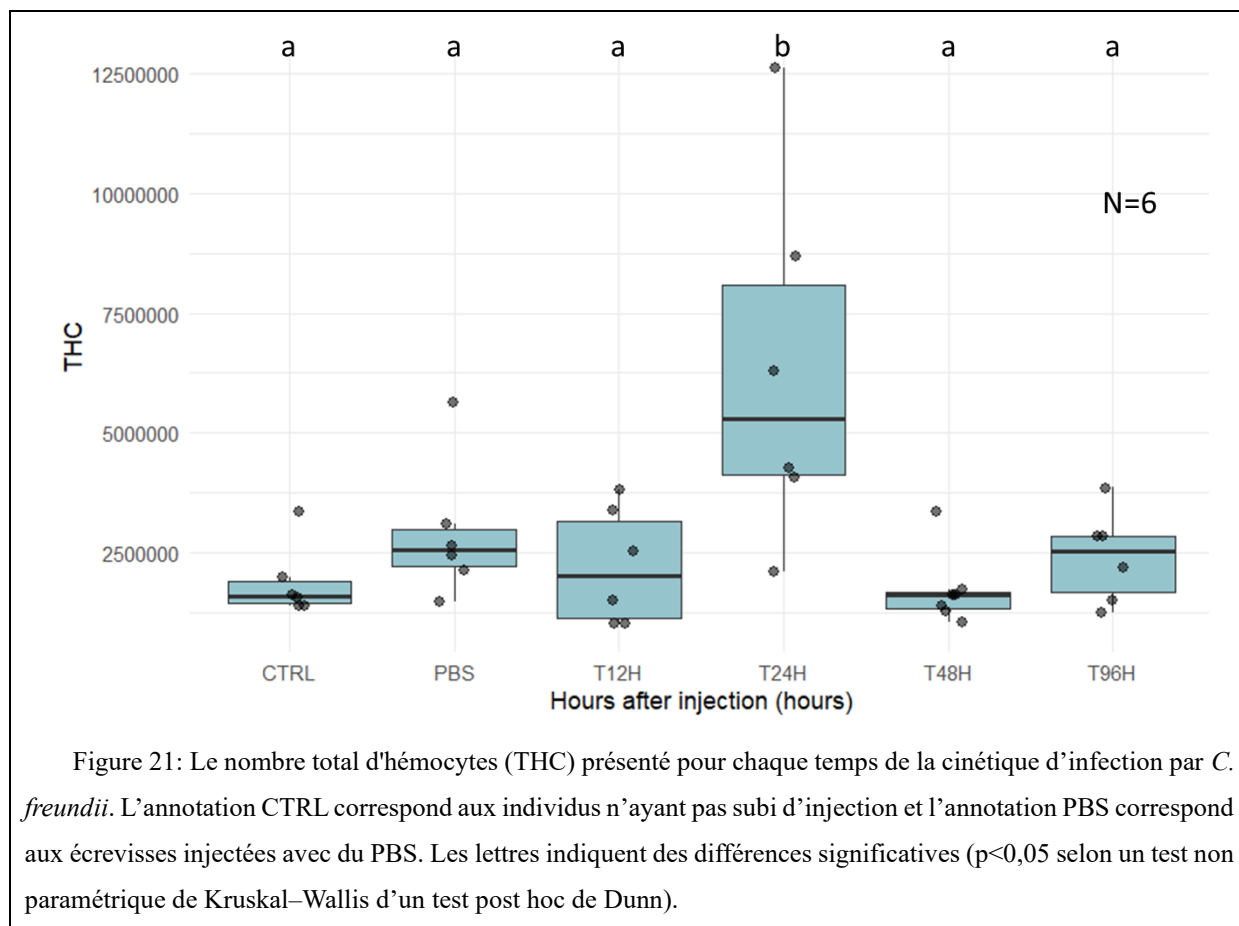


Figure 20 : Probabilité de survie (en %) des écrevisses *A. astacus* lors d'une infection par *C. freundii* au cours du temps. Trois conditions sont représentées, en jaune les écrevisses contrôles non infectés, en bleu les écrevisses injectées avec du PBS et en violet les écrevisses infectées par *C. freundii* avec environ 1/10 de la LD50 chez *P. clarkii*. Les lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$ selon un test de log-rank suivi d'un test post hoc de comparaison deux à deux).

2) La densité cellulaire

Le nombre total d'hémocytes (THC) est significativement différent au cours du temps lors de l'infection par la bactérie *C. freundii* (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 13.319$, df = 5, p-value = 0.02057) (Figure 21). En effet nous avons observé une augmentation significative (contrôle vs T24h p adj = 0.0198 après un test post hoc de Dunn) du nombre total d'hémocytes 24h après l'injection de bactéries. Effectivement, par rapport à la condition contrôle, 24h après l'infection, les écrevisses possédaient en moyenne trois fois plus d'hémocytes (moyenne Contrôle = 1886439.78 - moyenne T24h = 6343438.10).



3) Activité Phénoloxydase

L'activité enzymatique de la phénoloxydase a été mesurée par lecture de la DO à 490 nm suite à la dégradation de la L-DOPA. De plus, chaque condition a été testée avec et sans PTU, un inhibiteur, ce qui permet de tester l'activité de dégradation du substrat basale dans chaque échantillon. Les échantillons ont ensuite été normalisés par la quantité de protéine. Tout d'abord, les résultats ont permis de démontrer qu'il n'existe pas de différence significative entre les conditions dans le plasma et les hémocytes en présence de PTU. Les différences statistiques observées dans les mesures sans inhibiteurs sont bien liées à l'activité de l'enzyme phénoloxydase (Figure 22). Nous avons observé une différence significative entre les moyennes des ratios des hémocytes et du plasma (ANOVA suivie d'un test post hoc de HSD Tukey : $p \text{ adj} = 4.1e-06$). De plus, au temps 96h, nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'activité phénoloxydase dans le plasma (ANOVA suivie d'un test post hoc HSD de Tukey CTRL-96h : $p \text{ adj} = 0.057$) et une forte diminution significative de l'activité enzymatique au sein des hémocytes (ANOVA suivie d'un test post hoc HSD de Tukey CTRL-96h : $p \text{ adj} = 0.0022818$).

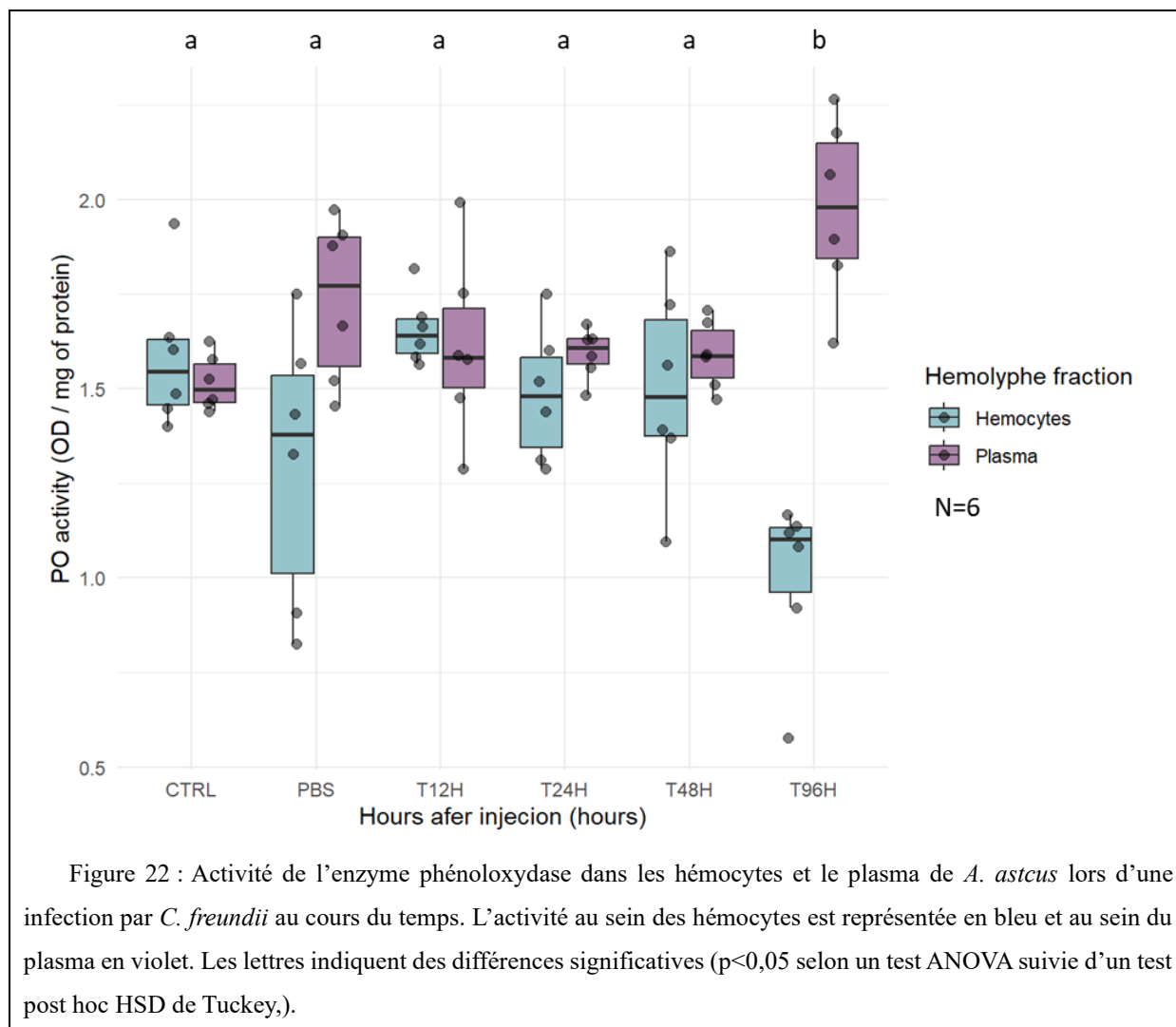


Figure 22 : Activité de l'enzyme phénoloxydase dans les hémocytes et le plasma de *A. astacus* lors d'une infection par *C. freundii* au cours du temps. L'activité au sein des hémocytes est représentée en bleu et au sein du plasma en violet. Les lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$ selon un test ANOVA suivie d'un test post hoc HSD de Tukey.).

4) Expression des gènes immunitaire

L'exposition à la bactérie *C. freundii* a affecté certains gènes immunitaires au cours du temps (Figure 23). De plus, nous avons observé des différences pour les profils d'expression de ces gènes en fonction des tissus. Tout d'abord, les gènes, comme la E3 ubiquitine et la Heat Shock Protein 2 n'ont pas révélé de différence significative entre les différents temps de la cinétique pour les 3 tissus testés. Par contre, le transcrit du gène CEP est surexprimé dans l'ensemble des tissus après 12 h d'infection par rapport au contrôle non injecté ou injecté au PBS ($p < 0,05$ selon un test ANOVA suivi d'un test post hoc HSD de Tukey, ANNEXE 3). Par ailleurs, 12 h après infection, nous observons une augmentation significative de l'expression des gènes CRU, INX et PPO ($p < 0,05$ selon un test ANOVA suivi d'un test post hoc HSD de Tukey, ANNEXE 3). Cette augmentation est localisée dans les branchies uniquement et n'est pas retrouvée dans les muscles de l'abdomen et de l'hépatopancréas des écrevisses.

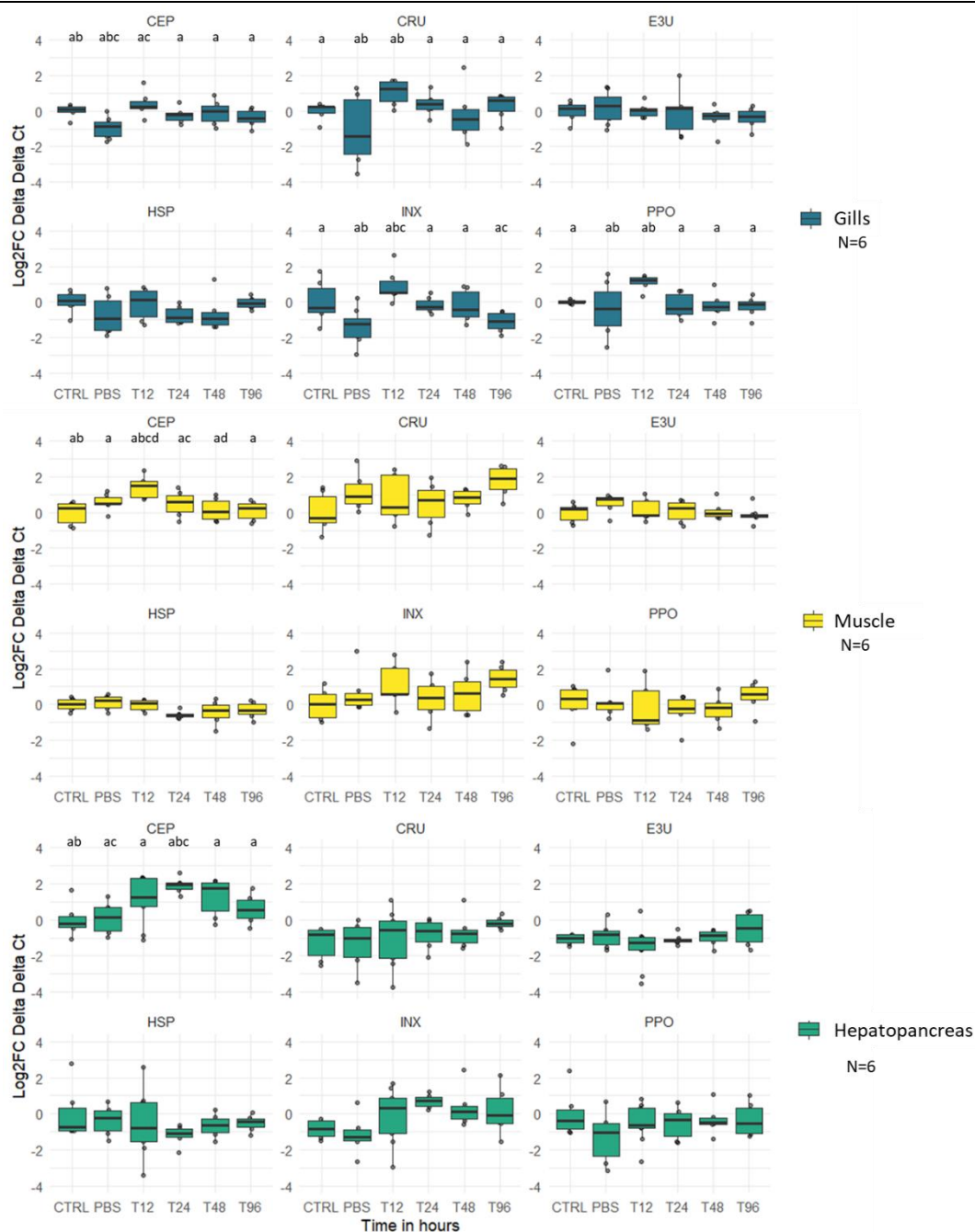


Figure 23 : Expression différentielle des gènes de l'immunité de *A. astacus* au cours du temps lors d'une infection par *C. freundii*. Le Delta CT a été calculé pour chaque gène par échantillon avec le gène de référence EF1 (Livak & Schmittgen, 2001) . Ensuite ce ratio a été rapporté au ratio des individus non infectés afin de calculer le Delta Delta CT. Pour finir, le Log2 Fold Change a été calculé afin d'obtenir l'expression relative de chaque échantillon et représentée sous forme de box plot par gènes cibles et par tissus. Les branchies sont représentées en bleu, le muscle abdominal en jaune et l'hépatopancréas en vert. Les lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$ selon un test ANOVA suivie d'un test post hoc HSD de Tukey,). L'ensemble des données statistiques sont fournies en ANNEXE 3

Discussion :

Notre étude a permis de démontrer l'efficacité de certains marqueurs pour suivre la réponse immunitaire des écrevisses autochtones à différentes échelles, cellulaires, enzymatiques et transcriptomiques. Jusqu'à présent, peu d'étude ont été réalisées sur l'impact d'infections bactériennes sur le système immunitaire des écrevisses. Liu et al. (2020, 2022), ont permis de caractériser l'impact de *Citrobacter freundii* sur la mortalité et l'expression de gènes immunitaires lors d'une infection chez l'espèce *P. clarkii*. Ils ont démontré que, dans le cadre d'infection in vivo, la bactérie entraînait des mortalités chez cette espèce avec une DL50 autour de $2.7 \cdot 10^5$ CFU/ μ L (Liu et al., 2020). Notre étude a permis de mettre en évidence que cette bactérie est également capable d'infecter *A. astacus*. Cette espèce autochtone semble cependant plus sensible que *P. clarkii*. En effet, la moitié des individus sont morts après une injection à une concentration de $2.7 \cdot 10^4$ CFU/ μ L, soit 1/10 de la LD50 chez *P. clarkii*. Cette bactérie est largement répandue dans l'environnement à l'échelle mondiale, y compris en Europe (Osei Sekyere & Reta, 2021). Du fait de l'utilisation accrue d'antibiotique et la densification de l'élevage, la prévalence de *C. freundii* dans l'environnement augmente et représente un risque accru pour l'aquaculture (Deal et al., 2007; Mohi et al., 2017). Des épisodes de mortalités de poissons infectés ont été signalés notamment chez les espèces de truites arc-en-ciel, les carpes et les poissons-chat, mais aussi chez les décapodes, comme les crevettes (Lü et al., 2011 ; Li and Yong, 2012 ; Yang et al., 2013 ; Thanigaivel et al., 2015 ; Liu et al., 2020). Cette bactérie représente donc une menace pour les populations d'écrevisses environnementales, mais aussi pour les écosystèmes aquatiques, l'aquaculture et la sécurité alimentaire.

Nos résultats ont démontré une augmentation significative du nombre total d'hémocytes (THC) 24 h après l'injection de bactéries. Ces résultats suggèrent une production rapide d'hémocytes par l'organe hématopoïétique en réponse à l'infection. Cette augmentation pourrait également être due au recrutement dans l'hémolymph d'« hémocytes sensilles », un type d'hémocytes particulier, infiltré dans différents tissus. Elles sont par exemple retrouvées dans le canal des branchies et l'hépatopancréas (Bouallegui, 2021). Ces cellules semblent jouer un rôle dans la réponse immunitaire, notamment, la phagocytose, mais aussi dans le remplacement des hémocytes circulants lors d'une infection. À l'inverse, Becking et al. (2015), ont démontrés que, suite à une infection par *A. astaci*, le nombre d'hémocytes chutait au cours de l'infection. Il est important de noter que la réponse des hémocytes peut être affectée par plusieurs facteurs, comme la virulence du pathogène et l'état immunitaire initial de chaque spécimen échantillonné (Becking et al., 2015). Ainsi, une étude plus approfondie qui porterait



sur la dynamique de production des hémocytes et leur maturation au cours de l'infection permettrait d'apporter des clefs de compréhension de la mise en place de la réponse immunitaire.

Les hémocytes sont en grande partie responsables de la synthèse et du stockage de la prophénoloxydase (PPO) (Li et al., 2021) et plus précisément les cellules granulaires. Dans notre étude, la mesure de l'activité de la phénoloxydase (PO), a montré une augmentation significative dans le plasma et une tendance à la baisse dans les hémocytes après 96h d'infection. Cela suggère que la voie de la phénoloxydase est activée en réponse à *C. freundii*. Après 96h d'infection, les CG semblent avoir dégranulé leur contenu. La PO est ainsi retrouvée dans l'hémolymph, au contact des bactéries injectées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Becking et al. (2015). L'activation de la PO et la formation de mélanine agissent comme des signaux pour recruter et activer d'autres composants du système immunitaire de l'écrevisse (Cerenius et Söderhäll., 2012). Cela inclut le recrutement des hémocytes dans la zone d'infection, qui participent à la phagocytose ou à l'encapsulation et à la destruction du pathogène. De plus, les quinones générées par l'activité de la PO possèdent également des propriétés cytotoxiques.(Bouallegui, 2021; Söderhäll & Cerenius, 1992). Bien que les hémocytes des écrevisses soient largement reconnus comme les principaux producteurs de PPO, ils ne sont pas les seuls tissus capables de synthétiser cette enzyme. En effet, sa production a également été observée dans d'autres tissus, tels que les branchies et l'hépatopancréas (Boštjančić et al., 2022; Bouallegui, 2021). Boštjančić et al. (2022), ont par exemple démontrés dans leur analyse transcriptomique que le transcrit qui code pour l'enzyme PPO était surexprimé dans l'hépatopancréas après 3 jours d'infection par sur souche virulente de *A. astaci*. De même, suite à une injection de laminarine, Cerenius et al. (2003), ont également démontrés, chez cette même espèce, une augmentation du gène codant pour la PPO après 12h. De même, en réponse à *C. freundii*, notre étude a révélé que *A. astacus* surexprimait le gène de la PPO après 12h d'infection dans les branchies. L'induction de la voie de la PPO semble donc précoce et favorise sûrement la survie des individus. Nos résultats indiquent l'activation de cette voie passe par la transcription des gènes codant pour ces enzymes 12h après infection, puis se traduit par une augmentation de l'activité de la PO dans le plasma 96h après l'infection. À l'avenir, il sera intéressant de tester d'autres gènes impliqués dans cette cascade moléculaire pour définir le rôle de chaque organe et la chronologie de la mise en place de cette réponse.

En outre, notre étude a permis de révéler une régulation différentielle de divers gènes immunitaires chez les individus infectés par rapport aux conditions contrôles. Dans l'étude menée par Boštjančić et al. (2022), le transcriptome de *A. astacus* a été réalisé au troisième jour



post-infection par le pathogène *A. astaci*. Cette analyse a permis de fournir une base précieuse pour le design des amorces utilisées dans notre propre étude. Cependant, nos résultats montrent une réponse d'expression génique beaucoup plus précoce, avec une surexpression des gènes testés à 12 heures post-infection, comparée aux trois jours observés par Boštjančić et al. Cette différence dans les dynamiques de réponse immunitaire peut être attribuée aux différentes méthodes d'infection utilisées dans les deux études. Boštjančić et al. (2022), ont infecté les écrevisses par libération de spores infectantes dans l'eau, ce qui peut conduire à une exposition progressive du pathogène à l'hôte qui doit à la fois franchir le filtre de rencontre et de compatibilité (Combes, 2001; Combes Claude, 2003). En revanche, nous avons utilisé une injection directe du pathogène, ce qui entraîne une confrontation immédiate entre le système immunitaire de l'écrevisse et *C. freundii*. Il est donc logique que cette méthode d'inoculation provoque une réponse plus rapide du système immunitaire, comme observé dans nos résultats.

Le gène qui code pour le facteur de transcription CCAAT/enhancer-binding protein C/EBP- β est le seul gène qui a été surexprimé dans l'ensemble des tissus testés. L'hépatopancréas et les branchies semblaient cependant présenter une réponse plus importante que les branchies. Les facteurs de transcription jouent un rôle clef dans la régulation des réseaux d'expression génique, en particulier dans la mise en place de la réponse immunitaire (Boštjančić et al., 2024). L'étude de Boštjančić et al. (2024), a révélé que C/EBP- β est présents dans tous les tissus analysés. Ce facteur de transcription est surexprimé dans l'hépatopancréas, 4h après injection de stimulant immunitaire (laminarine). Ces résultats sont en accord avec ceux de notre étude. Boštjančić et al. (2024) ont également étudié la réponse du facteur de transcription homologue de Krüppel-1 (Kr-h1), mais n'ont pas observé de différence d'expression dans l'ensemble des tissus suite à une injection. Kr-h1 est principalement étudié chez les insectes, où il est considéré comme un gène fondamental du développement (He et Zhang, 2022, Ramji et Foka, 2002). À l'avenir, il serait intéressant de tester ce facteur de transcription sur les échantillons de notre étude afin de déterminer s'il peut jouer un rôle dans la mise en place de la réponse immunitaire contre une bactérie.

Ces facteurs de transcriptions sont responsables de l'induction de différentes cascades immunitaires. Parmi elles, la production de peptides antimicrobiens est une voie essentielle dans l'élimination d'agent infectieux, en particulier grâce à leur pouvoir antibiotique. Chez les écrevisses, une famille de peptides est décrite, les AMPs des peptides cationiques antimicrobiens qui regroupent les crustines (CRU). Les crustines sont caractérisées par trois composants principaux : le peptide signal, la région multidomaines et le domaine protéine acide (WAP) (Tassanakajon et al., 2015). Elles ont pour rôle de limiter la croissance bactérienne grâce

à leur activité anti-protéase qui inhibe les enzymes produites par le pathogène (Bouallegui, 2021; Boštjančić et al., 2022). Ainsi, notre étude a permis de révéler que la crustine 1 était surexprimée dans les branchies après 12h d'infection. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Sudheer et al. (2015), chez la crevette *Penaeus monodon*. Ils ont démontré que la crustine 1 a été régulée à la hausse dans les branchies après vaccination et exposition au WSSV (White spot syndrome virus). Notre étude a également mis en évidence que l'Innexine (INX) était surexprimée dans les branchies des écrevisses infectées. Les innexines sont des protéines analogues aux sous-unités de connexine chez les vertébrés qui composent les canaux de jonctions communicantes entre cellules (Phelan et al., 1998; Güiza et al., 2018). Ce sont des protéines impliquées dans la communication directe entre cellules. Chez les vertébrés, ces mécanismes de communications ont été très étudiés, cependant, chez les écrevisses, leur rôle dans les défenses immunitaires est encore mal compris (Boštjančić et al., 2022). Au vu des connaissances actuelles sur les fonctions des protéines impliquées dans les jonctions communicantes dans d'autres taxons, les innexines pourraient être impliquées dans le transport des molécules métaboliques et de signalisation entre cellules d'un organisme (Boštjančić et al., 2022).

Ainsi, cette étude a permis de tester et divers marqueurs de la réponse immunitaires chez une espèce d'écrevisse autochtone *A. astacus*. Ces outils sont essentiels afin d'identifier des gènes impliqués dans la résistance des écrevisses autochtones aux infections. L'augmentation des échanges liés aux activités anthropiques et l'introduction de nouvelles espèces sur le territoire européen pourraient à terme transloquer de nouvelles souches de *A. astaci* et même de nouveaux pathogènes bactériens et viraux (Chapitre III). Ces marqueurs cellulaires, transcriptomiques et enzymatiques pourront être utilisés pour cartographier l'expression des gènes immunitaires et la réponse globale des systèmes immunitaires. Ils pourraient ainsi permettre d'identifier des populations susceptibles de mieux résister face à certains pathogènes. À terme, ils pourraient être utilisés pour améliorer les pratiques de gestion des populations autochtones.

Discussion :

Prologue :

Au cours de ces trois années de thèse, nous avons étudié le rôle des écrevisses exotiques envahissantes en tant que réservoir du pathogène *Aphanomyces astaci* et leur impact sur les écrevisses autochtones, à différentes échelles, populationnelles et individuelles. Dans un premier temps, cette étude visait à actualiser la répartition des populations d'écrevisses nord-américaines en France. Tout d'abord nous avons décrit en Aveyron (07), une espèce jusque-là non répertoriée en Europe, l'écrevisse à taches rouges, *Faxonius rusticus*. Cette espèce est particulièrement préoccupante, car elle semble être porteuse d'une souche spécifique d'*A. astaci*. De plus, elle est jugée hautement invasive et pose une menace sérieuse pour les populations d'écrevisses autochtones (Chapitre 1). Par ailleurs, nous avons également mis à jour la répartition des populations d'écrevisses de Louisiane en France. Les résultats de cette étude, ainsi que ceux de Grandjean et al. (2017), montrent que *Procambarus clarkii* et *Pacifastacus leniusculus* sont les principaux vecteurs de *Aphanomyces astaci* en France. Ces deux espèces exotiques jouent un rôle crucial en tant que réservoirs du pathogène, et sont à l'origine de la transmission de la peste de l'écrevisse. Cette maladie a causé de nombreuses épizooties parmi les écrevisses à pattes blanches, *Austropotamobius pallipes* ce qui a largement contribué au déclin de cette espèce en Europe. Le suivi temporel des prévalences a également révélé une dynamique spatio-temporelle du pathogène au sein des populations envahissantes. La persistance de *A. astaci* semble être impactée par la densité des populations, les caractéristiques intrinsèques (fréquence de mues, cycle de vie ...), et des facteurs abiotiques de l'environnement (la saisonnalité, la température, la pollution ...) (Chapitre 2). Les nombreuses introductions d'espèces, souvent dues au trafic d'animaux d'ornements, et les translocations de population établies sont des phénomènes qui favorisent la cooccurrence de plusieurs espèces d'écrevisses. Ces situations sont des environnements favorables à l'échange interspécifique de souches de *A. astaci* et potentiellement à la co-infection de spécimens. Ces transferts interspécifiques pourraient accroître la virulence et la capacité de propagation de certaines souches. À terme, une souche plus virulente serait capable d'engendrer plus rapidement des mortalités chez les écrevisses autochtones naïves et se diffuserait à l'échelle du territoire (Chapitre 3). Ainsi, la capacité d'*A. astaci* à persister et à se transmettre au sein de différentes espèces d'écrevisses envahissantes représente une menace grandissante pour les écrevisses natives. Afin de mieux comprendre les dynamiques épidémiques du pathogène, l'étude a également mis en avant la nécessité de caractériser les différentes souches d'*A. astaci*. C'est pourquoi, de nouveaux marqueurs microsatellites ont été développés afin de détecter la variabilité intragroupe des

souches. Ces outils génétiques sont indispensables, car ils permettent de différencier divers génotypes du pathogène, d'identifier les origines des épidémies et de suivre leur propagation dans les écosystèmes (Chapitre 4). Parallèlement, certaines populations d'écrevisses autochtones présentent une résistance partielle aux épisodes de peste, avec des temps d'incubation plus longs, ou des individus qui survivent à l'épidémie. Ces observations suggèrent un phénomène d'adaptation de l'hôte au pathogène. Cela soulève ainsi de nombreuses questions sur les mécanismes immunitaires impliqués. Il est donc essentiel d'identifier les gènes responsables de cette résistance (Chapitre 5). Ainsi, la caractérisation des gènes de résistance ne représente pas uniquement un intérêt pour la recherche fondamentale, mais une avancée pratique avec des applications potentielles dans la restauration et la protection des espèces menacées. L'intégration de ces découvertes dans les stratégies de conservation et de gestion est cruciale pour assurer la pérennité des écrevisses autochtones dans un environnement où les pressions des invasions biologiques et des pathogènes exotiques augmentent constamment.

Cette discussion générale est un bilan des résultats majeurs obtenus au cours des trois années passées, des perspectives et des approfondissements nécessaires afin d'améliorer notre compréhension de la transmission de *A. astaci*.

I- Contrôler les nouvelles introductions d'écrevisses en France

Cette étude a tout d'abord permis de caractériser une nouvelle espèce d'écrevisse nord-américaine en France et en Europe, considérée comme préoccupante aux niveaux européens au titre du règlement 1143/2014 en raison de son caractère hautement invasif (Laffitte et al 2023). En effet, l'écrevisse à tâches rouges (*Faxonius rusticus* Girard, 1852) est une espèce envahissante devenue très abondante, notamment dans les lacs du nord du Wisconsin depuis un demi-siècle (Capelli et Magnuson, 1983; Olden et al., 2006), car elle se développe au détriment des autres espèces présentes (Hansen et al. 2013). Ce même constat est observé sur le cours d'eau d'Inières, dans lequel cette espèce semble s'implanter au désavantage d'une autre espèce invasive, l'écrevisse signal, *P. leniusculus* qui possède pourtant un important pouvoir invasif. L'écrevisse à taches rouges, est distribuée sur plus de deux kilomètres de cours d'eau à partir de l'étang où elle présente à de très fortes densités. Cependant, cette dispersion semble encore relativement limitée. Ceci peut s'expliquer d'une part, par la présence récente de cette espèce, et d'autre part, par les assecs répétés en aval qui fragmentent le cours d'eau durant la période estivale limitant les possibilités de colonisation. De plus, la présence de *P. leniusculus* en forte densité sur les ruisseaux d'Inières et de la Briane (cours d'eau principal) limite probablement,



par compétition directe, la dynamique de population et par conséquent, la propagation de l'écrevisse à tâche rouge. Les impacts de cette espèce sur les communautés ont largement été montrés, notamment au travers de la réduction de l'abondance et/ou la richesse spécifique des macrophytes aquatiques, des macro-invertébrés benthiques et de certaines espèces de poissons (Wilson et al. 2004; McCarthy et al. 2006; Roth et al. 2007).

Avec la découverte de cette espèce, la France est de loin le pays européen, ayant la plus forte richesse spécifique en EES originaires d'Amérique du Nord (Ion et al., 2024 ; World of Crayfish website - <https://world.crayfish.ro>). Il y aurait 9 espèces en France, les 3 historiques *F. limosus*, *P. leniusculus* et *P. clarkii* ainsi que l'Écrevisse juvénile *Faxonius juvenilis* (Collas et al., 2015a), l'Écrevisse calicot *Faxonius immunis* (Collas et al., 2015a), l'Écrevisse marbrée, *Procambarus virginalis* (Grandjean et al., 2021) et l'Écrevisse à tâches rouges *Faxonius rusticus* (CF chapitre 1, Laffitte et al., 2023), l'écrevisse virile *Faxonius virilis* (voir atlas de bourgogne) et *Procambarus acutus* (Grandjean com. pers.). À cela, on peut ajouter la présence en Bretagne de l'écrevisse australienne *Cherax destructor* fortement invasive, mais sensible au pathogène de la peste de l'écrevisse au même titre que les écrevisses européennes. L'écrevisse marbrée, est l'une des plus problématiques, en raison de sa reproduction par parthénogenèse et de sa grande popularité comme animal de compagnie (Patoka et al., 2014). Introduite par le commerce d'animaux, *P. virginalis* aurait probablement évolué à partir de *Procambarus fallax* (originaire de Floride et du sud de la Géorgie), en subissant une triploïdisation de son génome lors de sa captivité en aquarium au milieu des années 1990 (Vogt et al., 2018). L'espèce clonale a été observée pour la première fois à l'état sauvage en Allemagne en 2003 et a depuis établi de nombreuses populations en Europe. Il a été démontré qu'un seul spécimen de cette espèce peut être à l'origine d'une population (Gutekunst et al., 2018). En France, l'espèce a été décrite pour la première fois dans un réservoir près de la rivière de la Moselle (Grandjean et al., 2021). Parmi les écrevisses envahissantes européennes, seule *P. allieni* présente sur une station en Bulgarie n'a jamais été observée en France.

Ce constat alarmant d'échec contraste fortement avec la législation française, beaucoup plus stricte que celle des autres pays européens, interdisant la vente et la commercialisation des écrevisses exotiques (Arrêté du 21 juillet 1983 relatif à la protection des écrevisses autochtones, Article L. 432-10 1° alinéa du code de l'environnement). Toute personne transportant une EEE vivante s'expose à une amende de 9 000 euros. Malgré cela, le nombre d'introductions d'écrevisses exotiques augmente très régulièrement. Très récemment, début octobre, une nouvelle espèce *P. acutus* vient d'être reportée dans la rivière du Doubs (Est de la France). Les analyses génétiques permettant de confirmer la présence de cette espèce sont en cours au



laboratoire. L'origine des introductions de ces d'EEEs se trouve probablement dans les sites de vente de particulier à particulier, comme Leboncoin, par exemple (Olden et al., 2021). Ce site propose plus d'une 20aines d'espèces d'écrevisses, en provenance de l'ensemble des continents dans lesquels ce groupe est distribué. À l'avenir, les contrôles du commerce illégal devraient être renforcés, notamment par les services de l'état comme la police de l'environnement de l'OFB. Également, des efforts de sensibilisation du public concernant la menace que représentent les écrevisses envahissantes en France devrait être plus soutenus, comme par exemple, inclure la thématique des invasions biologiques très tôt dans les manuels scolaires. Il est donc crucial de mettre en place des mesures plus drastiques de prévention pour éviter de nouvelle introduction tout en poursuivant les efforts actuels. Ainsi, la combinaison d'une surveillance renforcée, d'une sensibilisation accrue des citoyens et d'une réglementation plus stricte au niveau européen et local concernant l'introduction d'espèces exotiques, pourrait grandement limiter les nouvelles introductions d'écrevisses exotiques et les EEEs en général.

Des opérations d'éradication en accord avec le règlement 1143/2014 du parlement européen, relatif à la prévention, gestion et à la propagation des EEEs, inscrit dans l'article 17, ont été mises en place par le syndicat de rivière et la fédération de pêche de l'Aveyron pour contrôler, voir éradiquer la population de *F. rusticus*. Les opérations ont consisté à la mise en assec, pendant 2 ans, de l'étang, avec l'accord du propriétaire, et à la réalisation de pêches intensives sur le secteur colonisé, incluant la pose de pièges permanents et de pompage des mouilles. Ces efforts ont permis d'éradiquer la population au niveau de l'étang et de baisser le nombre de prises de 810 individus en 2021 à 12 capturés en 2024. Ces opérations, bien que coûteuses, montrent que, lorsque la détection de l'invasion est précoce et que les populations sont situées en tête de bassin dans des cours d'eau de rang de stralher 1 ou 2, l'éradication semble possible. La mise en place d'un système de surveillance et de détection rapide pourrait permettre de détecter ces stades précoces d'introduction. Ces contrôles réguliers semblent être une condition nécessaire permettant la mise en place de mesures de gestions adaptées et plus efficaces. Dans ce cadre, les méthodes basées sur l'ADN environnemental (ADNe) pourraient s'avérer très utiles pour la caractérisation d'une espèce ou de communauté par détection de l'ADN présent dans le milieu (Dejean et al. 2011 ; Komai et al. 2019). Elles consistent à extraire du matériel génétique d'échantillons environnementaux, de manière non invasive, dans l'objectif d'en extrapoler la présence d'individus appartenant à une gamme de taxons cible (Barnes et Turner; 2016). Ceci permet de s'affranchir de la capture des individus ou de leurs observations, ce qui, pour l'écrevisse, peut être difficile en raison de leur activité nocturne et lorsque les populations sont très localisées ou faibles en densités. Les techniques traditionnelles

généralement utilisées pour inventorier les écrevisses reposent sur la capture par nasse (nocturne), la capture par balance (jour), la capture à la main lorsque les niveaux d'eau sont faibles et par pêche électrique (technique la moins efficace) (Grandjean et al. 2000, Parkyn et al. 2015). Combiner ces méthodes permet de maximiser l'efficacité d'échantillonnage, mais elles sont extrêmement chronophages, coûteuses financièrement et en effectif humain. Elles nécessitent également d'être réalisées lors des périodes d'activité des écrevisses avec des conditions hydrologiques proche des périodes d'étiage, pour une meilleure efficacité. Cependant, malgré le respect de ces conditions de protocole, le comportement des écrevisses reste variable. Il se peut que des nasses pleines un jour soient vides le lendemain (Grandjean com. pers.). Récemment, les avancées méthodologiques en biologie moléculaires ont permis le développement de nouveaux protocoles complémentaires des inventaires biologiques qui ne nécessitent pas de capturer des individus, mais uniquement de prélever des échantillons de l'environnement étudié (Hopkins and Freckleton, 2002; Wheeler et al., 2004, Taberlet et al 2012). Cette méthode, particulièrement adaptée au milieu aquatique, est maintenant largement développée depuis l'étude de Ficetola et al en 2008 sur *Rana catesbeiana*, une espèce de crapaud envahissant. Elle est basée sur le principe selon lequel les organismes présents dans un environnement libèrent des fragments d'ADN appelé ADN environnemental (ADNe). Chez les écrevisses l'ADN libéré provient, par exemple, de mucus, de la cuticule, des fèces et de l'éclosion des œufs (Taberlet et al 2012). L'amplification de l'ADNe par des méthodes de PCR avec un set d'amorce spécifique permet ensuite de déterminer si une espèce est présente dans l'environnement étudié. L'utilisation de la méthodologie ADNe en écologie de la conservation a considérablement augmenté ces dernières années, permettant ainsi d'améliorer la résolution des relevés de biodiversité traditionnels (Thomsen et Willerslev, 2015; Yamamoto et al., 2017). Elle est également utilisée dans le cadre de suivi d'espèce invasive (Baudry et al., 2021) pour des détections précoces. Toutefois, la démocratisation de son utilisation a conduit à une diversification des protocoles, allant de l'échantillonnage à l'extraction et à la quantification, avec des efficacités variables. C'est pourquoi nous avons proposé un protocole optimisé de détection de l'écrevisse à pattes blanches en testant divers paramètres, la distance entre la population source et le prélèvement d'eau, l'effet de la saisonnalité et la méthode de détection PCR (Baudry et al., 2023 ; ANNEXE 4). Cette étude a été menée en Indre-et-Loire (37), car cette région concentre de nombreux cours d'eau et des populations connues de l'écrevisse à pattes blanches, *Austropotamobius pallipes*. Nous avons ainsi démontré que la détection de l'ADNe est plus efficace durant l'été, ce qui reste logique au vu de la période d'activité de l'espèce et des débits faibles. Les précipitations de l'automne, de l'hiver et du printemps



peuvent augmenter les niveaux des cours d'eau et ainsi diluer l'ADN associé à l'espèce cible. De plus, en hiver, les écrevisses sont généralement moins actives que l'été, ce qui réduit la quantité d'ADN relarguée dans l'environnement. La capacité à détecter une espèce dépend également des paramètres physico-chimiques. La turbidité, la température, le pH de l'eau, les précipitations ultérieures sont par exemple des éléments pouvant influencer la sensibilité de la méthode (Baudry et al., 2023; Troth et al., 2021). De plus, cette étude a révélé que l'efficacité de la détection diminue avec l'augmentation de la distance avec la population source, ce qui souligne l'importance de la stratégie d'échantillonnage.

Ainsi, cette méthodologie est indépendante de leur période d'activité et permet de les détecter à n'importe quel stade de la vie (Ficetola et al., 2008; Thomsen & Willerslev, 2015). Cette technique s'est révélée très performante pour des espèces difficiles à capturer ou à observer (Brys et al., 2020) et également pour des espèces rares (Boyd et al., 2020). Elle présente l'avantage de ne pas impacter le milieu et d'être moins chronophage et moins coûteuse en moyens humains et logistiques. Elle peut fournir des inventaires rapides sur de larges échelles spatiales (Baudry et al. 2021). Par exemple, deux études portant sur la mise au point de la méthodologie pour la détection de *F. rusticus* existent. La première, de Dougherty et al. en (2016), a permis de développer des amorces spécifiques. Ensuite, Coster et al. en (2021), ont générés une sonde spécifique à ce taxon permettant d'apporter un double contrôle spécifique lors de la détection de cette espèce. Ainsi, à Inières, il pourrait être utile de vérifier l'éradication de *F. rusticus* par cette méthode afin de vérifier si cette espèce n'a pas colonisé d'autres affluents de l'Aveyron ainsi que l'Aveyron lui-même. Cependant, cette méthodologie, espèce spécifique, n'est pas adaptée à la recherche de nouvelles espèces envahissantes d'écrevisses. Pour cela, le développement d'une approche par « metabarcoding » pourrait être envisagé. La méthode décrite permet d'effectuer un suivi environnemental avancé en utilisant le séquençage de nouvelle génération (NGS) pour identifier l'ensemble des espèces présentes dans un cours d'eau. Elle repose sur l'utilisation de jeux d'amorces généralistes qui ciblent des taxons spécifiques, permettant de détecter une grande diversité d'espèces sans en connaître précisément la composition au préalable. Cela permet de réaliser une analyse exhaustive de la biodiversité du cours d'eau ciblé. Cette technique est un puissant outil de surveillance environnementale, permettant de détecter les espèces envahissantes et plus généralement les perturbations des écosystèmes (Hatzenbuehler et al., 2017; Ruppert et al., 2019; Bush et al., 2019). Pour les décapodes, des amorces généralistes appelées Mideca ont été développées et semblent donner des résultats très robustes (Komai et al., 2019).



Notre étude concernant *Procambarus clarkii* a également confirmé que cette espèce continuait de se disperser en France. Le nombre d'occurrences a augmenté depuis 2014 (Collas et al., 2015), avec quatre départements supplémentaires colonisés, portant ainsi à plus des trois quarts le nombre de départements métropolitains où l'espèce est présente. L'extension continue de son aire de répartition est probablement due à sa capacité de dispersion intrinsèque, mais également aux activités anthropiques qui favorisent l'établissement de nouvelles populations. En lien avec sa progression et sa dispersion, le risque épidémique lié à l'agent de la peste peut devenir de plus en plus important. Notre étude a confirmé que *P. clarkii* est un réservoir important de l'agent pathogène de la peste des écrevisses en Gironde (33) car il a été détecté dans plus de 80 % des sites étudiés. Contrairement à l'écrevisse signal qui a fait l'objet de nombreuses études sur les prévalences dans les populations naturelles (Nylund and Westman, 2000; Kozubíková et al., 2009, 2011; Filipová et al., 2013; Maguire et al., 2016; James et al., 2017; Grandjean, 2017), très peu d'études existent sur *P. clarkii* malgré une plus large distribution à l'échelle mondiale. Ceci s'explique probablement par le fait que la plupart des études de prévalences ont été réalisées en Europe, continent où l'écrevisse signal a été introduite dès les années 1950 pour remplacer les stocks d'écrevisses européennes décimées par la peste. De plus, dans les études épidémiologiques menées sur les mortalités d'écrevisses européennes liées à la peste de l'écrevisse, on très souvent montré l'implication de la souche portée par *Pacifastacus leniusculus* dans celles-ci (Kozubíková, Viljamaa-Dirks, et al., 2011; Strand et al., 2014; Maguire et al., 2016; Grandjean, 2017; Ungureanu et al., 2020). En effet, les écrevisses signal partagent le même habitat que l'écrevisse à pattes blanches ou à pattes rouges et sont susceptible de rentrer en contact avec celles-ci. Ce facteur favorise la transmission la peste lorsque les espèces envahissantes sont porteuses. Parmi les études portant sur *P. clarkii*, les taux de prévalence révélés au sein des populations semblent relativement faibles comparés à ceux reportés dans notre étude où 80 % des populations sont infectées. Ainsi, Sieber et al., en 2022 ont par exemple détecté *A. astaci* dans deux populations parmi les six localisées en Suisse. Cependant, dans leur étude, ces auteurs ont considéré le niveau A1 comme positif, ce qui n'est pas le cas de la majorité des autres études, toutes espèces confondues, elles considèrent en général le niveau A1 comme des faux positifs. Si on se base sur un niveau d'infection A2, il n'y a plus qu'une population positive sur six. Des taux faibles de prévalences sont également reportés en Hongrie dans le Danube par Mojžišová et al. en (2024). En effet, une seule population de *P. clarkii* a été détectée positive dans un affluent de la rivière du Baràt à la peste des écrevisses parmi les 10 étudiées. En 2018, cette population semblait négative au pathogène, alors qu'en 2020, 18 individus sur 21 étaient positifs. Cette année-là, a révélée des taux

d'infection particulièrement importants, plus de 85 % pour les trois espèces présentes localement, *P. clarkii*, *F. limosus* et *P. virginalis*. De plus, les individus présentaient des niveaux d'infection élevés et rares chez les espèces envahissantes A4, voire A5. Pour finir, parmi les 3 populations de *P. clarkii* testées par Tilmans et al., en 2014, au Pays-Bas, une seule semblait infectée par la peste de l'écrevisse. L'ensemble de ces études ont testées entre 3 et 21 spécimens. Or, le faible nombre de populations infectées détectées pourrait être dû à un biais d'échantillonnage. D'après Schrimpf et al., (2013), il faudrait analyser plus de 100 individus pour rendre compte de l'absence de peste dans une population. Néanmoins, beaucoup de facteurs peuvent jouer sur la prévalence des souches au sein des populations naturelles. L'absence d'infection peut être due à un effet de fondation en cas d'introduction de quelques individus non infectés à l'origine d'une population ou de l'absence de cycle de reproduction de l'oomycète dues à des conditions chimiques non favorables.

Très peu d'éléments existent sur la reproduction d'*Aphanomyces astaci* et sur les conditions du milieu, en revanche, il existe des différences de développement des souches en fonction de la température. Par exemple, Diéguez-Urbeondo et al. en 1995 ont démontré qu'en condition expérimentale, la croissance et la capacité de sporulation d'*Aphanomyces astaci* dépendaient à la fois de la souche et de la température. Les souches appartenant aux groupes génétiques A et B préféraient des eaux froides entre 4–21 °C avec un optimum autour de 10 °C. À l'inverse, les souches du groupe D, isolées chez *P. clarkii*, une espèce hôte spécifique aux eaux plus chaudes, montraient, des taux de croissance plus élevés à des températures comprises entre 20 et 26 °C (Diéguez-Urbeondo et al., 1995).

Ainsi, il serait intéressant de connaître les taux de prévalence des écrevisses envahissantes dans leur aire d'origine afin de les comparer à ceux retrouvés dans les zones où elles ont été introduites. En effet, cela permettrait de déterminer si l'introduction dans un nouvel environnement qui augmenterait le niveau de stress individuels pourrait impacter la prévalence de *A. asatci*. Si l'on regarde les niveaux d'infection individuels, nos résultats montrent des niveaux d'infection entre A2 et A3 ce qui est généralement rencontrés dans les autres études (Martín-Torrijos, Correa-Villalona, Azofeifa-Solano, et al., 2021; Mojžišová et al., 2024; Putra et al., 2018). Cependant, des niveaux d'infection élevés peuvent être ponctuellement observés. Deux spécimens de notre étude possèdent des niveaux A5. De plus, Peiró et al. en 2016 ont révélé des individus présentant des niveaux pouvant atteindre A7 au Brésil. Ces niveaux importants pourraient être liés à une réponse immunitaire moins efficace en lien avec une condition corporelle dégradée. Il est connu que les niveaux de parasitisme reflètent un certain niveau de stress des individus (Buchmann & Bresciani, 2006; Sures & Nachev, 2022). Le stress,

qu'il soit d'origine environnementale (pollution, température, perturbations de l'habitat) ou biologique (prédation, compétition), a des effets directs sur la physiologie des invertébrés, dont le système immunitaire). L'utilisation des ressources de l'énergie ainsi que la manipulation de l'hôte peuvent réduire les performances et la condition des individus infectés (Sures & Nachev, 2022). Chez les *Cherax quadricarinatus*, par exemple, l'exposition a de fortes concentrations de nanoplastiques a entraîné une diminution de l'activité de la Superoxyde dismutase, une enzyme au rôle antioxydant impliqué la réponse immunitaire (Cheng et al., 2020).

Notre étude a également montré que l'implication de la souche véhiculée par *P. leniusculus* reste majoritaire dans les cas de mortalité de population native liés à la peste. Cependant, la souche D a également été caractérisée à deux reprises lors d'épizooties en France. En Espagne, *P. clarkii*, l'espèce vectrice principale de ce groupe génétique, a été initialement introduite en 1973. Depuis, son aire de répartition et de son pathogène associé s'est rapidement et largement répandue. Actuellement, la souche du groupe génétique D est reporté dans plus de 50% des mortalités d'écrevisses à pattes blanches en Espagne (Svoboda et al., 2017; Martín-Torrijos et al., 2019).

À l'avenir, le dérèglement climatique pourrait être un facteur aggravant dans la dispersion du génotype D d'*A. astaci* et de son espèce réservoir. Le succès de *P. clarkii* dans les environnements envahis s'explique par sa capacité à s'adapter à une large gamme de conditions environnementales. Cependant cette espèce préfère en général les eaux chaudes (Diéguez-Uribeondo et al., 1995; Souty-Grosset et al., 2016). Du fait de la coévolution avec son hôte, la souche spécifique à *P. clarkii* se développe également plus rapidement à des températures élevées, entre 20°C et 26°C (Diéguez-Uribeondo et al., 1995). Avec le dérèglement climatique, certaines situations pourraient favoriser l'expansion de *P. clarkii* et de son parasite associé. L'été 2024, l'écrevisse de Louisiane a fait l'objet d'une couverture médiatique importante, avec de nombreux articles de presse en France (Figure 24). Les conditions climatiques particulières ont probablement participé à la création de conditions favorables à la multiplication de cette espèce et à sa dispersion, ce qui a attiré l'attention des journalistes (figure Articles). Ainsi, ces articles ont participé à sensibiliser le grand public sur les enjeux de gestion des espèces envahissantes et de conservation de l'écrevisse à patte blanche. Comme l'indique Martín-Torrijos et al. (2021b), la hausse des températures pourrait également fragiliser les écosystèmes locaux, déjà vulnérables, et favoriser des épidémies plus fréquentes et plus intenses de peste des écrevisses dans les populations d'écrevisses autochtones. L'évolution trop rapide du climat pourrait donc jouer un rôle amplificateur dans la propagation de cette espèce envahissante et de son pathogène qui représente une menace croissante pour la biodiversité aquatique.





Figure 24: Exemple de quelques articles publiés cette été concernant *P. clarkii* dans divers articles de presse entre Juin et Aout 2024.

II- La prévalence de *Aphanomyces astaci* dans les populations d'écrevisses envahissantes

A. astaci a été introduit en Europe vers la fin du XIXe siècle, probablement via des écrevisses importées pour la consommation ou l'élevage. En France, il s'est largement répandu et a causé une diminution significative des populations d'écrevisses autochtones. En effet, notre étude a révélé 13 nouveaux épisodes de mortalités en France les 15 dernières années. La transmission se fait principalement par les écrevisses américaines résistantes, telles que l'écrevisse signal *Pacifastacus leniusculus* ou l'écrevisse rouge de Louisiane, *Procambarus clarkii*, qui sont des porteurs chroniques du pathogène (Collas et al., 2015a; Grandjean et al., 2017; Laffitte et al., 2024). De plus, l'une des principales méthodes de translocation involontaire des spores est liée à l'utilisation d'équipement de pêche contaminé. Les spores d'*A. astaci* sont résistantes et peuvent survivre dans l'eau ou sur du matériel humide, comme des filets, des nasses, des bottes, et les waders de pêche, facilitant ainsi la dissémination du pathogène lorsque les équipements ne sont pas nettoyés (Matthews et Reynolds, 2002 ; Échevin, 1996 ; Oidtmann et coll., 2002 ; Souty-Grosset et al., 2006). Ce phénomène a été observé dans plusieurs pays européens, où la diffusion non contrôlée de matériel infecté ou d'individus transloqués a contribué à l'extinction locale d'espèces d'écrevisses autochtones (Holdich et al., 2009). Il est donc crucial de désinfecter les équipements et de suivre des protocoles stricts lors du transport d'animaux pour limiter la propagation de la peste des écrevisses (Jussila et al., 2014). Pour finir, la translocation d'individus pour le repeuplement piscicole peut également involontairement entraîner la propagation d'*A. astaci*, surtout si les poissons proviennent de bassins contenant des

écrevisses porteuses du pathogène. En France, plusieurs plans de gestion tentent de limiter la propagation de la maladie, notamment en restreignant les mouvements d'écrevisses et en désinfectant les équipements utilisés dans les cours d'eau affectés. Cependant, la persistance des espèces invasives rend le contrôle difficile, et la peste continue de menacer les écosystèmes aquatiques.

Notre étude a confirmé que *P. clarkii* est un réservoir important de l'agent pathogène de la peste des écrevisses en Gironde (33), car il a été détecté dans plus de 80 % des sites étudiés. L'étude de Grandjean et al en 2017, basée sur la même approche méthodologique, a également rapporté la présence d'*A. astaci* dans 63 % des populations étudiées. Cette différence de prévalence entre les espèces hôtes peut s'expliquer par la couverture spatiale qui diffère entre les deux enquêtes. L'étude sur l'écrevisse signal couvrait l'ensemble du pays, y compris des populations isolées, tandis que notre étude se concentrait sur une seule région relativement connectée. Cette interconnexion favoriserait la propagation du pathogène au sein du réseau hydrographique et pourrait être à l'origine du taux de prévalence élevé. En outre, les populations d'écrevisses signal de France pourraient provenir de différentes sources du fait des multiples épisodes d'introduction. En effet, en raison de ses similitudes écologiques et gastronomiques avec *Astacus astacus*, ainsi que de son succès d'établissement, des vagues d'importations massives ont été organisées pour repeupler les cours d'eau ayant subi des épisodes de mortalité (Collas et al., 2015a; Grandjean et al., 2017; Kozák et al., 2015). À l'inverse, les populations de *P. clarkii* en France semblent vraisemblablement être issues de la même origine, probablement espagnole. Dans ce cas, les populations nouvellement établies font face à des goulots d'étranglement génétiques significatifs lors de leurs translocations par rapport aux populations natives. Les résultats de Kozubíkova et al. (2009) et de Tilmans et al. (2014) suggèrent que « l'effet fondateur » peut-être un facteur qui influence la prévalence d'*A. astaci* dans les populations d'écrevisses envahissantes. En effet, la prévalence du pathogène pourrait être impactée par l'histoire de l'introduction, le nombre d'individus importé, mais aussi les niveaux d'infection et le stade de vie des individus fondateurs (Tilmans et al. 2014 ; Kozubíková et al., 2009; Torchin et al., 2003). À l'avenir, afin d'évaluer la prévalence de *A. astaci* dans les populations de *P. clarkii* en France, il serait intéressant d'étendre cette étude à l'échelle nationale à travers l'échantillonnage de populations isolées et de populations récemment transloquées. Il serait également pertinent de réaliser une importante campagne d'échantillonnage sur le pourtour méditerranéen, une zone interconnectée où l'espèce est fortement présente, afin de comparer les prévalences de *A. astaci* avec celles obtenues en Gironde. De plus cette étude pourrait être complétée en échantillonnant des spécimens issus des

deux autres espèces historiques, *P. leniusculus* et *F. limosus*. Bien que les populations de l'écrevisse américaine tendent à reculer, aucune étude d'envergure n'a encore été réalisée chez cette espèce en France.

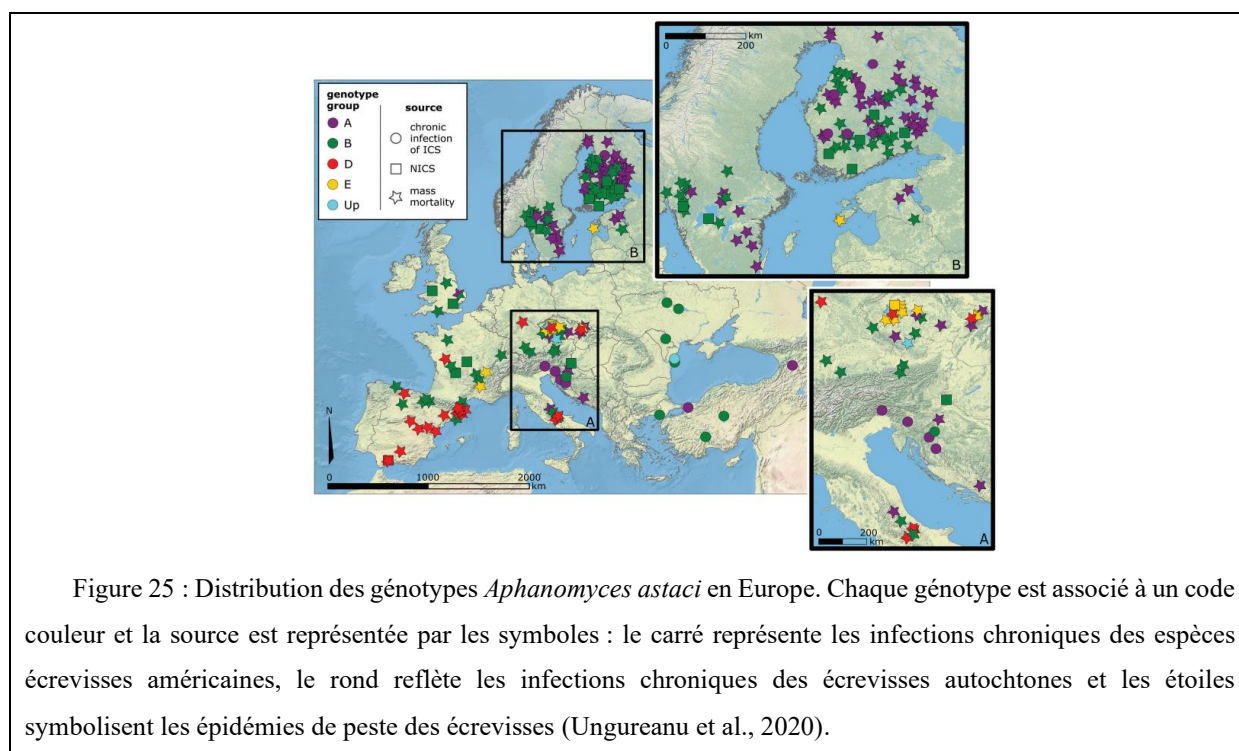
Par rapport à la dispersion mondiale de l'espèce, il existe relativement peu de données quant aux prévalences de *A. astaci* dans les populations de *P. clarkii* (Martín-Torrijos, Correa-Villalona, Azofeifa-Solano, et al., 2021; Mojžišová et al., 2024; Peiró et al., 2016; Putra et al., 2018; Sieber et al., 2022; Tilmans et al., 2014). Les précédentes études qui ont utilisé la méthodologie de détection par qPCR (Vrålstad et al., 2009b) n'ont étudié qu'un nombre limité de populations. Elles semblent par contre corroborer l'idée selon laquelle *P. clarkii* est une espèce réservoir du pathogène avec des prévalences pouvant atteindre des niveaux élevés localement. En effet, les données de prévalence en Europe et dans le monde ont confirmé que *P. clarkii* était porteur de *A. astaci*, tant dans son aire de répartition native (Martín-Torrijos, Martínez-Ríos, et al., 2021) que dans les nouvelles zones envahies (Diéguez-Uribeondo et al., 1995; Martín-Torrijos et al., 2021a ; Sieber et al., 2022). En Suisse, Sieber et al., en 2022 ont par exemple détecté *A. astaci* dans deux populations parmi les six étudiées. De plus une population néerlandaise sur trois et une population sur dix en Hongrie étaient également infectées (Mojžišová et al., 2024; Tilmans et al., 2014). Parmi ces études, la prévalence au sein des populations était très fluctuante et comparable à celle que nous avons effectuée en France. En effet, dans l'estuaire de la Gironde, la prévalence dans chaque population variait de 0 à 100 %. Dans la littérature les niveaux d'infection des écrevisses positives étaient également très fluctuants, généralement compris entre le niveau d'infection A2 et A3 (Martín-Torrijos, Correa-Villalona, Azofeifa-Solano, et al., 2021; Mojžišová et al., 2024; Putra et al., 2018). Cependant, au Brésil, Peiró et al., en 2016 ont également trouvé des niveaux d'infection élevés pouvant atteindre A5 et A7. Ils viennent appuyer nos résultats qui ont démontré que certains individus de *P. clarkii* ont également présenté des niveaux d'infection élevés. À ce jour, les facteurs qui influencent l'évolution de la prévalence de *A. astaci* dans les populations d'écrevisses envahissantes et qui impactent également les niveaux d'infection des individus testés sont encore peu étudiés. En effet, la plupart des études épidémiologiques se sont concentrées sur une seule session d'échantillonnage par population. Malgré les nouveaux sets d'amorces plus spécifiques à *A. astaci* développées par Strand et al., 2023, la détection par qPCR reste une méthode avec des limites. Lorsque l'ensemble des échantillons d'une population présentent des niveaux d'infection inférieurs à la LOD ou LOQ, ils sont considérés par mesure de précaution comme négatifs. Étant donné que le pathogène réside dans la cuticule des écrevisses, les mues saisonnières participent à réguler le pathogène, ce qui a des conséquences sur la détection de *A.*

astaci. Ainsi, pour améliorer la précision concernant la prévalence de *A. astaci* dans les populations, il serait nécessaire de réaliser pour chacune des localités différentes sessions d'échantillonnages réparties sur plusieurs saisons. De plus, augmenter l'effort d'échantillonnage permettrait d'augmenter le nombre d'individus totaux capturés et donc de maximiser l'effort de détection de *A. astaci* et d'affiner l'intervalle de confiance de la prévalence. Hors d'après Schrimpf et al., (2013), il faudrait analyser plus de 100 individus pour rendre compte de l'absence de peste dans une population.

Au-delà de l'effort d'échantillonnage, réaliser un suivi des prévalences dans le temps est essentiel afin de mieux appréhender les mécanismes de persistance de *A. astaci* dans les populations envahissantes. Les résultats obtenus concernant le rééchantillonnage de certaines populations de *P. leniusculus* sont préliminaires et nécessitent d'être complétés. En 2011, Matasová et al., ont cherché à évaluer l'effet des changements temporels sur la prévalence et la détection de *A. astaci* dans 3 populations de *F. limosus*. Cette étude suit 3 populations connues pour être infectées à différents niveaux (fort, moyen et bas). Les auteurs ont démontré une absence de variation dans le temps de la prévalence du pathogène issue des populations fortement ou très faiblement infestées. Toutefois, dans les populations moyennement infectées, ils ont observé une décroissance de la prévalence significative en lien avec la saisonnalité. Les fluctuations de la prévalence d'*A. astaci* dans les populations peut s'expliquer par plusieurs paramètres comme : des facteurs intrinsèques (l'âge, la taille et le cycle de mue des individus échantillonnés (Vrålstad et al., 2011)), des facteurs abiotiques (le type de plan d'eau, les conditions physico-chimiques, la température (Kozubíková et al., 2009)), et, la densité des populations influençant les comportements des hôtes (Matasová et al., 2011; Mojžišová et al., 2022). La persistance de *A. astaci* au sein des espèces envahissantes est également probablement due aux caractéristiques génétiques de chaque souche issue de la coévolution entre l'hôte et le pathogène.

À mesure que *P. clarkii* continue de se disperser à travers l'Europe, son rôle en tant que réservoir de la peste de l'écrevisse et la menace potentielle que l'espèce représente pour les écrevisses autochtones augmente. De plus en plus d'épisodes de mortalité sont répertoriés (Ungureanu et al., 2020) et plus particulièrement certains causés par des souches appartenant au génotype du groupe D, associé à l'espèce *P. clarkii* (Diéguez-Urbeondo et al., 1995). En effet, de nombreuses épidémies ont été recensées en Espagne (Martín-Torrijos et al., 2019), en Italie centrale (Caprioli et al., 2018), en République tchèque (Mojžišová et al., 2020) et en Allemagne (Makkonen et al., 2018). En France, les études ont jusqu'à présent montré que les génotypes du groupe B, associé à l'écrevisse signal *P. leniusculus* étaient le plus répandus lors

des épidémies de peste de l'écrevisse dans les populations d'*A. pallipes*. Cela s'explique du fait de la large distribution de *P. leniusculus* sur le continent (Kouba et al., 2014), mais aussi du fait que l'écrevisse signal partage le même type d'habitat en tête de bassin versant avec *A. pallipes* (Bramard et al., 2006). Cependant, notre étude a révélé un nouvel épisode de mortalité causée par le groupe D dans le département des Pyrénées-Atlantiques (64) en 2021. C'est le deuxième épisode de mortalité associé à ce groupe génétique décrit en France jusqu'à présent. À mesure que *P. clarkii* poursuit son expansion en France, la menace qu'il représente pour les écrevisses à pattes blanches augmente. En Espagne, un pays frontalier où l'espèce a été introduite plus tôt (Gherardi, 2006), le génotype D a été impliqué dans de nombreuses mortalités de masses (12 entre 2004 et 2019) (Martín-Torrijos et al., 2019). À l'inverse, les mortalités associées au génotype B sont minoritaires (8 épisodes répertoriés). Par ailleurs, l'introduction de nouvelles espèces d'écrevisses non indigènes, comme par exemple, l'écrevisse marbrée *Procambarus virginalis* et *Procambarus alleni*, qui hébergent une souche du groupe de génotypes D, est un facteur favorisant sa dispersion à travers l'Europe.



III- Suivis épidémiologiques de *Aphanomyces astaci*

Les différentes études menées sur la distribution et la prévalence de *A. astaci* soutiennent l'hypothèse selon laquelle ce pathogène est propagé et relâché dans la nature par les écrevisses envahissantes « historiques », mais aussi par les nouvelles espèces introduites (Laffitte et al., 2023, 2024; Mojžišová et al., 2024). Ces espèces sont souvent transloquées à cause du trafic d'animaux d'ornement. En effet, à Budapest trois d'entre-elles, *P. clarkii*, *P. virginalis* et *P. allenii* sont certainement issues des aquariums (Mojžišová et al., 2024; Weiperth et al., 2019). Avec *F. limosus*, ces quatre espèces étaient porteuses de *A. astaci*. La présence de populations sympatriques d'espèces nord-américaines au sein de mêmes stations est favorable à la transmission horizontale du pathogène entre les espèces hôtes coexistantes. En effet, cette étude a révélé des combinaisons d'haplogroupes d'*A. astaci* inattendues. Par exemple, *Procambarus clarkii*, hôte typique de l'haplogroupe d (Makkonen et al., 2018 ; Martín-Torrijos et al., 2021), et *F. limosus* de l'haplogroupe e (Mojžišová et al., 2024), ont été isolés respectivement avec l'haplogroupe a et b. Peu de cas de transfert interspécifique de souches ont été documentés jusqu'à présent. L'étude de Mojžišová et al. en 2022 avait déjà détecté l'haplogroupe b dans une population tchèque de *F. limosus* coexistante avec *P. leniusculus*. L'étude réalisée à Inières a également permis de révéler un probable transfert interspécifique entre les souches portées par *F. rusticus* et *P. leniusculus*. Parfois, la coexistence de plusieurs espèces peut également aboutir à la co-infection de spécimens par des souches de groupes génétiques différents, comme observés à Inières et dans l'étude de Mojžišová et al. en 2024. Les environnements où différentes espèces d'écrevisses et de souches d'*A. astaci* coexistent sont favorables à la compétition et peuvent entraîner des changements de dominance. À Barat entre 2018 et 2020 un changement d'haplogroupe dominant a notamment été observé. Les données limitées sur les variations dans le temps de la prévalence d'*A. astaci* chez les hôtes envahissants suggèrent que le pathogène persiste généralement sur le long terme, bien que des fluctuations ponctuelles puissent réduire sa prévalence au point de devenir indétectables (Matasová et al., 2011 ; Mojžišová et al., 2022). Cette étude n'a pas permis de déterminer si ce remplacement ponctuel est le résultat de fluctuations dans la fréquence des différentes souches pathogènes coexistantes, ou bien s'il s'avère être un remplacement progressif d'une souche de l'haplogroupe b par une souche de l'haplogroupe a. Pour cela il faudrait poursuivre sur le plus long terme le suivi des prévalences et des groupes génétiques présents dans le Danube. Ces transferts interspécifiques entre populations sympatriques d'espèces nord-américaines représentent un risque pour la conservation des écrevisses autochtones. En effet, cette transmission pourrait favoriser la

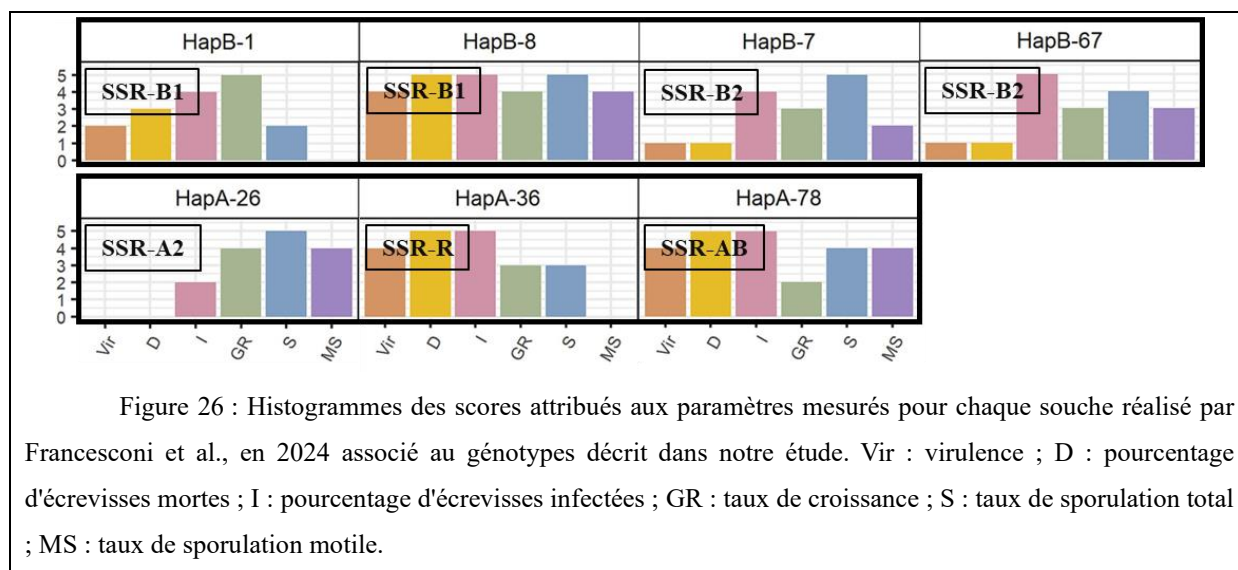


propagation d'une souche fortement virulente à l'échelle du territoire. À terme, elle pourrait engendrer de plus forts événements de mortalités au sein des populations d'écrevisses natives. La caractérisation des différentes souches d'*A. astaci* est donc cruciale pour mieux comprendre les dynamiques épidémiques du pathogène dans les écosystèmes.

Notre étude sur la diversité intragroupe de *A. astaci* a démontré que les microsatellites peuvent être un outil plus adapté pour explorer la diversité génétique du pathogène. En effet, les 15 nouveaux marqueurs ont permis de révéler de la variabilité génétique au sein des différents haplogroupes, a, b, et e. Des variations génétiques au sein des groupes de génotype B ont été décrites, avec notamment quatre patrons identifiés, suggérant une variabilité intragroupe non détectée auparavant. Les résultats montrent également que l'haplogroupe a présenté une grande diversité, avec trois sous-groupes A (SSR-A1, SSR-A2, SSR-A3), le génotype SSR-UP (Grandjean et al., 2014), le génotype associé à *F. rusticus* SSR-R (Panteleit et al., 2019), et un génotype mixte SSR-AB. Cette diversité est probablement due à la large répartition du groupe, notamment au sein du genre *Faxonius*. Ces marqueurs offrent une résolution élevée, ce qui est utile pour tracer les origines des nouvelles épidémies et comprendre comment *A. astaci* est introduit dans de nouveaux environnements. Ces résultats encouragent une application élargie des marqueurs à des populations plus diverses, en particulier aux États-Unis, pour mieux comprendre l'histoire évolutive du pathogène et son impact sur la conservation des espèces d'écrevisses en danger. Discriminer de la variabilité génétique intragroupe pourrait ainsi permettre d'identifier des groupes avec des patterns de virulence similaires et ainsi de définir certains gènes de virulences.

L'introduction récente de nouvelles souches, les années de coévolution avec ses espèces européennes et la diversité probablement encore peu décrite d'*A. astaci* en Amérique du Nord, nécessite d'établir des profils de virulences pour les souches connus. Francesconi et al., en 2024 ont cherché à définir des schémas phénotypiques, à travers l'étude de certains traits, comme le taux de croissance et de sporulation in vitro de 14 souches d'*A. astaci* isolées en Amérique du Nord et en Europe. Ces schémas ont ensuite été comparés à la virulence de ses souches caractérisée par la mortalité induite chez les écrevisses sensibles. Cette étude a permis de décrire une forte variation de la virulence chez *A. astaci*. De plus, elle a mis en évidence que les taux de croissance et de sporulation n'étaient pas significativement corrélés à la virulence. Au sein de chaque haplogroupe, aucun des paramètres analysés, y compris la virulence, n'était significativement différent. Cela suggère que chaque souche est définie par sa propre combinaison de traits et est adaptée spécifiquement à l'environnement et à l'hôte auxquels

chaque souche est confrontée. Les marqueurs mitochondriaux ne sont donc pas des outils de choix pour étudier la virulence de *A. astaci*.



Comparer les schémas phénotypiques de l'étude de Francesconi et al., 2024 avec les résultats de notre étude sur la variabilité génétique au sein des différents haplogroupe, pourrait permettre d'approfondir notre compréhension de la variabilité de la virulence d'*A. astaci* et de sa capacité à s'adapter à de nouveaux hôtes et environnements. À première vue, les souches appartenant au groupe SSR-B2 semblent présenter un schéma phénotypique proche (Figure 26). Les microsatellites pourraient donc potentiellement être un outil plus performant que l'ADNmt pour décrire les variations de virulences entre souches. Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire d'établir pour chaque souche isolée sur gélose, à la fois le profil phénotypique et le profil génétique. Enfin, pour aller plus loin, il serait intéressant de réaliser des analyses de génomiques comparatives des différentes souches d'*A. astaci*. Cette approche permettrait d'établir une liste de gène potentiellement impliqué dans la virulence pour chaque souche. Cette étude pourrait s'appuyer sur diverses bases de données qui permettraient d'optimiser la prédiction de ces effecteurs. Tout d'abord, AphanoDB est une base de données dédiée spécifiquement au genre *Aphanomyces* qui rassemble des informations génomiques et transcriptomiques sur différentes espèces et génotypes du genre (Gaulin et al., 2018). Ensuite, EffectorP et POOE (Prediction of Oomycete Effectors) sont des outils utilisés pour prédire les effecteurs sécrétés par les oomycètes à partir des séquences protéiques (Sperschneider & Dodds, 2022; Zhao et al., s. d.). Ces différentes bases de données et outils bio-informatiques sont essentiels pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions entre *Aphanomyces astaci* et ses hôtes écrevisses. Pour étudier plus en détail les effecteurs

réellement impliqués dans ce dialogue moléculaire, il serait intéressant de coupler cette approche de génomique comparative avec une analyse transcriptomique et protéomique. Ces méthodes permettraient d'étudier les effecteurs réellement transcrits et traduits au cours de l'interaction, mais aussi de caractériser la réponse immunitaire de l'hôte. Ces analyses, bien que coûteuses, permettraient d'améliorer notre compréhension de l'interaction entre *A. astaci* et les écrevisses envahissantes et autochtones.

IV-Caractériser la réponse immunitaire des écrevisses.

Pour améliorer notre compréhension du dialogue moléculaire lors de l'interaction avec *A. astaci*, étudier la réponse immunitaire, des écrevisses autochtones et envahissantes est essentiel. Récemment, des cas de résistance à la peste de l'écrevisse ont été observés dans certaines populations européennes. Par exemple, dans des populations finlandaises, les écrevisses *Astacus astacus* semblaient présenter une résistance accrue à l'infection par une souche appartenant à l'haplotype a (Makkonen et al., 2014; Makkonen, Jussila, Kortet, et al., 2012). Ces études ont démontré une résistance partielle avec la mélanisation des hyphes, un allongement de la période de survie et une mortalité variable selon les populations. Plus récemment, Francesconi et al. ont révélé une résistance totale dans une population finlandaise (lac Rytty) confrontée à une souche de *A. astaci* de l'haplotype a et b (Francesconi et al., 2021b, 2024). En 2017, Martín-Torrijos et al, ont trouvé dans les populations d'écrevisses à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*) une résistance partielle dans les Pyrénées. La description récente de populations résistantes soulève des questions sur l'existence de résistances similaires dans d'autres populations et sur le phénomène de coévolution et l'adaptation des pathogènes et des hôtes. Évaluer la résistance des écrevisses autochtones à la peste des écrevisses reste complexe, notamment à cause de la variabilité de la virulence des souches. Notre étude a permis de développer des marqueurs de la réponse immunitaire chez les espèces autochtones. Ces outils sont essentiels afin de comprendre comment certaines écrevisses autochtones parviennent à survivre à l'infection. Ils permettraient de mieux appréhender les mécanismes immunitaires spécifiques de ces populations. L'identification des gènes impliqués dans la résistance aux infections d'*A. astaci* est cruciale pour plusieurs raisons. D'abord, comprendre comment certaines écrevisses autochtones parviennent à survivre à l'infection permettrait de mieux appréhender les mécanismes immunitaires spécifiques de ces populations. En identifiant des gènes responsables de la mise en place de la réponse immunitaire, il devient possible de cartographier l'expression de ceux qui favorisent une meilleure défense face au pathogène. Ces informations pourraient à terme être utilisées pour développer des méthodes permettant de

renforcer cette résistance. Par exemple, cela pourrait permettre de cibler ces gènes dans des programmes de sélection pour améliorer la résilience des populations d'écrevisses à pattes blanches contre les épizooties de peste de l'écrevisse. Ainsi, des programmes de repeuplement pourraient se concentrer sur l'élevage et la réintroduction d'individus présentant des formes de résistances à *A. astaci*. En outre, la compréhension des gènes de résistance pourrait faciliter des méthodes de bio-ingénierie visant à renforcer artificiellement la résistance des populations sauvages. Bien que cela reste un domaine à explorer avec prudence, ces avancées pourraient offrir des solutions novatrices pour lutter contre la peste des écrevisses et autres pathogènes envahissants.

Pour aller plus loin dans la caractérisation de la réponse immunitaire, il serait également intéressant d'étudier plus spécifiquement le rôle des différents tissus dans la mise en place de la réponse immunitaire chez les écrevisses. En effet, notre étude a permis de démontrer que certains gènes impliqués dans la réponse immunitaire étaient différenciellement exprimés entre les trois tissus testés, soit les branchies, l'hépatopancréas et les muscles. Les branchies sont les tissus qui ont présenté le plus de variation d'expression des gènes, avec une augmentation de l'expression à 12h du facteur de transcription CCAAT/enhancer-binding protein beta (CEP), mais aussi d'une innexine et du peptide antimicrobien Crustine 1. Également après 12h d'infection, nous avons observés une sur expression de la prophénoloxydase (PPO), une enzyme essentielle dans la mise en place de la réponse immunitaire des invertébrés. Malheureusement, dans cette étude, nous n'avons pas pu étudier l'expression de gènes immunitaires sur les hémocytes, car par individu, le nombre d'hémocytes est trop faible pour obtenir des rendements d'extraction suffisants. Les hémocytes sont des cellules sanguines spécialisées qui jouent un rôle central dans cette défense, remplissant des fonctions telles que la reconnaissance des pathogènes, la phagocytose, l'encapsulation et la production de substances antimicrobiennes (Bouallegui, 2021; Li et al., 2018; Taylor et al., 2009). Les hémocytes d'écrevisses sont regroupés en trois morphotypes : les cellules granulaires (GC) très abondantes, les cellules semi-granulaires (SGC) et les cellules hyalines (HC), rares (Li et al., 2021; I. Söderhäll et al., 2022). Les GC, qui contiennent de nombreux granules, sont les principales cellules qui stockent la PPO et les enzymes de coagulation. Les SGC, quant à elles, jouent plutôt un rôle dans l'encapsulation. Ces deux morphotypes cellulaires sont capables de phagocytose, mais ils ciblent des particules de taille différentes. Les HC pourraient être des hémocytes immatures libérés dans certaines conditions (Li et al., 2021). Les invertébrés possèdent également des « hémocytes sensilles », capables de migrer et d'infiltrer différents tissus. Elles sont par exemple retrouvées dans le canal des branchies et l'hépatopancréas



(Bouallegui, 2021). Ces cellules semblent jouer un rôle dans la réponse immunitaire comme dans la phagocytose, mais aussi dans le remplacement des hémocytes circulants lors d'une infection. Ce type cellulaire est cependant encore peu étudié et la compréhension de son implication dans la réponse immunitaire est à définir (Li et al., 2018). Ces hémocytes particuliers pourraient être à l'origine de la surexpression de certains gènes dans les branchies.

L'analyse des interactions entre ces différents types d'hémocytes et les tissus environnants est essentielle pour mieux comprendre la mise en place des réponses immunitaires chez les écrevisses. Cependant, les techniques basées sur la qPCR ne permettent pas de saisir toute la complexité de ces processus. Les nouvelles méthodes de séquençage de l'ARN contenu dans une unique cellule, appelé single-cell RNA sequencing, offre des avantages considérables. Cette approche permet non seulement de caractériser les différentes sous-populations cellulaires impliquées dans l'immunité, mais également d'identifier des populations cellulaires rares ou jusqu'alors inconnues (Farrell et al., 2018).

L'application de cette méthode aux cellules hématopoïétiques (organe responsable de la maturation des hémocytes) et aux hémocytes circulantes de l'hémolymphe des écrevisses a récemment permis de caractériser différentes populations cellulaires de *P. leniusculus* au niveau transcriptomique (I. Söderhäll et al., 2022). Ainsi, les auteurs ont identifié divers types d'hémocytes circulants encore non décrits qui laissent penser que les hémocytes sont plus diversifiés que ce qui était connu jusqu'à présent. De plus, ils ont découvert des populations cellulaires dans l'organe hématopoïétique présentant des caractéristiques de précurseurs des hémocytes, ainsi que des cellules impliquées dans l'homéostasie du fer, inconnu jusqu'alors (I. Söderhäll et al., 2022). À l'avenir, il serait intéressant de développer cette méthode sur les hémocytes d'écrevisses infectées afin d'étudier l'évolution de ces populations au cours d'une cinétique d'infection. Elle permettrait d'apporter de nouvelles informations sur la mise en place de la réponse immunitaire au niveau transcriptomique. Cependant, cette méthode, bien qu'extrêmement informative, présente des limites. En effet, elle permet uniquement de distinguer des populations transcriptomiques et non morphologiques. C'est pourquoi, il est nécessaire de coupler cette analyse avec du FISH (Fluorescence in situ hybridization) pour associer à une population transcriptomique un morphotype cellulaire (I. Söderhäll et al., 2022). En conclusion, les récentes avancées dans l'étude des hémocytes et des tissus immunitaires chez les écrevisses grâce aux outils de transcriptomique offrent des perspectives nouvelles pour la compréhension de leur réponse immunitaire. La diversité fonctionnelle des hémocytes et leur interaction avec les différents tissus mettent en lumière la complexité des réponses immunitaires.

Conclusion :

Cette étude apporte des informations complémentaires concernant l'impact des écrevisses exotiques envahissantes, notamment *Faxonius rusticus*, *Procambarus clarkii* et *Pacifastacus leniusculus*, sur les écosystèmes français. Leur rôle en tant que réservoirs du pathogène *Aphanomyces astaci*, responsable de la peste des écrevisses, constitue une menace croissante pour les espèces autochtones, comme *Austropotamobius pallipes*. Les travaux menés ont permis de mieux comprendre la dynamique de transmission du pathogène à travers le développement de nouveaux outils de détection, comme les marqueurs microsatellites et les analyses d'ADN environnemental. Cependant, malgré les efforts de réglementation et de sensibilisation, de nouvelles introductions d'espèces continuent d'aggraver cette menace, justifiant la nécessité d'actions plus strictes et coordonnées au niveau national et européen. La persistance de *A. astaci* et les interactions complexes entre les espèces exotiques envahissantes et les populations locales appellent à une vigilance accrue et des études épidémiologiques à plus long terme pour mieux comprendre les mécanismes de résistance immunitaire et les échanges interspécifiques de pathogènes. À l'avenir, le développement de programmes de conservation plus ciblés, incluant la sélection des individus résistants, ainsi que l'amélioration des techniques de suivi et de contrôle des écrevisses exotiques, seront essentiels pour protéger la biodiversité aquatique locale. Enfin, l'optimisation des méthodes moléculaires, comme l'étude des hémocytes par séquençage, pourrait fournir des informations clefs sur les réponses immunitaires et les mécanismes de résistance, ouvrant la voie à des solutions innovantes pour lutter contre ce parasite dévastateur.

Bibliographie

- Alderman, D.J., 1996. Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans: - EN- -FR- -ES-. Rev. Sci. Tech. OIE 15, 603–632. <https://doi.org/10.20506/rst.15.2.943>
- Alderman, D.J., Polglase, J.L., 1986. *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. Journal of Fish Diseases 9, 367–379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1986.tb01030.x>
- Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N., Van Baalen, M., 2009. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. J Evol Biol 22, 245–259. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01658.x>
- Anastácio, P.M., Correia, A.M., Menino, J.P., Martins Da Silva, L., 2005. Are rice seedlings affected by changes in water quality caused by crayfish? Ann. Limnol. - Int. J. Lim. 41, 1–6. <https://doi.org/10.1051/limn/2005002>
- Anda, P., Segura del Pozo, J., Díaz García, J.M., Escudero, R., García Peña, F.J., López Velasco, M.C., Sellek, R.E., Jiménez Chillarón, M.R., Sánchez Serrano, L.P., Martínez Navarro, J.F., 2001. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. Emerg Infect Dis 7, 575–582.
- Aquiloni, L., Martín, M.P., Gherardi, F., Diéguez-Urbeondo, J., 2011. The North American crayfish *Procambarus clarkii* is the carrier of the oomycete *Aphanomyces astaci* in Italy. Biol Invasions 13, 359–367. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9828-2>
- Arce, J., Diéguez-Urbeondo, J., 2015b. Structural damage caused by the invasive crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in rice fields of the Iberian Peninsula: a study case. Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie 186, 259–269. <https://doi.org/10.1127/fal/2015/0715>
- Aydin, H., Kokko, H., Makkonen, J., Kortet, R., Kukkonen, H., Jussila, J., 2014. The signal crayfish is vulnerable to both the As and the PsI-isolates of the crayfish plague. Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst. 03. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014004>
- Ballesteros, I., Martín, M., Cerenius, L., Söderhäll, K., Telleria, M., Diéguez-Urbeondo, J., 2007. Lack of specificity of the molecular diagnosis method for identification of *Aphanomyces astaci*. Bulletin Français De La Pêche Et De La Pisciculture - BULL FR PECHE PISCIC 17–24. <https://doi.org/10.1051/kmae:2007002>
- Barbaresi, S., Tricarico, E., Gherardi, F., 2004. Factors inducing the intense burrowing activity of the red-swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, an invasive species. Naturwissenschaften 91, 342–345. <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0533-9>
- Baudry, T., 2022. Étude des impacts de l'écrevisse exotique envahissante *Cherax quadricarinatus* sur les hydrosystèmes de Martinique (These de doctorat). Poitiers.
- Baudry, T., Becking, T., Goût, J.-P., Arqué, A., Gan, H.M., Austin, C.M., Delaunay, C., Smith-Ravin, J., Roques, J.A.C., Grandjean, F., 2020. Invasion and distribution of the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Martinique. Knowl. Managt. Aquat. Ecosyst. 50. <https://doi.org/10.1051/kmae/2020041>
- Baudry, T., Mauvisseau, Q., Goût, J.-P., Arqué, A., Delaunay, C., Smith-Ravin, J., Sweet, M., Grandjean, F., 2021. Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot, an eDNA-based success story. Ecological Indicators 126, 107637. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107637>
- Baudry, T., Smith-Ravin, J., Arqué, A., Goût, J.-P., Cucherousset, J., Paillisson, J.-M., Grandjean, F., 2024. Trophic niche of the invasive *Cherax quadricarinatus* and extent of competition with native shrimps in insular freshwater food webs. Biol Invasions 26, 3227–3241. <https://doi.org/10.1007/s10530-024-03373-8>
- Beakes, G.W., Glockling, S.L., Sekimoto, S., 2012. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi.” Protoplasma 249, 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0269-2>
- Becking, T., Kiselev, A., Rossi, V., Street-Jones, D., Grandjean, F., Gaulin, E., 2022.



- Pathogenicity of animal and plant parasitic *Aphanomyces* spp and their economic impact on aquaculture and agriculture. *Fungal Biology Reviews* 40, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.08.001>
- Blackburn, T.M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J.T., Duncan, R.P., Jarošík, V., Wilson, J.R.U., Richardson, D.M., 2011. A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 26, 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023>
- Bláha, M., Weiperth, A., Patoka, J., Szajbert, B., Balogh, E.R., Staszny, Á., Ferincz, Á., Lente, V., Maciaszek, R., Kouba, A., 2022. The pet trade as a source of non-native decapods: the case of crayfish and shrimps in a thermal waterbody in Hungary. *Environ Monit Assess* 194, 795. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10361-9>
- Blair, M.W., Giraldo, M.C., Buendía, H.F., Tovar, E., Duque, M.C., Beebe, S.E., 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 113, 100–109. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0276-4>
- Bobeldyk, A.M., Lamberti, G.A., 2008. A Decade after Invasion: Evaluating the Continuing Effects of Rusty Crayfish on a Michigan River. *Journal of Great Lakes Research* 34, 265–275. [https://doi.org/10.3394/0380-1330\(2008\)34\[265:ADAIET\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3394/0380-1330(2008)34[265:ADAIET]2.0.CO;2)
- Boštjančić, L.L., Dragičević, P., Bonassin, L., Francesconi, C., Tarandek, A., Schardt, L., Rutz, C., Hudina, S., Schwenk, K., Lecompte, O., Theissinger, K., 2024. Expression of *C/EBP* and *Kr-h1* transcription factors under immune stimulation in the noble crayfish. *Gene* 929, 148813. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148813>
- Bouallegui, Y., 2021. A Comprehensive Review on Crustaceans' Immune System With a Focus on Freshwater Crayfish in Relation to Crayfish Plague Disease. *Frontiers in Immunology* 12.
- Bovbjerg, R.V., 1956. Some Factors Affecting Aggressive Behavior in Crayfish. *Physiological Zoology* 29, 127–136. <https://doi.org/10.1086/physzool.29.2.30152201>
- Bramard, M., Demers, A., Trouilhe, M.-C., Bachelier, E., Dumas, J.-C., Fournier, C., Broussard, E., Robin, O., Souty-Grosset, C., Grandjean, F., 2006. Distribution of indigenous and non-indigenous crayfish populations in the poitou-charentes region (france): evolution over the past 25 years. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 857–866. <https://doi.org/10.1051/kmae:2006027>
- Bryant, D., Crowther, D., Papas, P., n.d. Improving survey methods and understanding the effects of fire on burrowing and spiny crayfish in the Bunyip and South Gippsland catchments.
- Buchmann, K., Bresciani, J., 2006. Monogenea (phylum Platyhelminthes). Fish diseases and disorders. Volume 1: protozoan and metazoan infections, CABI Books 297–344. <https://doi.org/10.1079/9780851990156.0297>
- Buckingham, L.J., Ashby, B., 2022. Coevolutionary theory of hosts and parasites. *J Evol Biol* 35, 205–224. <https://doi.org/10.1111/jeb.13981>
- Bush, A., Compson, Z.G., Monk, W.A., Porter, T.M., Steeves, R., Emilson, E., Gagne, N., Hajibabaei, M., Roy, M., Baird, D.J., 2019. Studying Ecosystems With DNA Metabarcoding: Lessons From Biomonitoring of Aquatic Macroinvertebrates. *Front. Ecol. Evol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00434>
- Cadi, A., Joly, P., 2004. Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Biodiversity and Conservation* 13, 2511–2518. <https://doi.org/10.1023/B:BIOC.0000048451.07820.9c>
- Campbell-Lendrum, D., Manga, L., Bagayoko, M., Sommerfeld, J., 2015. Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370, 20130552. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0552>



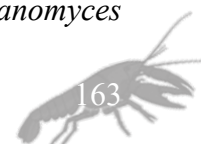
- Caprioli, R., Mrugała, A., Di Domenico, M., Curini, V., Giansante, C., Cammà, C., Petrusek, A., 2018. *Aphanomyces astaci* genotypes involved in recent crayfish plague outbreaks in central Italy. *Dis Aquat Organ* 130, 209–219. <https://doi.org/10.3354/dao03275>
- Casabella-Herrero, G., Higuera-Gamíndez, M., Azcona, V.A., Martín-Torrijos, L., Diéguez-Uribeondo, J., 2023. *Austropotamobius pallipes* can be infected by two haplotypes of *Aphanomyces astaci*: A key example from an outbreak at an *ex-situ* conservation facility. *Journal of Invertebrate Pathology* 201, 107989. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107989>
- Casabella-Herrero, G., Martínez-Ríos, M., Viljamaa-Dirks, S., Martín-Torrijos, L., Diéguez-Uribeondo, J., 2021. *Aphanomyces astaci* mtDNA: insights into the pathogen's differentiation and its genetic diversity from other closely related oomycetes. *Fungal Biology* 125, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.11.010>
- Cerenius, L., Bangyeekhun, E., Keyser, P., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2003. Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cellular Microbiology* 5, 353–357. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00282.x>
- Chan, J.-A., Fowkes, F.J.I., Beeson, J.G., 2014. Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3633–3657. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1614-3>
- Changeux, T., 2003. Évolution de la répartition des écrevisses en France métropolitaine selon les enquêtes nationales menées par le conseil supérieur de la pêche de 1977 à 2001. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 15–41. <https://doi.org/10.1051/kmae:2003002>
- Cheng, H., Dai, Y., Ruan, X., Duan, X., Zhang, C., Li, L., Huang, F., Shan, J., Liang, K., Jia, X., Wang, Q., Zhao, H., 2022. Effects of nanoplastic exposure on the immunity and metabolism of red crayfish (*Cherax quadricarinatus*) based on high-throughput sequencing. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 245, 114114. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114114>
- Chucholl, C., 2013. Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biol Invasions* 15, 125–141. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0273-2>
- Chucholl, C., Wendler, F., 2017. Positive selection of beautiful invaders: long-term persistence and bio-invasion risk of freshwater crayfish in the pet trade. *Biol Invasions* 19, 197–208. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1272-5>
- Collas, M., 2020. Ecrevisses exotiques envahissantes en France. Le rythme des introductions en milieu naturel s'accélère / Marc Collas. Ecrevisses exotiques envahissantes en France. Le rythme des introductions en milieu naturel s'accélère / Marc Collas, Le Courrier de la nature.
- Collas, M., Becking, T., Delpy, M., Pflieger, M., Bohn, P., Reynolds, J., Grandjean, F., 2016. Monitoring of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) population during a crayfish plague outbreak followed by rescue. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 1. <https://doi.org/10.1051/kmae/2015037>
- Collas, M., Burgun, V., Poulet, N., Penil, C., Grandjean, F., n.d. Résultats de l'enquête nationale 2014 32.
- Collas, M., Julien, C., Monnier, D., 2007. La situation des écrevisses en France résultats des enquêtes nationales réalisées entre 1977 et 2006 par le conseil supérieur de la pêche. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 1–38. <https://doi.org/10.1051/kmae:2007010>
- Combes, C., 2001. Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions. University of Chicago Press.
- Combes Claude, 2003. L'art d'être parasite: les associations du vivant, Nouvelle édition. ed, Champs. Flammarion, Paris.



- Crandall, K., Buhay, J., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae—Decapoda) in freshwater, in: *Hydrobiologia*. pp. 295–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7_32
- Crandall, K.A., De Grave, S., 2017. An updated classification of the freshwater crayfishes (Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list. *Journal of Crustacean Biology* 37, 615–653. <https://doi.org/10.1093/jcabi/rux070>
- Cuthbert, R.N., Pattison, Z., Taylor, N.G., Verbrugge, L., Diagne, C., Ahmed, D.A., Leroy, B., Angulo, E., Briski, E., Capinha, C., Catford, J.A., Dalu, T., Essl, F., Gozlan, R.E., Haubrock, P.J., Kourantidou, M., Kramer, A.M., Renault, D., Wasserman, R.J., Courchamp, F., 2021. Global economic costs of aquatic invasive alien species. *Science of The Total Environment* 775, 145238. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145238>
- Daly, E.Z., Chabrierie, O., Massol, F., Facon, B., Hess, M.C.M., Tasiemski, A., Grandjean, F., Chauvat, M., Viard, F., Forey, E., Folcher, L., Buisson, E., Boivin, T., Baltora-Rosset, S., Ulmer, R., Gibert, P., Thiébaud, G., Pantel, J.H., Heger, T., Richardson, D.M., Renault, D., 2023. A synthesis of biological invasion hypotheses associated with the introduction–naturalisation–invasion continuum. *Oikos* 2023, e09645. <https://doi.org/10.1111/oik.09645>
- Deal, E.N., Micek, S.T., Ritchie, D.J., Reichley, R.M., Dunne Jr., W.M., Kollef, M.H., 2007. Predictors of In-Hospital Mortality for Bloodstream Infections Caused by Enterobacter Species or Citrobacter freundii. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 27, 191–199. <https://doi.org/10.1592/phco.27.2.191>
- Di Domenico, M., Curini, V., Caprioli, R., Giansante, C., Mrugała, A., Mojžišová, M., Cammà, C., Petrusek, A., 2021. Real-Time PCR Assays for Rapid Identification of Common *Aphanomyces astaci* Genotypes. *Front. Ecol. Evol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.597585>
- Diagne, C., Leroy, B., Gozlan, R.E., Vaissière, A.-C., Assailly, C., Nuninger, L., Roiz, D., Jourdain, F., Jarić, I., Courchamp, F., 2020. InvaCost, a public database of the economic costs of biological invasions worldwide. *Sci Data* 7, 277. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00586-z>
- Diéguez-Urbeondo, J., Huang, T.-S., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1995. Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycological Research* 99, 574–578. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80716-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80716-8)
- Diéguez-Urbeondo, J., Söderhäll, K., 1993. *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture Research* 24, 761–765. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1993.tb00655.x>
- Diéguez-Urbeondo, J., Temiño, C., Múzquiz, J.L., 1997. The crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) in Spain. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 753–763. <https://doi.org/10.1051/kmae/1997051>
- Dörr, A.J.M., Scalici, M., Caldaroni, B., Magara, G., Scoparo, M., Goretti, E., Elia, A.C., 2020. Salinity tolerance of the invasive red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Hydrobiologia* 847, 2065–2081. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04231-z>
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Rev Camb Philos Soc* 81, 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Duggan, I.C., Champion, P.D., MacIsaac, H.J., 2018. Invertebrates associated with aquatic plants bought from aquarium stores in Canada and New Zealand. *Biol Invasions* 20, 3167–3178. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1766-4>



- Duggan, I.C., Rixon, C.A.M., MacIsaac, H.J., 2006. Popularity and Propagule Pressure: Determinants of Introduction and Establishment of Aquarium Fish. *Biol Invasions* 8, 377–382. <https://doi.org/10.1007/s10530-004-2310-2>
- Dunn, A.M., Hatcher, M.J., 2015. Parasites and biological invasions: parallels, interactions, and control. *Trends in Parasitology* 31, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.003>
- Dunn, A.M., Torchin, M.E., Hatcher, M.J., Kotanen, P.M., Blumenthal, D.M., Byers, J.E., Coon, C.A.C., Frankel, V.M., Holt, R.D., Hufbauer, R.A., Kanarek, A.R., Schierenbeck, K.A., Wolfe, L.M., Perkins, S.E., 2012. Indirect effects of parasites in invasions. *Functional Ecology* 26, 1262–1274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02041.x>
- 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. *Biol Invasions* 11, 315–324. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9249-7>
- Dunn, N., Priestley, V., Herraiz, A., Arnold, R., Savolainen, V., 2017. Behavior and season affect crayfish detection and density inference using environmental DNA. *Ecol Evol* 7, 7777–7785. <https://doi.org/10.1002/ece3.3316>
- Ebert, D., 1998. Experimental evolution of parasites. *Science* 282, 1432–1435. <https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1432>
- Emde, S., Kochmann, J., Kuhn, T., Dörge, D.D., Plath, M., Miesen, F.W., Klimpel, S., 2016. Cooling water of power plant creates “hot spots” for tropical fishes and parasites. *Parasitol Res* 115, 85–98. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4724-4>
- Ercoli, F., Ruokonen, T.J., Erkamo, E., Jones, R.I., Hämäläinen, H., 2015. Comparing the effects of introduced signal crayfish and native noble crayfish on the littoral invertebrate assemblages of boreal lakes. *Freshwater Science* 34, 555–563. <https://doi.org/10.1086/680517>
- Evers, H.-G., Pinnegar, J.K., Taylor, M.I., 2019. Where are they all from? – sources and sustainability in the ornamental freshwater fish trade. *Journal of Fish Biology* 94, 909–916. <https://doi.org/10.1111/jfb.13930>
- Facon, B., Genton, B.J., Shykoff, J., Jarne, P., Estoup, A., David, P., 2006. A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.012>
- Faulkes, Z., 2015. The global trade in crayfish as pets. *Crustacean Research* 44, 75–92. https://doi.org/10.18353/crustacea.44.0_75
- Ferreira, V., Bini, L.M., González Sagrario, M. de los Á., Kovalenko, K.E., Naselli-Flores, L., Padial, A.A., Padisák, J., 2023. Aquatic ecosystem services: an overview of the Special Issue. *Hydrobiologia* 850, 2473–2483. <https://doi.org/10.1007/s10750-023-05235-1>
- Filipova, L., n.d. Genetic variation in North-American crayfish species introduced to Europe and the prevalence of the crayfish plague pathogen in their population 132.
- Filipová, L., Petrusek, A., Matasová, K., Delaunay, C., Grandjean, F., 2013. Prevalence of the Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci* in Populations of the Signal Crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: Evaluating the Threat to Native Crayfish. *PLoS ONE* 8, e70157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070157>
- Flood, P.J., Duran, A., Barton, M., Mercado-Molina, A.E., Trexler, J.C., 2020. Invasion impacts on functions and services of aquatic ecosystems. *Hydrobiologia* 847, 1571–1586. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04211-3>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3, 294–299.
- Francesconi, C., Boštjančić, L.L., Bonassin, L., Schardt, L., Rutz, C., Makkonen, J., Schwenk, K., Lecompte, O., Theissinger, K., 2024. High variation of virulence in *Aphanomyces*



- astaci* strains lacks association with pathogenic traits and mtDNA haplogroups. *Journal of Invertebrate Pathology* 206, 108153. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108153>
- Francesconi, C., Makkonen, J., Schrimpf, A., Jussila, J., Kokko, H., Theissinger, K., 2021. Controlled Infection Experiment With *Aphanomyces astaci* Provides Additional Evidence for Latent Infections and Resistance in Freshwater Crayfish. *Front. Ecol. Evol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.647037>
- Freeman, A.S., Byers, J.E., 2006. Divergent induced responses to an invasive predator in marine mussel populations. *Science* 313, 831–833. <https://doi.org/10.1126/science.1125485>
- García-Berthou, E., Alcaraz, C., Pou-Rovira, Q., Zamora, L., Coenders, G., Feo, C., 2005. Introduction pathways and establishment rates of invasive aquatic species in Europe. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62, 453–463. <https://doi.org/10.1139/f05-017>
- Gaulin, E., Pel, M.J.C., Camborde, L., San-Clemente, H., Courbier, S., Dupouy, M.-A., Lengellé, J., Veyssiere, M., Le Ru, A., Grandjean, F., Cordaux, R., Moumen, B., Gilbert, C., Cano, L.M., Aury, J.-M., Guy, J., Wincker, P., Bouchez, O., Klopp, C., Dumas, B., 2018. Genomics analysis of *Aphanomyces* spp. identifies a new class of oomycete effector associated with host adaptation. *BMC Biol* 16, 43. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0508-5>
- Gertzen, E., Familiar, O., Leung, B., 2008. Quantifying invasion pathways: fish introductions from the aquarium trade. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65, 1265–1273. <https://doi.org/10.1139/F08-056>
- Gherardi, F., 2006. Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 39, 175–191. <https://doi.org/10.1080/10236240600869702>
- Grandjean, F., Collas, M., Uriarte, M., Rousset, M., 2021. First record of a marbled crayfish *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) population in France. *BIR* 10, 341–347. <https://doi.org/10.3391/bir.2021.10.2.12>
- Grandjean, F., Gilbert, C., Razafimafondy, F., Vucić, M., Delaunay, C., Gindre, P., Bouchard, J., Raimond, M., Moumen, B., 2019. A new bunya-like virus associated with mass mortality of white-clawed crayfish in the wild. *Virology* 533, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.05.014>
- Grandjean, F., Roques, J., Delaunay, C., Petrusek, A., Becking, T., Collas, M., 2017a. Status of *Pacifastacus leniusculus* and its role in recent crayfish plague outbreaks in France: improving distribution and crayfish plague infection patterns. *AI* 12, 541–549. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.4.10>
- Grandjean, F., Roques, J., Delaunay, C., Petrusek, A., Becking, T., Collas, M., 2017b. Status of *Pacifastacus leniusculus* and its role in recent crayfish plague outbreaks in France: improving distribution and crayfish plague infection patterns. *AI* 12, 541–549. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.4.10>
- Grandjean, F., Vrâlstad, T., Diéguez-Urbeondo, J., Jelić, M., Mangombi, J., Delaunay, C., Filipová, L., Rezinciuc, S., Kozubíková-Balcarová, E., Guyonnet, D., Viljamaa-Dirks, S., Petrusek, A., 2014. Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Vet Microbiol* 170, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.020>
- Gross, E.M., Groffier, H., Pestelard, C., Hussner, A., 2020. Ecology and Environmental Impact of *Myriophyllum heterophyllum*, an Aggressive Invader in European Waterways. *Diversity* 12, 127. <https://doi.org/10.3390/d12040127>
- Güiza, J., Barriá, I., Sáez, J.C., Vega, J.L., 2018. Innexins: Expression, Regulation, and Functions. *Frontiers in Physiology* 9, 1414. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01414>
- Gutekunst, J., Andriantsoa, R., Falckenhayn, C., Hanna, K., Stein, W., Rasamy, J., Lyko, F., 2018. Clonal genome evolution and rapid invasive spread of the marbled crayfish. *Nat*

- Ecol Evol 2, 567–573. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0467-9>
- Hatcher, M.J., Dick, J.T.A., Dunn, A.M., 2014. Parasites that change predator or prey behaviour can have keystone effects on community composition. *Biology Letters* 10, 20130879. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0879>
- Hatcher, M.J., Dunn, A.M., 2011. *Parasites in Ecological Communities: From Interactions to Ecosystems*, 1st ed. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511987359>
- Hatzenbuehler, C., Kelly, J.R., Martinson, J., Okum, S., Pilgrim, E., 2017. Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species. *Sci Rep* 7, 46393. <https://doi.org/10.1038/srep46393>
- Haubrock, P.J., Kubec, J., Veselý, L., Buřič, M., Tricarico, E., Kouba, A., 2019. Water temperature as a hindrance, but not limiting factor for the survival of warm water invasive crayfish introduced in cold periods. *Journal of Great Lakes Research* 45, 788–794. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.05.006>
- Herbert, B., Jones, J.B., Mohan, C.V., Perera, R.P., 2019. Impacts of epizootic ulcerative syndrome on subsistence fisheries and wildlife. *Rev Sci Tech* 38, 459–475. <https://doi.org/10.20506/rst.38.2.2998>
- Hill, A.M., Lodge, D.M., 1900. Replacement of resident crayfishes by an exotic crayfish: the roles of competition and predation. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1999\)009\[0678:RORCBA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1999)009[0678:RORCBA]2.0.CO;2)
- Hobbs, R.J., Higgs, E., Harris, J.A., 2009. Novel ecosystems: implications for conservation and restoration. *Trends Ecol Evol* 24, 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.05.012>
- Holdich, D.M., Pöckl, M., 2007. Invasive crustaceans in European inland waters, in: Gherardi, F. (Ed.), *Biological Invaders in Inland Waters: Profiles, Distribution, and Threats*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 29–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6029-8_2
- Holdich, D.M., Reynolds, J.D., Souty-Grosset, C., Sibley, P.J., 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.* 11. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009025>
- Huang, T., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1994. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* 126, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90243-7)
- Hulme, P.E., 2009. Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology* 46, 10–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x>
- Hulme, P.E., Bacher, S., Kenis, M., Klotz, S., Kühn, I., Minchin, D., Nentwig, W., Olenin, S., Panov, V., Pergl, J., Pyšek, P., Roques, A., Sol, D., Solarz, W., Vilà, M., 2008. Grasping at the routes of biological invasions: a framework for integrating pathways into policy. *Journal of Applied Ecology* 45, 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01442.x>
- Hussner, A., Stiers, I., Verhofstad, M.J.J.M., Bakker, E.S., Grutters, B.M.C., Haury, J., van Valkenburg, J.L.C.H., Brundu, G., Newman, J., Clayton, J.S., Anderson, L.W.J., Hofstra, D., 2017. Management and control methods of invasive alien freshwater aquatic plants: A review. *Aquatic Botany* 136, 112–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.08.002>
- Ion, M.C., Bloomer, C.C., Bărcăscu, T.I., Oficialdegui, F.J., Shoobs, N.F., Williams, B.W., Scheers, K., Clavero, M., Grandjean, F., Collas, M., Baudry, T., Loughman, Z., Wright, J.J., Ruokonen, T.J., Chucholl, C., Guareschi, S., Koese, B., Banyai, Z.M., Hodson, J., Hurt, M., Kaldre, K., Lipták, B., Fetzner, J.W., Cancellario, T., Weiperth, A., Birzaks, J., Trichkova, T., Todorov, M., Balalaikins, M., Griffin, B., Petko, O.N., Acevedo-

- Alonso, A., D'Elia, G., Śliwińska, K., Alekhnovich, A., Choong, H., South, J., Whiterod, N., Zorić, K., Haase, P., Soto, I., Brady, D.J., Haubrock, P.J., Torres, P.J., Şadrin, D., Vlach, P., Kaya, C., Woo Jung, S., Kim, J.-Y., Vermeersch, X.H.C., Bonk, M., Guiaşu, R., Harlioğlu, M.M., Devlin, J., Kurtul, I., Błońska, D., Boets, P., Masigol, H., Cabe, P.R., Jussila, J., Vrålstad, T., Beresford, D.V., Reid, S.M., Patoka, J., Strand, D.A., Tarkan, A.S., Steen, F., Abeel, T., Harwood, M., Auer, S., Kelly, S., Giantsis, I.A., Maciaszek, R., Alvanou, M.V., Aksu, Ö., Hayes, D.M., Kawai, T., Tricarico, E., Chakandinakira, A., Barnett, Z.C., Kudor, Ş.G., Beda, A.E., Vilcea, L., Mizeranschi, A.E., Neagul, M., Licz, A., Cotoarbă, A.D., Petrusek, A., Kouba, A., Taylor, C.A., Pârvulescu, L., 2024b. World of Crayfish™: a web platform towards real-time global mapping of freshwater crayfish and their pathogens. *PeerJ* 12, e18229. <https://doi.org/10.7717/peerj.18229>
- Jackson, M.C., Jones, T., Milligan, M., Sheath, D., Taylor, J., Ellis, A., England, J., Grey, J., 2014. Niche differentiation among invasive crayfish and their impacts on ecosystem structure and functioning. *Freshwater Biology* 59, 1123–1135. <https://doi.org/10.1111/fwb.12333>
- James, J., Mrugała, A., Oidtmann, B., Petrusek, A., Cable, J., 2017a. Apparent interspecific transmission of *Aphanomyces astaci* from invasive signal to virile crayfish in a sympatric wild population. *Journal of Invertebrate Pathology* 145, 68–71. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.02.003>
- James, J., Nutbeam-Tuffs, S., Cable, J., Mrugała, A., Viñuela-Rodríguez, N., Petrusek, A., Oidtmann, B., 2017b. The prevalence of *Aphanomyces astaci* in invasive signal crayfish from the UK and implications for native crayfish conservation. *Parasitology* 144, 411–418. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002419>
- Jansen, W., Geard, N., Mosindy, T., Olson, G., Turner, M., 2009. Relative abundance and habitat association of three crayfish (*Orconectes virilis*, *O. rusticus*, and *O. immunis*) near an invasion front of *O. rusticus*, and long-term changes in their distribution in Lake of the Woods, Canada. *AI* 4, 627–649. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.4.9>
- Janzen, D.H., 1970. Herbivores and the Number of Tree Species in Tropical Forests. *The American Naturalist* 104, 501–528. <https://doi.org/10.1086/282687>
- Jiang, X., Zheng, P., Soto, I., Haubrock, P.J., Chen, J., Ji, L., 2022. Global economic costs and knowledge gaps of invasive gastropods. *Ecological Indicators* 145, 109614. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109614>
- Johansson, M.W., Holmblad, T., Thörnqvist, P.O., Cammarata, M., Parrinello, N., Söderhäll, K., 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. *J Cell Sci* 112 (Pt 6), 917–925. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.6.917>
- Jussila, J., Edsman, L., Maguire, I., Diéguez-Urbeondo, J., Theissinger, K., 2021. Money Kills Native Ecosystems: European Crayfish as an Example. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9.
- Jussila, J., Toljamo, A., Makkonen, J., Kukkonen, H., Kokko, H., 2014. Practical disinfection chemicals for fishing and crayfishing gear against crayfish plague transfer. *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.* 02. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014002>
- Jussila, J., Vrezec, A., Jaklič, T., Kukkonen, H., Makkonen, J., Kokko, H., 2017. *Aphanomyces astaci* isolate from latently infected stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) population is virulent. *Journal of Invertebrate Pathology* 149, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.07.003>
- Karjalainen, J., Ruokonen, T.J., Marjomäki, T.J., Martikainen, A., Pursiainen, M., Sarvala, J., Tarvainen, M., Ventelä, A.-M., 2015. Predation by signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* on fish eggs and its consequences for coregonid recruitment. *Journal of Fish*

- Biology 86, 651–667. <https://doi.org/10.1111/jfb.12588>
- Keller, N.S., Pfeiffer, M., Roessink, I., Schulz, R., Schrimpf, A., 2014. First evidence of crayfish plague agent in populations of the marbled crayfish (*Procambarus fallax form virginalis*). *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.* 15. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014032>
- Kokko, H., Harlioglu, M.M., Aydin, H., Makkonen, J., Gökmen, G., Aksu, Ö., Jussila, J., 2018. Observations of crayfish plague infections in commercially important narrow-clawed crayfish populations in Turkey. *KAMOE* 2018. <https://doi.org/10.1051/kmae/2018001>
- Komai, T., Gotoh, R.O., Sado, T., Miya, M., 2019. Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding and Metagenomics* 3, e33835. <https://doi.org/10.3897/mbmg.3.33835>
- Kouba, A., Oficialdegui, F.J., Cuthbert, R.N., Kourantidou, M., South, J., Tricarico, E., Gozlan, R.E., Courchamp, F., Haubrock, P.J., 2022. Identifying economic costs and knowledge gaps of invasive aquatic crustaceans. *Science of The Total Environment* 813, 152325. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152325>
- Kouba, A., Petrusek, A., Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.* 05. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014007>
- Kozák, P., Duris, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Kočárková, I., Kouba, A., Kozubíková-Balcarová, E., Policar, T., 2015. Crayfish Biology and Culture.
- Kozubíková, E., Filipová, L., Kozák, P., Duris, Z., Martín, M.P., Diéguez-Urbeondo, J., Oidtmann, B., Petrusek, A., 2009. Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. *Conserv Biol* 23, 1204–1213. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01240.x>
- Kozubíková, E., Petrusek, A., Ďuriš, Z., Martín, M.P., Diéguez-Urbeondo, J., Oidtmann, B., 2008. The old menace is back: Recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Aquaculture* 274, 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.015>
- Kozubíková, E., Puky, M., Kiszely, P., Petrusek, A., 2010. Crayfish plague pathogen in invasive North American crayfish species in Hungary. *J Fish Dis* 33, 925–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01199.x>
- Kozubíková, E., Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Petrusek, A., 2011a. Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. *Journal of invertebrate pathology* 108, 214–6. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.002>
- Kozubíková, E., Vrålstad, T., Filipová, L., Petrusek, A., 2011b. Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan MGB real-time PCR. *Dis Aquat Organ* 97, 113–125. <https://doi.org/10.3354/dao02411>
- Kozubíková, E., Vrålstad, T., Filipová, L., Petrusek, A., 2011c. Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan MGB real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 97, 113–125. <https://doi.org/10.3354/dao02411>
- Kozubíková-Balcarová, E., Beran, L., Ďuriš, Z., Fischer, D., Horká, I., Svobodová, J., Petrusek, A., 2014. Status and recovery of indigenous crayfish populations after recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Ethology Ecology & Evolution* 26, 299–319. <https://doi.org/10.1080/03949370.2014.897652>
- Laffitte, M., Baudry, T., Guilmet, M., Andrieu, T., Poulet, N., Duperray, T., Carine, D., Collas, M., Moumen, B., Sudres, M., Grandjean, F., 2023. A new invader in freshwater ecosystems in France: the rusty crayfish *Faxonius rusticus*. *BIR* 12, 457–468.



- <https://doi.org/10.3391/bir.2023.12.2.10>
- Laffitte, M., Mojžišová, M., Delaunay, C., Collas, M., Petrusek, A., Grandjean, F., 2024. Prevalence of the crayfish plague pathogen in red swamp crayfish populations in western France: How serious is the risk for the native white-clawed crayfish? *J Invertebr Pathol* 205, 108128. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108128>
- Larson, E.R., Abbott, C.L., Usio, N., Azuma, N., Wood, K.A., Herborg, L., Olden, J.D., 2012. The signal crayfish is not a single species: cryptic diversity and invasions in the Pacific Northwest range of *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater Biology* 57, 1823–1838. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02841.x>
- Lele, S.-F., Pârvulescu, L., 2017. Experimental evidence of the successful invader *Orconectes limosus* outcompeting the native *Astacus leptodactylus* in acquiring shelter and food. *Biologia* 72, 877–885. <https://doi.org/10.1515/biolog-2017-0094>
- Li, M., Wang, J., Deng, H., Li, L., Huang, X., Chen, D., Ouyang, P., Geng, Y., Yang, S., Yin, L., Luo, W., Jiang, J., 2022. The Damage of the Crayfish (*Procambarus Clarkii*) Digestive Organs Caused by *Citrobacter Freundii* Is Associated With the Disturbance of Intestinal Microbiota and Disruption of Intestinal-Liver Axis Homeostasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12, 940576. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.940576>
- Lin, X., Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2007. Purification of properoxinectin, a myeloperoxidase homologue and its activation to a cell adhesion molecule. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.06.018>
- Lipták, B., Mrugała, A., Pekárik, L., Mutkovič, A., Grul'a, D., Petrusek, A., Kouba, A., 2016. Expansion of the marbled crayfish in Slovakia: beginning of an invasion in the Danube catchment? *Journal of Limnology* 75. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1313>
- Liu, X., He, X., An, Z., Sun, W., Chen, N., Gao, X., Li, X., Zhang, X., 2020. *Citrobacter freundii* infection in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and host immune-related gene expression profiles. *Aquaculture* 515, 734499. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734499>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lodge, D., Deines, A., Gherardi, F., Yeo, D., Arcella, T., Elgin, A., Barnes, M., Chadderton, W., Feder, J., Gantz, C., Howard, G., Jerde, C., Peters, B., Peters, J., Reisinger, L., Turner, C., Wittmann, M., Yiwen, Z., 2012. Global Introductions of Crayfishes: Evaluating the Impact of Species Invasions on Ecosystem Services. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 43, 449–472. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-111511-103919>
- Lodge, D.M., Kershner, M.W., Aloï, J.E., Covich, A.P., 1994. Effects of an Omnivorous Crayfish (*Orconectes Rusticus*) on a Freshwater Littoral Food Web. *Ecology* 75, 1265–1281. <https://doi.org/10.2307/1937452>
- Longshaw, M., 2011. Diseases of crayfish: A review. *Journal of Invertebrate Pathology, Diseases of Edible Crustaceans* 106, 54–70. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.013>
- Loureiro, T.G., Anastácio, P.M., Araujo, P.B., Souty-Grosset, C., Almerão, M.P., 2015. Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion - an overview. <https://doi.org/10.1590/S0104-64972014002214>
- Lovell, S.J., Stone, S.F., Fernandez, L., 2006. The Economic Impacts of Aquatic Invasive Species: A Review of the Literature. *Agricultural and Resource Economics Review* 35, 195–208. <https://doi.org/10.1017/S1068280500010157>
- Lowe, S., n.d. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global



- invasive species database [WWW Document]. URL <https://library.sprep.org/content/100-worlds-worst-invasive-alien-species-selection-global-invasive-species-database> (accessed 8.22.23).
- Ložek, F., Patoka, J., Bláha, M., 2021. Another hitchhiker exposed: *Diceratocephala boschmai* (Platyhelminthes: Temnocephalida) found associated with ornamental crayfish *Cherax* spp. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 25. <https://doi.org/10.1051/kmae/2021023>
- Ludányi, M., Peeters, E.T.H.M.E., Kiss, B., Roessink, I., 2016. Distribution of crayfish species in Hungarian waters. *Global Ecology and Conservation* 8, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.09.009>
- MacDonald, A.S., Araujo, M.I., Pearce, E.J., 2002. Immunology of Parasitic Helminth Infections. *Infect Immun* 70, 427–433.
- Maguire, I., Jelić, M., Klobučar, G., Delpy, M., Delaunay, C., Grandjean, F., 2016a. Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Diseases of Aquatic Organisms* 118, 45–53. <https://doi.org/10.3354/dao02955>
- Makkonen, J., Jussila, J., Kortet, R., Vainikka, A., Kokko, H., 2012. Differing virulence of *Aphanomyces astaci* isolates and elevated resistance of noble crayfish *Astacus astacus* against crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms* 102, 129–136. <https://doi.org/10.3354/dao02547>
- Makkonen, J., Jussila, J., Panteleit, J., Keller, N.S., Schrimpf, A., Theissinger, K., Kortet, R., Martín-Torrijos, L., Sandoval-Sierra, J.V., Diéguez-Urbeondo, J., Kokko, H., 2018. MtDNA allows the sensitive detection and haplotyping of the crayfish plague disease agent *Aphanomyces astaci* showing clues about its origin and migration. *Parasitology* 145, 1210–1218. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000227>
- Makkonen, J., Kokko, H., Gökmen, G., Ward, J., Umek, J., Kortet, R., Petrusek, A., Jussila, J., 2019. The signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in Lake Tahoe (USA) hosts multiple *Aphanomyces* species. *Journal of Invertebrate Pathology* 166, 107218. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107218>
- Makkonen, J., Kokko, H., Vainikka, A., Kortet, R., Jussila, J., 2014. Dose-dependent mortality of the noble crayfish (*Astacus astacus*) to different strains of the crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). *Journal of Invertebrate Pathology* 115, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.009>
- Martínez-Ríos, M., Martín-Torrijos, L., Diéguez-Urbeondo, J., 2023. Protocols for studying the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, and its host-pathogen interactions. *Journal of Invertebrate Pathology* 201, 108018. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108018>
- Martín-Torrijos, L., Correa-Villalona, A.J., Azofeifa-Solano, J.C., Villalobos-Rojas, F., Wehrtmann, I.S., Diéguez-Urbeondo, J., 2021a. First Detection of the Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci* in Costa Rica: European Mistakes Should Not Be Repeated. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9.
- Martín-Torrijos, L., Correa-Villalona, A.J., Pradillo, A., Diéguez-Urbeondo, J., 2021b. Coexistence of Two Invasive Species, *Procambarus clarkii* and *Aphanomyces astaci*, in Brackish Waters of a Mediterranean Coastal Lagoon. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8.
- Martín-Torrijos, L., Hernández-Pérez, A., Monroy-López, J.F., Diéguez-Urbeondo, J., 2023. *Aphanomyces astaci* in Mexico: A new haplotype from dwarf crayfish *Cambarellus montezumae*. *J Invertebr Pathol* 201, 108000. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108000>
- Martín-Torrijos, L., Kawai, T., Makkonen, J., Jussila, J., Kokko, H., Diéguez-Urbeondo, J., 2018. Crayfish plague in Japan: A real threat to the endemic *Cambaroides japonicus*. *PLoS ONE* 13, e0195353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195353>
- Martín-Torrijos, L., Kokko, H., Makkonen, J., Jussila, J., Diéguez-Urbeondo, J., 2019.



- Mapping 15 years of crayfish plague in the Iberian Peninsula: The impact of two invasive species on the endangered native crayfish. *PLoS One* 14, e0219223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219223>
- Martín-Torrijos, L., Llach, M.C., Pou-Rovira, Q., Diéguez-Urbeondo, J., 2017. Resistance to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* (Oomycota) in the endangered freshwater crayfish species, *Austropotamobius pallipes*. *PLOS ONE* 12, e0181226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181226>
- Martín-Torrijos, L., Martínez-Ríos, M., Casabella-Herrero, G., Adams, S.B., Jackson, C.R., Diéguez-Urbeondo, J., 2021c. Tracing the origin of the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, to the Southeastern United States. *Sci Rep* 11, 9332. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88704-8>
- Matasová, K., Kozubíková, E., Svoboda, J., Jarošík, V., Petrusek, A., 2011. Temporal variation in the prevalence of the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, in three Czech spiny-cheek crayfish populations. *Knowl. Manag. Aquatic Ecosyst.* 14. <https://doi.org/10.1051/kmae/2011029>
- Matsuzaki, S.S., Usio, N., Takamura, N., Washitani, I., 2009. Contrasting impacts of invasive engineers on freshwater ecosystems: an experiment and meta-analysis. *Oecologia* 158, 673–686. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1180-1>
- Méthot, P.-O., Alizon, S., 2014. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence* 5, 775–785. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.960726>
- Minardi, D., Studholme, D.J., van der Giezen, M., Pretto, T., Oidtmann, B., 2018. New genotyping method for the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on whole genome data. *Journal of Invertebrate Pathology* 156, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.06.002>
- Mirimin, L., Brady, D., Gammell, M., Lally, H., Minto, C., Graham, C.T., Slattery, O., Cheslett, D., Morrissey, T., Reynolds, J., White, S., Nelson, B., 2022. Investigation of the first recent crayfish plague outbreak in Ireland and its subsequent spread in the Bruskey River and surrounding areas. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 13. <https://doi.org/10.1051/kmae/2022011>
- Mohi, G.K., Datta, P., Chander, J., Das, A., 2017. *Citrobacter freundii* as a cause of acute suppurative thyroiditis in an immunocompetent adult female. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 60, 282. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.208400>
- Mojžišová, M., Jitka, S., Kozubíková-Balcarová, E., Eva, Š., Robin, S., Bílý, M., Kouba, A., Petrusek, A., 2022. Long-term changes in the prevalence of the crayfish plague pathogen and its genotyping in invasive crayfish species in Czechia. *NeoBiota* 74, 105–127. <https://doi.org/10.3897/neobiota.74.79087>
- Mojžišová, M., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Vlach, P., Svobodová, J., Kouba, A., Petrusek, A., 2020. Crayfish plague in Czechia: Outbreaks from novel sources and testing for chronic infections. *Journal of Invertebrate Pathology* 173, 107390. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107390>
- Mojžišová, M., Weiperth, A., Gebauer, R., Laffitte, M., Patoka, J., Grandjean, F., Kouba, A., Petrusek, A., 2024. Diversity and distribution of *Aphanomyces astaci* in a European hotspot of ornamental crayfish introductions. *Journal of Invertebrate Pathology* 202, 108040. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108040>
- Moody, M.L., Les, D.H., 2007. Geographic distribution and genotypic composition of invasive hybrid watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* × *M. sibiricum*) populations in North America. *Biol Invasions* 9, 559–570. <https://doi.org/10.1007/s10530-006-9058-9>
- Mrugała, A., Kawai, T., Kozubíková-Balcarová, E., Petrusek, A., 2017. *Aphanomyces astaci* presence in Japan: a threat to the endemic and endangered crayfish species *Cambaroides japonicus*? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 27, 103–114.



- <https://doi.org/10.1002/aqc.2674>
- Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Chucholl, C., Resino, S., Viljamaa-Dirks, S., Vukić, J., Petrusek, A., 2014. Trade of ornamental crayfish in Europe as a possible introduction pathway for important crustacean diseases: crayfish plague and white spot syndrome. *Biol Inv* 12, 1313–1326.
- Musil, M., Buøiè, M., Policar, T., Kouba, A., Kozák, P., 2010. Comparison of diurnal and nocturnal activity between noble crayfish (*Astacus astacus*) and spinycheek crayfish (*Orconectes limosus*). *Freshwater Crayfish* 17, 189–193.
- Neira, C., Grosholz, E.D., Levin, L.A., Blake, R., 2006. Mechanisms Generating Modification of Benthos Following Tidal Flat Invasion by a *Spartina* Hybrid. *Ecological Applications* 16, 1391–1404. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2006\)016\[1391:MGMBOF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2006)016[1391:MGMBOF]2.0.CO;2)
- Nota, A., Santovito, A., Gattelli, R., Tiralongo, F., 2024. From Fresh to Salt Waters: First Reports of the Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in Mediterranean Marine Waters. *Hydrobiology* 3, 1–10. <https://doi.org/10.3390/hydrobiology3010001>
- Novák, J., Kalous, L., Patoka, J., 2020. Modern ornamental aquaculture in Europe: early history of freshwater fish imports. *Reviews in Aquaculture* 12, 2042–2060. <https://doi.org/10.1111/raq.12421>
- Nylund, V., Westman, K., 2000. The Prevalence of Crayfish Plague (*Aphanomyces Astaci*) in Two Signal Crayfish (*Pacifastacus Leniusculus*) Populations in Finland. *Journal of Crustacean Biology* 20, 777–785. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990099>
- Nyström, P., Brönmark, C., Granéli, W., 1999. Influence of an Exotic and a Native Crayfish Species on a Littoral Benthic Community. *Oikos* 85, 545–553. <https://doi.org/10.2307/3546704>
- Oficialdegui, F.J., Clavero, M., Sánchez, M.I., Green, A.J., Boyero, L., Michot, T.C., Klose, K., Kawai, T., Lejeusne, C., 2019a. Unravelling the global invasion routes of a worldwide invader, the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Freshwater Biology* 64, 1382–1400. <https://doi.org/10.1111/fwb.13312>
- Oficialdegui, F.J., Sánchez, M.I., Monsalve-Carcaño, C., Boyero, L., Bosch, J., 2019b. The invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) increases infection of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Biol Invasions* 21, 3221–3231. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02041-6>
- Oidtman, B., Geiger, S., Steinbauer, P., Culas, A., Hoffmann, R., 2006. Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.* 72, 53–64. <https://doi.org/10.3354/dao072053>
- Oidtman, B., Heitz, E., Rogers, D., Hoffmann, R., 2002. Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.* 52, 159–167. <https://doi.org/10.3354/dao052159>
- Olden, J.D., McCarthy, J.M., Maxted, J.T., Fetzer, W.W., Vander Zanden, M.J., 2006. The rapid spread of rusty crayfish (*Orconectes rusticus*) with observations on native crayfish declines in Wisconsin (U.S.A.) over the past 130 years. *Biol Invasions* 8, 1621–1628. <https://doi.org/10.1007/s10530-005-7854-2>
- Olden, J.D., Whattam, E., Wood, S.A., 2021. Online auction marketplaces as a global pathway for aquatic invasive species. *Hydrobiologia* 848, 1967–1979. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04407-7>
- Osei Sekyere, J., Reta, M.A., 2021. Global evolutionary epidemiology and resistome dynamics of *Citrobacter* species, *Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella variicola*, and *Proteaceae* clones. *Environ Microbiol* 23, 7412–7431. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15387>
- Padilla, D.K., Williams, S.L., 2004. Beyond ballast water: aquarium and ornamental trades as sources of invasive species in aquatic ecosystems. *Frontiers in Ecology and the*



- Environment 2, 131–138. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0131:BBWAAO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0131:BBWAAO]2.0.CO;2)
- Panteleit, J., Horvath, T., Jussila, J., Makkonen, J., Perry, W., Schulz, R., Theissinger, K., Schrimpf, A., 2019. Invasive rusty crayfish (*Faxonius rusticus*) populations in North America are infected with the crayfish plague disease agent (*Aphanomyces astaci*). *Freshwater Science* 38, 425–433. <https://doi.org/10.1086/703417>
- Panteleit, J., Keller, N., Kokko, H., Jussila, J., Makkonen, J., Theissinger, K., Schrimpf, A., 2017. Investigation of ornamental crayfish reveals new carrier species of the crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *AI* 12, 77–83. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.1.08>
- Panteleit, J., Keller, N.S., Diéguez-Urbeondo, J., Makkonen, J., Martín-Torrijos, L., Patrulea, V., Pîrvu, M., Preda, C., Schrimpf, A., Pârvolescu, L., 2018. Hidden sites in the distribution of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in Eastern Europe: Relicts of genetic groups from older outbreaks? *Journal of Invertebrate Pathology* 157, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.05.006>
- Pârvolescu, L., Schrimpf, A., Kozubíková, E., Cabanillas Resino, S., Vrålstad, T., Petrusek, A., Schulz, R., 2012. Invasive crayfish and crayfish plague on the move: first detection of the plague agent *Aphanomyces astaci* in the Romanian Danube. *Dis. Aquat. Org.* 98, 85–94. <https://doi.org/10.3354/dao02432>
- Patoka, J., Bláha, M., Devetter, M., Rylková, K., Čadková, Z., Kalous, L., 2016. Aquarium hitchhikers: attached commensals imported with freshwater shrimps via the pet trade. *Biol Invasions* 18, 457–461. <https://doi.org/10.1007/s10530-015-1018-9>
- Patoka, J., Bláha, M., Kalous, L., Kouba, A., 2017. Irresponsible vendors: Non-native, invasive and threatened animals offered for garden pond stocking. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 27, 692–697. <https://doi.org/10.1002/aqc.2719>
- Patoka, J., Kalous, L., Kopecký, O., 2015. Imports of ornamental crayfish: the first decade from the Czech Republic's perspective. *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.* 04. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014040>
- Patoka, J., Kalous, L., Kopecký, O., 2014. Risk assessment of the crayfish pet trade based on data from the Czech Republic. *Biol Invasions* 16, 2489–2494. <https://doi.org/10.1007/s10530-014-0682-5>
- Patoka, J., Magalhães, A.L.B., Kouba, A., Faulkes, Z., Jerikho, R., Vitule, J.R.S., 2018. Invasive aquatic pets: failed policies increase risks of harmful invasions. *Biodivers Conserv* 27, 3037–3046. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1581-3>
- Peccoud, J., 2023. STRyper: an open source macOS application for microsatellite genotyping.
- Peiró, D., Almerão, M., Delaunay, C., Jussila, J., Makkonen, J., Bouchon, D., Araujo, P., Souty-Grosset, C., 2016. First detection of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in South America: a high potential risk to native crayfish. *Hydrobiologia* 781, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2841-4>
- Perry, W.L., Feder, J.L., Lodge, D.M., 2001. Implications of Hybridization between Introduced and Resident *Orconectes* Crayfishes. *Conservation Biology* 15, 1656–1666. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.00019.x>
- Peters, J.A., Cooper, M.J., Creque, S.M., Kornis, M.S., Maxted, J.T., Perry, W.L., Schueler, F.W., Simon, T.P., Taylor, C.A., Thoma, R.F., Uzarski, D.G., Lodge, D.M., 2014. Historical changes and current status of crayfish diversity and distribution in the Laurentian Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research* 40, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.01.003>
- Phelan, P., Bacon, J.P., Davies, J.A., Stebbings, L.A., Todman, M.G., Avery, L., Baines, R.A., Barnes, T.M., Ford, C., Hekimi, S., Lee, R., Shaw, J.E., Starich, T.A., Curtin, K.D., Sun, Y., Wyman, R.J., 1998. Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends*



- in genetics : TIG 14, 348. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(98\)01547-9](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(98)01547-9)
- Pintor, L.M., Sih, A., Bauer, M.L., 2008. Differences in aggression, activity and boldness between native and introduced populations of an invasive crayfish. *Oikos* 117, 1629–1636. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.16578.x>
- Pletz, M.W., Wollny, A., Dobermann, U.-H., Rödel, J., Neubauer, S., Stein, C., Brandt, C., Hartung, A., Mellmann, A., Trommer, S., Edel, B., Patchev, V., Makarewicz, O., Maschmann, J., 2018. A Nosocomial Foodborne Outbreak of a VIM Carbapenemase-Expressing *Citrobacter freundii*. *Clin Infect Dis* 67, 58–64. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy034>
- Poulin, R., Morand, S., 2000. The diversity of parasites. *Q Rev Biol* 75, 277–293. <https://doi.org/10.1086/393500>
- Préau, C., Nadeau, I., Sellier, Y., Isselin-Nondedeu, F., Bertrand, R., Collas, M., Capinha, C., Grandjean, F., 2020. Niche modelling to guide conservation actions in France for the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in relation to the invasive *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater Biology* 65, 304–315. <https://doi.org/10.1111/fwb.13422>
- Putra, M.D., Bláha, M., Wardiatno, Y., Krisanti, M., Yonvitner, Jerikho, R., Kamal, M.M., Mojžišová, M., Bystřický, P.K., Kouba, A., Kalous, L., Petrusek, A., Patoka, J., 2018. *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) and crayfish plague as new threats for biodiversity in Indonesia. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 28, 1434–1440. <https://doi.org/10.1002/aqc.2970>
- Raghavan, R., Dahanukar, N., Tlustý, M.F., Rhyne, A.L., Krishna Kumar, K., Molur, S., Rosser, A.M., 2013. Uncovering an obscure trade: Threatened freshwater fishes and the aquarium pet markets. *Biological Conservation* 164, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.04.019>
- Reid, S., Nocera, J., 2015. Composition of native crayfish assemblages in southern Ontario rivers affected by rusty crayfish (*Orconectes rusticus* Girard, 1852) invasions – implications for endangered queensnake recovery. *AI* 10, 189–198. <https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.2.07>
- Renault, D., Hess, M.C.M., Braschi, J., Cuthbert, R.N., Sperandii, M.G., Bazzichetto, M., Chabrierie, O., Thiébaud, G., Buisson, E., Grandjean, F., Bittebiere, A.-K., Mouchet, M., Massol, F., 2022. Advancing biological invasion hypothesis testing using functional diversity indices. *Science of The Total Environment* 834, 155102. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155102>
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., Melo, S., 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24, 417–428. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.5.417>
- Reynolds, J., Souty-Grosset, C., 2011. *Management of Freshwater Biodiversity: Crayfish as Bioindicators*. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139031790>
- Reynolds, J., Souty-Grosset, C., Richardson, A., 2013. Ecological Roles of Crayfish in Freshwater and Terrestrial Habitats. *Freshwater Crayfish* 19, 197–218.
- Rezinciuc, S., Galindo, J., Montserrat, J., Diéguez-Urbeondo, J., 2014. AFLP-PCR and RAPD-PCR evidences of the transmission of the pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) to wild populations of European crayfish from the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. *Fungal Biol* 118, 612–620. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.10.007>
- Robinson, C.V., Garcia de Leaniz, C., James, J., Cable, J., Orozco-terWengel, P., Consuegra, S., 2018. Genetic diversity and parasite facilitated establishment of the invasive signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in Great Britain. *Ecol Evol* 8, 9181–9191. <https://doi.org/10.1002/ece3.4235>



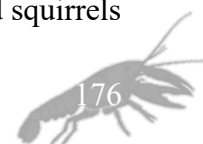
- Robinson, T.B., Peters, K., Brooker, B., 2020. Coastal Invasions: The South African Context, in: van Wilgen, B.W., Measey, J., Richardson, D.M., Wilson, J.R., Zengeya, T.A. (Eds.), *Biological Invasions in South Africa*. Springer International Publishing, Cham, pp. 229–247. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32394-3_9
- Ruppert, K.M., Kline, R.J., Rahman, M.S., 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Rusch, J.C., Mojžišová, M., Strand, D.A., Svobodová, J., Vrålstad, T., Petrusek, A., 2020. Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota* 58, 1–32. <https://doi.org/10.3897/neobiota.58.49358>
- Scheers, K., Boets, P., Abeel, T., Van den Neucker, T., 2020. First records of alien crayfish of the *Procambarus acutus* species complex in Belgium. *BioInvasions Records* 9, 562–569. <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.3.11>
- Schrimpf, A., 2014. Invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) transmits crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *AI* 9, 203–209. <https://doi.org/10.3391/ai.2014.9.2.09>
- Schrimpf, A., Maiwald, T., Vrålstad, T., Schulz, H.K., ŠMIETaNA, P., Schulz, R., 2013. Absence of the crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*) facilitates coexistence of European and American crayfish in central Europe. *Freshwater Biology* 58, 1116–1125. <https://doi.org/10.1111/fwb.12112>
- Schrimpf, A., Pârvulescu, L., Copilaș-Ciocianu, D., Petrusek, A., Schulz, R., 2012. Crayfish plague pathogen detected in the Danube Delta – a potential threat to freshwater biodiversity in southeastern Europe. *AI* 7, 503–510. <https://doi.org/10.3391/ai.2012.7.4.007>
- Seebens, H., Bacher, S., Blackburn, T.M., Capinha, C., Dawson, W., Dullinger, S., Genovesi, P., Hulme, P.E., van Kleunen, M., Kühn, I., Jeschke, J.M., Lenzner, B., Liebhold, A.M., Pattison, Z., Pergl, J., Pyšek, P., Winter, M., Essl, F., 2021. Projecting the continental accumulation of alien species through to 2050. *Global Change Biology* 27, 970–982. <https://doi.org/10.1111/gcb.15333>
- Settle, W.H., Wilson, L.T., 1990. Invasion by the Variegated Leafhopper and Biotic Interactions: Parasitism, Competition, and Apparent Competition. *Ecology* 71, 1461–1470. <https://doi.org/10.2307/1938283>
- Sieber, N., Hartikainen, H., Krieg, R., Zenker, A., Vorburger, C., 2022. Parasite DNA detection in water samples enhances crayfish plague monitoring in asymptomatic invasive populations. *Biol Invasions* 24, 281–297. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02644-y>
- Simberloff, D., Martin, J.-L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pyšek, P., Sousa, R., Tabacchi, E., Vilà, M., 2013. Impacts of Biological Invasions: What's What and the Way Forward. *Trends in ecology & evolution* 28, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.013>
- Simberloff, D., Rejmanek, M. (Eds.), 2019. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A Selection From The Global Invasive Species Database, in: *Encyclopedia of Biological Invasions*. University of California Press, pp. 715–716. <https://doi.org/10.1525/9780520948433-159>
- Söderhäll, I., Fasterius, E., Ekblom, C., Söderhäll, K., 2022. Characterization of hemocytes and hematopoietic cells of a freshwater crayfish based on single-cell transcriptome analysis. *iScience* 25, 104850. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104850>
- Söderhäll, I., Wu, C., Novotny, M., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2009. A Novel Protein Acts as a Negative Regulator of Prophenoloxidase Activation and Melanization in the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 6301–6310.



- <https://doi.org/10.1074/jbc.M806764200>
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 10, 23–28. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(98)80026-5)
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 3–23. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90053-Z](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90053-Z)
- Söderhäll, K., Smith, V.J., 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol* 7, 229–239. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(83\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0145-305x(83)90004-6)
- Solé, R., 2022. Revisiting Leigh Van Valen’s “A New Evolutionary Law” (1973). *Biol Theory* 17, 120–125. <https://doi.org/10.1007/s13752-021-00391-w>
- Souty-Grosset, 2006. Atlas of crayfish in Europe.
- Souty-Grosset, C., Anastácio, P.M., Aquiloni, L., Banha, F., Choquer, J., Chucholl, C., Tricarico, E., 2016. The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: Impacts on aquatic ecosystems and human well-being. *Limnologica* 58, 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2016.03.003>
- Souty-Grosset, C., Grandjean, F., Renault, D., 2015. Les invasions biologiques : potentiel invasif et plasticité des traits d’histoire de vie des espèces introduites. *Revue d’Écologie Sup* 12, 12–15.
- Souty-grosset, C., Holdich, D., Reynolds, J.D., n.d. Atlas of crayfish in Europe (2006).
- Souty-Grosset, C., Reynolds, J., Gherardi, F., Aquiloni, L., Coignet, A., Pinet, F., Mancha Cisneros, M.D.M., 2014. Burrowing activity of the invasive red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in fishponds of La Brenne (France). *Ethology Ecology & Evolution* 26, 263–276. <https://doi.org/10.1080/03949370.2014.892538>
- Sperschneider, J., Dodds, P.N., 2022. EffectorP 3.0: Prediction of Apoplasmic and Cytoplasmic Effectors in Fungi and Oomycetes. *Mol Plant Microbe Interact* 35, 146–156. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-21-0201-R>
- Stevenson, M., Sergeant, E., 2024. epiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data version 2.0.76 from CRAN [WWW Document]. URL <https://rdrr.io/cran/epiR/> (accessed 10.25.24).
- Strand, D.A., Jinnerot, T., Aspán, A., Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Rolén, E., Vrålstad, T., 2023. Molecular detection of *Aphanomyces astaci* – An improved species specific qPCR assay. *Journal of Invertebrate Pathology* 201, 108008. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108008>
- Strand, D.A., Jussila, J., Johnsen, S.I., Viljamaa-Dirks, S., Edsman, L., Wiik-Nielsen, J., Viljugrein, H., Engdahl, F., Vrålstad, T., 2014. Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology* 51, 544–553. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12218>
- Strauss, A., White, A., Boots, M., 2012. Invading with biological weapons: the importance of disease-mediated invasions. *Functional Ecology* 26, 1249–1261. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12011>
- Strayer, D.L., 2010b. Alien species in fresh waters: ecological effects, interactions with other stressors, and prospects for the future. *Freshwater Biology* 55, 152–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02380.x>
- Strayer, D.L., 2009. Twenty years of zebra mussels: lessons from the mollusk that made headlines. *Frontiers in Ecology and the Environment* 7, 135–141. <https://doi.org/10.1890/080020>
- Strayer, D.L., Dudgeon, D., 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *jnbs* 29, 344–358. <https://doi.org/10.1899/08-171.1>
- Sudheer, N.S., Poulouse, G., Thomas, A., Viswanath, K., Kulkarni, A., Narayanan, R.B., Philip,



- R., Singh, I.S.B., 2015. Expression profile of bio-defense genes in *Penaeus monodon* gills in response to formalin inactivated white spot syndrome virus vaccine. *Antiviral Research* 117, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.02.008>
- Sures, B., Nachev, M., 2022a. Effects of multiple stressors in fish: how parasites and contaminants interact. *Parasitology* 149, 1822. <https://doi.org/10.1017/S0031182022001172>
- Sures, B., Nachev, M., 2022b. Effects of multiple stressors in fish: how parasites and contaminants interact. *Parasitology* 149, 1822–1828. <https://doi.org/10.1017/S0031182022001172>
- Svoboda, J., Fischer, D., Kozubíková-Balcarová, E., Šťásková, A., Brůčková, M., Kouba, A., Petrusek, A., 2020. Experimental evaluation of the potential for crayfish plague transmission through the digestive system of warm-blooded predators. *J Fish Dis* 43, 129–138. <https://doi.org/10.1111/jfd.13109>
- Svoboda, J., Kozubíková, E., Kozák, P., Kouba, A., Bahadır Koca, S., Diler, O., Diler, I., Policar, T., Petrusek, A., 2012. PCR detection of the crayfish plague pathogen in narrow-clawed crayfish inhabiting Lake Eğirdir in Turkey. *Dis Aquat Organ* 98, 255–259. <https://doi.org/10.3354/dao02445>
- Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Kouba, A., Diéguez-Urbeondo, J., Petrusek, A., 2014. Resistance to the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, in two freshwater shrimps. *Journal of Invertebrate Pathology* 121, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.07.004>
- Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Petrusek, A., 2017. Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *Journal of Fish Diseases* 40, 127–140. <https://doi.org/10.1111/jfd.12472>
- Svoboda, Jiří, Strand, D.A., Vrålstad, T., Grandjean, F., Edsman, L., Kozák, P., Kouba, A., Fristad, R.F., Bahadır Koca, S., Petrusek, A., 2014. The crayfish plague pathogen can infect freshwater-inhabiting crabs. *Freshw Biol* 59, 918–929. <https://doi.org/10.1111/fwb.12315>
- Taylor, C.A., Redmer, M., 1996. Dispersal of the Crayfish *Orconectes Rusticus* in Illinois, with Notes on Species Displacement and Habitat Preference. *Journal of Crustacean Biology* 16, 547–551. <https://doi.org/10.1163/193724096X00577>
- Teurlinx, S., Kuiper, J.J., Hoevenaar, E.C., Lurling, M., Brederveld, R.J., Veraart, A.J., Janssen, A.B., Mooij, W.M., de Senerpont Domis, L.N., 2019. Towards restoring urban waters: understanding the main pressures. *Current Opinion in Environmental Sustainability, Environmental Change Assessment* 36, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2018.10.011>
- Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Gopinath, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., Thomas, J., 2015. In vivo and in vitro antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Lin) against *Citrobacter freundii* isolated from naturally infected Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture* 437, 252–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.008>
- Thomas, J.R., Robinson, C.V., Mrugała, A., Ellison, A.R., Matthews, E., Griffiths, S.W., Consuegra, S., Cable, J., 2020. Crayfish plague affects juvenile survival and adult behaviour of invasive signal crayfish. *Parasitology* 147, 706–714. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000165>
- Tilmans, M., Mrugała, A., Svoboda, J., Engelsma, M.Y., Petie, M., Soes, D.M., Nutbeam-Tuffs, S., Oidtmann, B., Roessink, I., Petrusek, A., 2014. Survey of the crayfish plague pathogen presence in the Netherlands reveals a new *Aphanomyces astaci* carrier. *Journal of Invertebrate Pathology* 120, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.06.002>
- Tompkins, D.M., White, A.R., Boots, M., 2003. Ecological replacement of native red squirrels



- by invasive greys driven by disease. *Ecology Letters* 6, 189–196. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00417.x>
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D., Dobson, A.P., McKenzie, V.J., Kuris, A.M., 2003. Introduced species and their missing parasites. *Nature* 421, 628–630. <https://doi.org/10.1038/nature01346>
- Tricarico, E., Vilizzi, L., Gherardi, F., Copp, G., 2010. Calibration of FI-ISK, an invasiveness screening tool for nonnative freshwater invertebrates. *Risk analysis: an official publication of the Society for Risk Analysis* 30. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2009.01255.x>
- Trouilhé, M.-C., Souty-Grosset, C., Grandjean, F., Parinet, B., 2007. Physical and chemical water requirements of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in western France. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 17, 520–538. <https://doi.org/10.1002/aqc.793>
- Twardochleb, L.A., Olden, J.D., Larson, E.R., 2013. A global meta-analysis of the ecological impacts of nonnative crayfish. *Freshwater Science* 32, 1367–1382. <https://doi.org/10.1899/12-203.1>
- Unestam, T., 1966. Studies on the Crayfish Plague Fungus *Aphanomyces astaci*. *Physiologia Plantarum* 19, 1110–1119. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1966.tb07104.x>
- Unestam, T., Weiss, D.W., 1970. The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *J Gen Microbiol* 60, 77–90. <https://doi.org/10.1099/00221287-60-1-77>
- Ungureanu, E., Mojžišová, M., Tangerman, M., Ion, M.C., Pârvulescu, L., Petrusek, A., 2020. The spatial distribution of *Aphanomyces astaci* genotypes across Europe: introducing the first data from Ukraine. *Freshwater Crayfish* 25, 77–87. <https://doi.org/10.5869/fc.2020.v25-1.077>
- van Ham, C., Genovesi, P., Scalera, R., n.d. Invasive alien species: the urban dimension.
- van Kuijk, T., Biesmeijer, J.C., van der Hoorn, B.B., Verdonchot, P.F.M., 2021. Functional traits explain crayfish invasive success in the Netherlands. *Sci Rep* 11, 2772. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82302-4>
- Van Valen, L., 1977. The Red Queen. *The American Naturalist* 111, 809–810. <https://doi.org/10.1086/283213>
- Van Valen, L., 1973. A New Evolutionary Law. *A New Evolutionary Law*.
- Veselý, L., Buřič, M., Kouba, A., 2015. Hardy exotics species in temperate zone: can “warm water” crayfish invaders establish regardless of low temperatures? *Sci Rep* 5, 16340. <https://doi.org/10.1038/srep16340>
- Vigneron, T., 2019. Premier signalement de *Cherax destructor* en milieu naturel en France (Bretagne). CDR-EEE. URL <https://especes-exotiques-envahissantes.fr/premier-signalement-de-cherax-destructor-en-milieu-naturel-en-france-bretagne/> (accessed 7.23.24).
- Vilizzi, L., Copp, G.H., Hill, J.E., Adamovich, B., Aislabie, L., Akin, D., Al-Faisal, A.J., Almeida, D., Azmai, M.N.A., Bakiu, R., Bellati, A., Bernier, R., Bies, J.M., Bilge, G., Branco, P., Bui, T.D., Canning-Clode, J., Cardoso Ramos, H.A., Castellanos-Galindo, G.A., Castro, N., Chaichana, R., Chainho, P., Chan, J., Cunico, A.M., Curd, A., Dangchana, P., Dashinov, D., Davison, P.I., de Camargo, M.P., Dodd, J.A., Durland Donahou, A.L., Edsman, L., Ekmekçi, F.G., Elphinstone-Davis, J., Erős, T., Evangelista, C., Fenwick, G., Ferincz, Á., Ferreira, T., Feunteun, E., Filiz, H., Forneck, S.C., Gajduchenko, H.S., Gama Monteiro, J., Gestoso, I., Giannetto, D., Gilles, A.S., Gizzi, F., Glamuzina, B., Glamuzina, L., Goldsmit, J., Gollasch, S., Goulletquer, P., Grabowska, J., Harmer, R., Haubrock, P.J., He, D., Hean, J.W., Herczeg, G., Howland,



- K.L., İlhan, A., Interesova, E., Jakubčinová, K., Jelmert, A., Johnsen, S.I., Kakareko, T., Kanongdate, K., Killi, N., Kim, J.-E., Kirankaya, Ş.G., Kňazovická, D., Kopecký, O., Kostov, V., Koutsikos, N., Kozic, S., Kuljanishvili, T., Kumar, B., Kumar, L., Kurita, Y., Kurtul, I., Lazzaro, L., Lee, L., Lehtiniemi, M., Leonardi, G., Leuven, R.S.E.W., Li, S., Lipinskaya, T., Liu, F., Lloyd, L., Lorenzoni, M., Luna, S.A., Lyons, T.J., Magellan, K., Malmstrøm, M., Marchini, A., Marr, S.M., Masson, G., Masson, L., McKenzie, C.H., Memedemin, D., Mendoza, R., Minchin, D., Miossec, L., Moghaddas, S.D., Moshobane, M.C., Mumladze, L., Naddafi, R., Najafi-Majd, E., Năstase, A., Năvodaru, I., Neal, J.W., Nienhuis, S., Nintim, M., Nolan, E.T., Occhipinti-Ambrogi, A., Ojaveer, H., Olenin, S., Olsson, K., Onikura, N., O'Shaughnessy, K., Paganelli, D., Parretti, P., Patoka, J., Pavia, R.T.B., Pellitteri-Rosa, D., Pelletier-Rousseau, M., Peralta, E.M., Perdikaris, C., Pietraszewski, D., Piria, M., Pitois, S., Pompei, L., Poulet, N., Preda, C., Puntila-Dodd, R., Qashqaei, A.T., Radočaj, T., Rahmani, H., Raj, S., Reeves, D., Ristovska, M., Rizevsky, V., Robertson, D.R., Robertson, P., Ruykys, L., Saba, A.O., Santos, J.M., Sarı, H.M., Segurado, P., Semenchenko, V., Senanan, W., Simard, N., Simonović, P., Skóra, M.E., Slovák Švolíková, K., Smeti, E., Šmídová, T., Špelić, I., Srèbalienė, G., Stasolla, G., Stebbing, P., Števo, B., Suresh, V.R., Szajbert, B., Ta, K.A.T., Tarkan, A.S., Tempesti, J., Therriault, T.W., Tidbury, H.J., Top-Karakuş, N., Tricarico, E., Troca, D.F.A., Tsiamis, K., Tuckett, Q.M., Tutman, P., Uyan, U., Uzunova, E., Vardakas, L., Velle, G., Verreycken, H., Vintsek, L., Wei, H., Weiperth, A., Weyl, O.L.F., Winter, E.R., Włodarczyk, R., Wood, L.E., Yang, R., Yapıcı, S., Yeo, S.S.B., Yoğurtçuoğlu, B., Yunnice, A.L.E., Zhu, Y., Zięba, G., Žitňanová, K., Clarke, S., 2021. A global-scale screening of non-native aquatic organisms to identify potentially invasive species under current and future climate conditions. *Science of The Total Environment* 788, 147868. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147868>
- Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., 2019. A tentative new species *Aphanomyces fennicus* sp. nov. interferes with molecular diagnostic methods for crayfish plague. *J Fish Dis* 42, 413–422. <https://doi.org/10.1111/jfd.12955>
- Vogt, G., Dorn, N.J., Pfeiffer, M., Lukhaup, C., Williams, B.W., Schulz, R., Schrimpf, A., 2019. The dimension of biological change caused by autotriploidy: A meta-analysis with triploid crayfish *Procambarus virginalis* and its diploid parent *Procambarus fallax*. *Zoologischer Anzeiger* 281, 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2019.06.006>
- Vorburger, C., Ribí, G., 1999. Aggression and competition for shelter between a native and an introduced crayfish in Europe. *Freshwater Biology* 42, 111–119. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1999.00465.x>
- Vrålstad, T., Johnsen, S., Fristad, R., Edsman, L., Strand, D., 2011. Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Dis. Aquat. Org.* 97, 75–83. <https://doi.org/10.3354/dao02386>
- Vrålstad, T., Knutsen, A.K., Tengs, T., Holst-Jensen, A., 2009. A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 137, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.022>
- Weiperth, A., Bláha, M., Szajbert, B., Seprős, R., Bányai, Z., Patoka, J., Kouba, A., 2020. Hungary: a European hotspot of non-native crayfish biodiversity. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 43. <https://doi.org/10.1051/kmae/2020035>
- Weiperth, A., Gál, B., Kuříková, P., Langrová, I., Kouba, A., Patoka, J., 2019. Risk assessment of pet-traded decapod crustaceans in Hungary with evidence of *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) in the wild. *North-Western Journal of Zoology* 15, e171303.
- Wetzel, J.E., Poly, W.J., Fetzner, J.W., 2004. Morphological and Genetic Comparisons of



- Golden Crayfish, *Orconectes Luteus*, and Rusty Crayfish, *O. Rusticus*, with Range Corrections in Iowa and Minnesota. *Journal of Crustacean Biology* 24, 603–617. <https://doi.org/10.1651/C-2483>
- Wilson, K.A., Magnuson, J.J., Lodge, D.M., Hill, A.M., Kratz, T.K., Perry, W.L., Willis, T.V., 2004. A long-term rusty crayfish (*Orconectes rusticus*) invasion: dispersal patterns and community change in a north temperate lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61, 2255–2266. <https://doi.org/10.1139/f04-170>
- WWF, 2020. WWF (2020) Living Planet Report 2020 - Bending the curve of biodiversity loss. Almond, R.E.A., Grooten M. and Petersen, T. (Eds). WWF, Gland, Switzerland.
- Zhao, M., Lei, C., Zhou, K., Huang, Y., Fu, C., Yang, S., Zhang, Z., n.d. POOE: predicting oomycete effectors based on a pre-trained large protein language model. *mSystems* 9, e01004-23. <https://doi.org/10.1128/msystems.01004-23>

Annexe 1 : Appendixes supplémentaires de l'article "Prevalence of the crayfish plague pathogen in red swamp crayfish populations in western France: How serious is the risk for the native white-clawed crayfish?" publié dans « Journal of Invertebrate Pathology » en 2024, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108128>.

Supplementary Table S1. Comparison of *Aphanomyces astaci* detection in *Procambarus clarkii* populations using two different qPCR assays, a long-established assay developed by Vrålstad et al. (2009) and the most recently published one by Strand et al. (2023). Abbreviations of locality types: Abbreviations: B: brook, L: lake, P: pond, C: channel.

	Original assay (Vrålstad et al., 2009)			New assay (Strand et al., 2023)		
Locality [waterbody type]	No. infected / analysed	% infected	Agent level (No.)	No. infected / analysed	% infected	Agent level (No.)
Etang de Lacanau [L]	3/8	37.5%	A1(5), A2(3)	3/8	37.5%	A0(1), A1(4), A2(3)
La Barbanne [B]	0/3	0%	A0(1), A1(2)	1/3	33%	A0(2), A2(1)
Ayguemor [B]	11/11	100%	A2(2), A3(8), A4(1)	10/11	91%	A1(1), A2(4), A3(6)
Hiou [B]	11/11	100%	A2(8), A3(3)	11/11	100%	A2(3), A3(8)
Ruisseau du Bois Noir [B]	7/8	87.5%	A1(1), A2(3), A3(4)	7/8	87.5%	A0(1), A2(3), A3(4)
Le Ségur [B]	1/7	14.3%	A0(2), A1(4), A2(1)	2/7	29%	A0(3), A1(2), A2(2)
Chenal du Gaet [C]	2/9	22.2%	A0(1), A1(6), A2(2)	5/9	55.6%	A0(2), A1(2), A2(4), A3(1)
Saint-Germain [B]	3/3	100%	A4(1), A5(2)	3/3	100%	A4(2), A5(1)

ANNEXE 2 : Récapitulatif des avantages et des limites des 5 méthodes permettant de caractériser la diversité génétique chez le pathogène *A. astaci* et d'identifier les groupe génétique responsable de mortalités de masse dans les populations autochtones.

Méthode	Culture pure	Echantillons mixte	ADN amplifié	Diversité génétique	Avantage	Limites	Références
RAPD	Oui	Non	nucléaire	RAPD-A, RAPD-B, RAPD-C, RAPD-D, RAPD-E	Première méthode ayant permis de décrire différents génotypes de <i>A. astaci</i>	Peu répliquable entre deux expérience	(Huang et al., 1994; Kozubíková, Viljamaa-Dirks, et al., 2011; Lilley et al., 1997; Söderhäll and Diéguez-Urbeond, 1999)
Microsatellites	Oui	Oui	nucléaire	SSR-A1, SSR-A2, SSR-B, SSR-C, SSR-D, SSR-E, SSR-UP	Très variable	L'interprétation des résultats est parfois complexe Amplification croisée avec d'autres espèces d'oomycètes	(Grandjean et al., 2014)
Séquençage Chitinase	Oui	Oui	nucléaire	-	Variabilité	Ne permet pas de discriminer les groupes RAPD-B et RAPD-E	(Makkonen et al., 2012)
Séquençage ADNmt	Oui	Oui	Mitochondrial	Europe : haplotype a, b, d1, d2, d3 et e Etats Unis : haplotypes Usa 1, 2, 3, 4, 5, 6	Variabilité particulièrement pour le groupe D Description d'haplotypes au Etats-unis	Ne permet pas de discriminer les groupes SSR-C et SSR-UP	(Makkonen et al., 2016, 2018; Martínez-Ríos et al., 2023; Martín-Torrijos, Martínez-Ríos, et al., 2021)
QPCR génotypage	Oui	Oui	nucléaire	A, B, C, D, E	Rapidité d'analyse Plus sensible que les autres méthodes	Peu de variabilité	(Di Domenico et al., 2021; Minardi et al., 2018)

Annexe 3 : Résultats des test ANNOVA et des tests post hoc HSD de Tukey.

	DF	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
G_INX	5	22.40	4.480	5.6750	0.000742 ***
G_CEPB	5	7.018	1.4036	4.465	0.00337 **
G_E3U	5	1.951	0.3903	0.606	0.696
G_PPO	5	9.277	1.8555	2.736	0.0362 *
G_HSP	5	4.22	0.8439	1.37	0.262
G_CRU	5	17.65	3.529	2.604	0.0438 *
HPT_INX	5	12.95	2.590	1.397	0.254
HPT_CEPB	5	21.77	4.355	6.489	0.000337 ***
HPT_E3U	5	5.05	1.010	0.614	0.69
HPT_PPO	5	6.16	1.231	1.139	0.362
HPT_HSP	5	4.828	0.9657	1.249	0.311
HPT_CRU	5	6.94	1.387	0.475	0.792
M_INX	5	7.64	1.528	1.381	0.259
M_CEPB	5	8.269	1.6538	4.393	0.00404 **
M_E3U	5	1.322	0.2645	0.881	0.506
M_PPO	5	2.613	0.5227	0.513	0.764
M_HSP	5	2.155	0.4310	2.36	0.064
M_CRU	5	10.86	2.173	2.077	0.0961

TukeyHSD(anova_G_INX)

```
##      diff      lwr      upr    p adj
## PBS-CTRL -1.36665519 -2.8201315 0.08682115 0.0750568
## T12-CTRL 0.90609740 -0.6477342 2.45992896 0.5004958
## T24-CTRL -0.16828073 -1.7221123 1.38555083 0.9994441
## T48-CTRL -0.22681316 -1.7806447 1.32701840 0.9976606
## T96-CTRL -1.13406580 -2.6878974 0.41976576 0.2608753
## T12-PBS 2.27275259 0.8192762 3.72622893 0.0005642
## T24-PBS 1.19837446 -0.2551019 2.65185080 0.1549970
## T48-PBS 1.13984203 -0.3136343 2.59331837 0.1951203
## T96-PBS 0.23258939 -1.2208870 1.68606573 0.9963862
## T24-T12 -1.07437813 -2.6282097 0.47945344 0.3154804
## T48-T12 -1.13291056 -2.6867421 0.42092101 0.2618688
## T96-T12 -2.04016320 -3.5939948 -0.48633164 0.0046054
## T48-T24 -0.05853243 -1.6123640 1.49529914 0.9999970
## T96-T24 -0.96578507 -2.5196166 0.58804649 0.4305441
## T96-T48 -0.90725264 -2.4610842 0.64657892 0.4991107
```

TukeyHSD(anova_G_CEPB)

```
##      diff      lwr      upr    p adj
## PBS-CTRL -0.9471086 -1.86430397 -0.02991324 0.0397345
## T12-CTRL 0.3897027 -0.59082034 1.37022584 0.8316962
## T24-CTRL -0.2341297 -1.21465280 0.74639337 0.9776039
## T48-CTRL -0.0739357 -1.05445879 0.90658739 0.9999058
## T96-CTRL -0.3870072 -1.36753026 0.59351591 0.8356606
## T12-PBS 1.3368114 0.41961599 2.25400672 0.0013903
```



```
## T24-PBS 0.7129789 -0.20421647 1.63017426 0.2026837
## T48-PBS 0.8731729 -0.04402246 1.79036827 0.0694087
## T96-PBS 0.5601014 -0.35709393 1.47729679 0.4499853
## T24-T12 -0.6238325 -1.60435555 0.35669063 0.4049026
## T48-T12 -0.4636384 -1.44416154 0.51688464 0.7076446
## T96-T12 -0.7767099 -1.75723301 0.20381316 0.1866652
## T48-T24 0.1601940 -0.82032907 1.14071710 0.9960161
## T96-T24 -0.1528775 -1.13340055 0.82764563 0.9968032
## T96-T48 -0.3130715 -1.29359456 0.66745161 0.9249224
```

TukeyHSD(anova_G_PPO)

```
## diff lwr upr p adj
## PBS-CTRL -0.396056597 -1.7431879 0.9510747 0.9460234
## T12-CTRL 1.084390256 -0.3557537 2.5245342 0.2312493
## T24-CTRL -0.214105462 -1.6542494 1.2260385 0.9974478
## T48-CTRL -0.221807098 -1.6619511 1.2183369 0.9969828
## T96-CTRL -0.263395929 -1.7035399 1.1767481 0.9932604
## T12-PBS 1.480446853 0.1333155 2.8275782 0.0245103
## T24-PBS 0.181951135 -1.1651802 1.5290825 0.9983849
## T48-PBS 0.174249500 -1.1728818 1.5213808 0.9986876
## T96-PBS 0.132660669 -1.2144707 1.4797920 0.9996503
## T24-T12 -1.298495718 -2.7386397 0.1416483 0.0965312
## T48-T12 -1.306197354 -2.7463413 0.1339466 0.0932772
## T96-T12 -1.347786184 -2.7879302 0.0923578 0.0772734
## T48-T24 -0.007701635 -1.4478456 1.4324424 1.0000000
## T96-T24 -0.049290466 -1.4894345 1.3908535 0.9999981
## T96-T48 -0.041588831 -1.4817328 1.3985552 0.9999992
```

TukeyHSD(anova_G_CRU)

```
## diff lwr upr p adj
## PBS-CTRL -1.0840052 -2.9884932 0.8204828 0.5266555
## T12-CTRL 1.0508881 -0.9850952 3.0868715 0.6273297
## T24-CTRL 0.3873923 -1.6485911 2.4233756 0.9919143
## T48-CTRL -0.2114099 -2.2473932 1.8245734 0.9995471
## T96-CTRL 0.2753335 -1.7606498 2.3113168 0.9983753
## T12-PBS 2.1348933 0.2304053 4.0393813 0.0207913
## T24-PBS 1.4713974 -0.4330906 3.3758854 0.2080398
## T48-PBS 0.8725953 -1.0318927 2.7770833 0.7337293
## T96-PBS 1.3593386 -0.5451494 3.2638266 0.2829473
## T24-T12 -0.6634959 -2.6994792 1.3724874 0.9186870
## T48-T12 -1.2622980 -3.2982813 0.7736853 0.4333034
## T96-T12 -0.7755547 -2.8115380 1.2604286 0.8548118
## T48-T24 -0.5988021 -2.6347855 1.4371812 0.9459415
## T96-T24 -0.1120588 -2.1480421 1.9239245 0.9999802
## T96-T48 0.4867434 -1.5492400 2.5227267 0.9774849
```

TukeyHSD(anova_HPT_CEPB)

```
## diff lwr upr p adj
## PBS-CTRL 0.09511520 -1.3435218 1.5337522 0.9999494
## T12-CTRL 1.86264051 0.4240035 3.3012775 0.0055009
## T24-CTRL 1.91809228 0.4794553 3.3567293 0.0040424
## T48-CTRL 1.26807426 -0.1705627 2.7067113 0.1090673
## T96-CTRL 0.59687674 -0.8417603 2.0355137 0.8026757
## T12-PBS 1.76752531 0.3288883 3.2061623 0.0092533
## T24-PBS 1.82297708 0.3843401 3.2616141 0.0068424
## T48-PBS 1.17295906 -0.2656779 2.6115961 0.1622731
## T96-PBS 0.50176154 -0.9368755 1.9403985 0.8928031
## T24-T12 0.05545177 -1.3831852 1.4940888 0.9999965
## T48-T12 -0.59456625 -2.0332033 0.8440708 0.8051810
## T96-T12 -1.26576377 -2.7044008 0.1728732 0.1101630
## T48-T24 -0.65001802 -2.0886550 0.7886190 0.7415150
```

```
## T96-T24 -1.32121554 -2.7598525 0.1174215 0.0862814
## T96-T48 -0.67119752 -2.1098345 0.7674395 0.7155277
```

TukeyHSD(anova_M_CEPB)

```
##      diff      lwr      upr    p adj
## PBS-CTRL 0.57492708 -0.5025088 1.6523630 0.5904646
## T12-CTRL 1.42172188 0.3442860 2.4991578 0.0045129
## T24-CTRL 0.50214662 -0.5752893 1.5795825 0.7164119
## T48-CTRL 0.14556091 -0.9318750 1.2229968 0.9983406
## T96-CTRL 0.10243175 -0.9750042 1.1798677 0.9996976
## T12-PBS 0.84679481 -0.2306411 1.9242307 0.1917098
## T24-PBS -0.07278045 -1.1502164 1.0046555 0.9999438
## T48-PBS -0.42936617 -1.5068021 0.6480697 0.8275516
## T96-PBS -0.47249533 -1.5499312 0.6049406 0.7642519
## T24-T12 -0.91957526 -1.9970112 0.1578607 0.1294874
## T48-T12 -1.27616098 -2.3535969 -0.1987251 0.0130089
## T96-T12 -1.31929013 -2.3967260 -0.2418542 0.0095558
## T48-T24 -0.35658572 -1.4340216 0.7208502 0.9120824
## T96-T24 -0.39971487 -1.4771508 0.6777210 0.8656775
## T96-T48 -0.04312916 -1.1205651 1.0343068 0.9999958
```

Annexe 4 : Conservation et suivie des populations de l'écrevisses à pattes blanches par une méthode non-invasive.

Influence of distance from source population and seasonality in eDNA detection of white-clawed crayfish, through qPCR and ddPCR assays

Thomas Baudry¹ | Maud Laffitte¹ | Charlotte Noizat¹ | Carine Delaunay¹ | Grégoire Ricou² | Valentin Vasselon³ | Frédéric Grandjean¹

¹Université de Poitiers, Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, Poitiers Cedex, France

²FDAAPPMA37, Tours, France

³SCIMABIO-Interface, Thonon-les-Bains, France

Correspondence

Thomas Baudry and Frédéric Grandjean, Université de Poitiers, Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, 3 rue Jacques Fort, Poitiers Cedex, France.
Email: thmsbaudry@gmail.com and frederic.grandjean@univ-poitiers.fr

Funding information

Fédération de Pêche et de Protection du Milieu Aquatique d'Indre et Loire (Fdaappma37)

Abstract

The white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) is an emblematic taxon of European rivers, found mainly in oxygenated streams, known to be an excellent indicator of river quality. Since several decades, the population of *A. pallipes* declined in relation to anthropogenic pressure, habitat loss, and competition with pests (invasive crayfish, crayfish plague). This endangered species is now submitted to conservation strategies by freshwater managers in order to survey and protect the remaining populations. In France, traditional surveys in freshwater environments were performed by electric fishing, kick-net fishing, or trapping, particularly disruptive for the environment and very time-consuming. However, with the rise of molecular genetic technology, new methods based on the detection of environmental DNA (eDNA) have emerged. We present here the results of an optimized study for the detection of the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in France, considering certain environmental co-factors and comparing two PCR methods (qPCR and ddPCR). After improving laboratory procedures, we were able to detect the presence of the crayfish up to 2 km downstream from a known point of presence and unfortunately highlight the disappearance of a historical population, after sampling two consecutive years. Such a level of precision is interesting because it makes it possible to precise the presence of specimens in a relatively restricted area and to orient traditional prospecting, necessary for certain additional studies. During our study, we observed better probabilities of detection during the summer period, but in a growing context of climate change, we advise to adapt the sampling year by year. That said, this methodology is a very useful tool for the detection of rare and/or endemic species and we did not observe any difference between the two PCR methods used.

KEYWORDS

Austropotamobius pallipes, conservation, crayfish, downstream detection, droplet digital PCR, environmental DNA, quantitative PCR, seasonality

Thomas Baudry and Maud Laffitte are co-first authors.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2023 The Authors. *Environmental DNA* published by John Wiley & Sons Ltd.



1 | INTRODUCTION

Biological inventories of macro-organisms in aquatic environments were initially based on traditional methods like direct capture, electrofishing, or baited traps, known to be particularly disruptive for the environment, non-selective, and time-consuming (Hänfling et al., 2016; Robinson et al., 2018; Wang et al., 2021). The development of molecular genetic methods has made it possible to apply novel strategies for aquatic biodiversity assessment using environmental DNA (eDNA; Bruce et al., 2021; Ruppert et al., 2019). As all the living organisms, from bacteria to vertebrates, shed genetic material into their surrounding environment via natural biological processes (e.g., mucus secretion, feces excretion, cells release), the application of molecular approaches to eDNA extracted from environmental samples opens a new way to study biodiversity (Barnes & Turner, 2015). The increasing use of eDNA-based approaches is such that it can be considered as a disciplinary field, and studies have been done to investigate the "ecology of eDNA" and to fully understand its potential and limitations for biodiversity assessment.

In freshwater ecosystems, the first species-specific eDNA-based approach was developed by Ficetola et al. (2008), proving its effectiveness to detect an invasive frog (*Rana catesbeiana*) in France. Since a large number of studies and methodological development were conducted to improve eDNA-based applications (Schenekar, 2022), in particular as an aquatic conservation tool to monitor taxa of interest (e.g., invasive, rare, threatened taxa), using eDNA collected from river water samples (e.g., Atkinson et al., 2019; Dubreuil et al., 2021; Harper et al., 2018; Piggott, 2016). However, detection and interpretation of eDNA signals from water samples in rivers can be challenging due to natural dilution, degradation (environmental factors, biological processes), and transport conditions (Barnes & Turner, 2015). To overcome those potential biases, optimization of water sampling strategies (e.g., point sampling vs. integrated sampling), field samples preservation (e.g., dry, in ethanol, on ice, in buffer, etc.), eDNA isolation (e.g., filtration vs. centrifugation) and extraction (e.g., Phenol-Chloroform vs. commercial kits) were evaluated in previous studies (e.g. Deiner et al., 2015; Djurhuus et al., 2017; Goldberg et al., 2011; Majaneva et al., 2018). There is no clear agreement of what the best strategy is, but it appears from the literature that: (i) water filtration implemented directly onsite, from an integrated sampling, seemed to provide higher yields (Deiner et al., 2015; Troth et al., 2020), (ii) filtration of large volumes of water (up to several tens of liters) allows to capture a larger number of eDNA fragments (Goldberg et al., 2016; Majaneva et al., 2018), and (iii) preservation onsite reduces its potential degradation (Carraro et al., 2021), (iv) better eDNA extraction yields (from filters) seem to be obtained with commercial DNA extraction kits (e.g. Qiagen DNeasy blood and tissue; Deiner et al., 2015; Djurhuus et al., 2017). Concerning the samples analyses, several studies have recently compared the sensitivity of two Polymerase Chain Reaction (PCR) methods, digital droplet PCR (ddPCR) and quantitative PCR (qPCR), each with their own merits (Doi et al., 2015; Mauvisseau et al., 2019). The former is known to be more sensitive (in case of low abundant

signal, or potential inhibition effect), but has higher costs and longer experimental time (Doi et al., 2015). While the latter is less accurate for eDNA quantification, but it is simple to apply, often less expensive (depending on the working context), and generates rapid results (Mauvisseau et al., 2019).

If methodological aspects of eDNA-based approaches have intensively been explored, the success of eDNA applications is also dependent on the ecology and population biology of the targeted species. Seasonal variation in activity, abundance, habitat patchiness, influencing the population-level excretion of DNA (Dunn et al., 2017; Troth et al., 2021) and the distance of water sampling points from the major source population (Deiner & Altermatt, 2014; Jane et al., 2015) will influence recoverable eDNA. In temperate zones, strong seasonal variations in temperatures and therefore metabolic rate and activity of aquatic species can be observed, influencing the eDNA detection success (Dunn et al., 2017; Troth et al., 2021). For example, eDNA concentration peaks (20 times higher) are observed during reproduction and spawning in pearl mussels (Wacker et al., 2019). A similar observation was made in crayfish (*Austropotamobius pallipes* and *Pacifastacus leniusculus*) during the spawning and molting periods (Dunn et al., 2017; Troth et al., 2021). As a consequence, an unadapted eDNA sampling strategy could lead to false negative results of the target species depending on the season, affecting both river hydrology and species activity or in sub-optimal habitats, which is particularly the case with taxa harboring complex annual life cycle like the white-clawed crayfish, *A. pallipes* (King et al., 2022).

White-clawed crayfish represents a model species because it is a large aquatic species inhabiting small creeks and streams and is of ecological, conservation importance and interest in Europe (Grandjean et al., 2000; Kouba et al., 2014; Préau et al., 2020). Its strict ecological requirements for pristine aquatic environments make it a valuable bioindicator species (Trouilhé et al., 2007), with its presence indicating a high-quality aquatic environment. However, it is also highly threatened in Europe with a small fragmented and generally declining population that can be challenging to detect and monitor (Füreder et al., 2010). The number of white-clawed crayfish has fallen significantly, with losses estimated between 50% and 80% since the 2000s across Europe (Collas et al., 2016; Füreder et al., 2010), due to the combined effects of habitat loss, decrease in water quality, but also competition with introduced American crayfish species (*Faxonius limosus*, *P. leniusculus*, *Procambarus clarkii*), carriers of the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* (Becking et al., 2021; Grandjean et al., 2017). This leads to an increasingly diminished presence in France, with low *A. pallipes* population densities at known sites, difficult, and time-consuming to detect using traditional sampling approaches, explaining why eDNA-based approaches are developed to complement traditional surveys and improve conservation strategies.

In this study, we investigated the effect of (i) seasonality; (ii) environmental variables (temperature and oxygen); (iii) the sampling distance from a source population on the detection efficiency of eDNA methods for *A. pallipes*. Two molecular methods commonly applied for eDNA species-specific surveys were used (qPCR and ddPCR)

and compared in terms of eDNA detection efficiency. Investigations were performed in 10 streams on site where known white-crayfish populations were described by direct observations and/or trapping. Our results will contribute to scientific knowledge regarding eDNA species-specific signal interpretation in rivers. We will also discuss about the pertinence of eDNA-based approach for conservation purpose in rivers and its operationality in the particular context of the white-clawed crayfish.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sampling sites and water sampling

This study took place in Indre et Loire, a department located in central France and crossed by the Loire River and its many tributaries (Figure 1). Traditional night crayfish surveys were carried out by local authorities (Fédération de Pêche de l'Indre et Loire) during the summer of 2021 to confirm the historical presence of *A. pallipes* at different river stations of the department using trapping and spotlighting (direct observation) (Bryant et al., 2012). According to their results, nine brooks (plus one in 2022) distributed in different water basins of the department and with an identified population of *A. pallipes* were selected for our study (see above "Section 2.2. Seasonal and spatial eDNA sampling strategies").

Water samples used to perform eDNA-based approaches were collected during two sampling campaigns realized in summer 2021 and 2022. Adjusted sampling strategies were defined to evaluate the spatial and seasonal variation of eDNA signal which are described in the section "Section 2.2. Seasonal and spatial eDNA sampling strategies." At each location, water from the stream was collected, from one bank to the other, using three independent DNA-free plastic bottles (1 L each and so 3 L per station, to be sure to have enough water for filtrations) and non-powdered gloves following Cowart

et al. (2018). The water samples were kept in a cooler until they were returned to the laboratory within the day and processed on a dedicated bench. During each sampling event, temperature and oxygen concentration were recorded at each sampling site using a multiparameter probe (Hanna HI98129, Hanna Instrument).

Filtration was carried out using an electric vacuum pump and a 1 L filtration unit (Nalgene™) (Lawson Handley et al., 2019) on Sartorius® Nitrocellulose filters (47 mm in diameter for 0.45 µm pore size). Filtration continued until the filter clogged and the volume was then noted (Appendices A and B). The filter was removed, folded in quarters with sterilized tweezers, and stored in 1 mL of 96% molecular grade ethanol at 4°C, under dark condition, until DNA extraction.

To avoid any station cross-contamination, all the equipment (tweezers and filtration units) was disinfected with 20% bleach and thoroughly rinsed with tap water. Then, 1 L of distilled water was filtered between samples from each station to serve as a negative control.

2.2 | Seasonal and spatial eDNA sampling strategies

Seasonal variation of *A. pallipes* eDNA signal was assessed at three sampling periods presumed to be the major seasonal activity of white-clawed crayfish (Troth et al., 2021), in June, August, and October 2021 for the nine sampling sites selected: Milletiere (no 1), Ribault (no 2), Grand Vau (no 3), Peruzin (no 4), Duire (no 5), Courtineau (no 6), Quintaine (no 7), Rorthe (no 8), and Brule-Choux (no 9) (Figure 1, Appendix A). Milletiere (1) and Courtineau (6) are geographically closed but represent two independent rivers. Sampling protocols were the same as described above for each sampling period and each sampling site, to ensure homogeneous and comparable results.

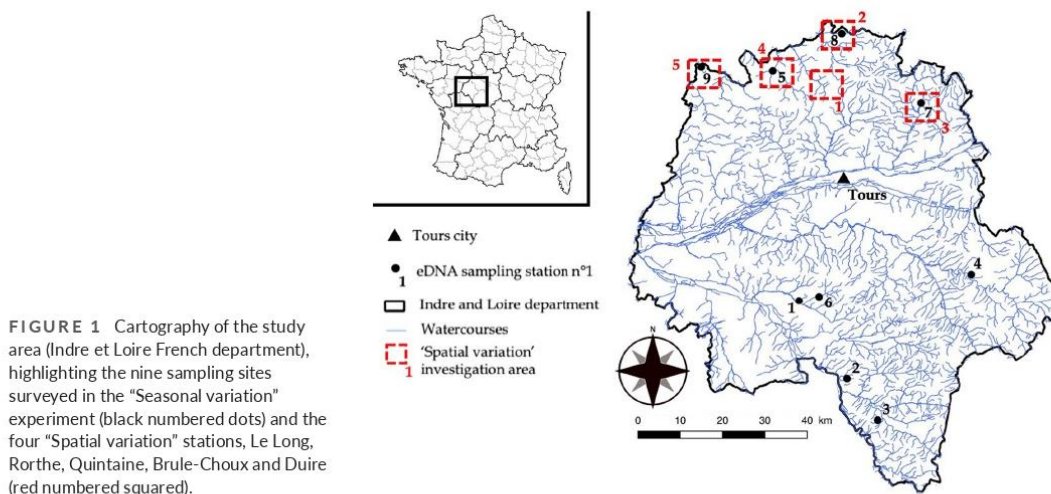


FIGURE 1 Cartography of the study area (Indre et Loire French department), highlighting the nine sampling sites surveyed in the "Seasonal variation" experiment (black numbered dots) and the four "Spatial variation" stations, Le Long, Rorthe, Quintaine, Brule-Choux and Duire (red numbered squared).

Spatial variation of *A. pallipes* eDNA signal was investigated through a downstream eDNA dispersal experiment, called "distance" hereafter. Previous studies have already shown the effect of river characteristics (velocity and discharge) and source biomass on downstream eDNA detection, often estimated between hundreds of meters to 2–3 km in streams (Van Driessche et al., 2022; Wood et al., 2021). Distance experiments were prepared according to those estimated distance detection on 5 brooks where a total of 13 stations were sampled in August 2022: 3 in the Rorthe area (on *A. pallipes* downstream limit of the population, 1200 m downstream, and 2200 m downstream), 3 in Brule-Choux area (on downstream limit of the population, 350 m downstream and 700 m downstream), 3 in Le Long area (on the downstream limit of the population, 1000 m downstream and 2300 m downstream), 2 in Quintaine area (on the downstream limit of the population and 300 m downstream), and 2 in Duire area (on the downstream limit of the population and 700 m downstream) (Appendix B). The downstream sampling sites were selected following their accessibility. The downstream limit of the crayfish populations was verified by intensive field sessions, for each station, in the weeks preceding the filtration campaign, with night observations (by light), and setting sardine-baited traps. The downstream limit of crayfish population, therefore, represents the most downstream point where an *A. pallipes* individual was observed and/or captured.

Unfortunately, the results of eDNA detection from the Brule-Choux "Spatial variation" station were found to be negative in all the samples collected in August 2022 by both qPCR and ddPCR analyses. Crayfish was known to be present at this station in 2021 (see experiment "seasonal variation," station no 9) (Figure 1) but no crayfish was observed in 2022 during field operation confirming its disappearance in this historic area.

2.3 | Primers and probe validation

Several primers and probe sets specific to the white-clawed crayfish have been developed and optimized within the literature (Table 1), targeting amplicon length ranging from 96 bp to more than 250 bp, and targeting a region of COI (Atkinson et al., 2019; Chucholl et al., 2021; Troth et al., 2020) or 16S genes (Manfrin et al., 2022). To choose the most suitable PCR set (primers and probe) for specimens found in France (our study area), we carried out an in-silico alignment using Geneious Pro R10 software (<https://www.geneious.com>; Kearse et al., 2012), consisting in aligning these experimental primers and probe sets given in the literature (Table 1) with the genetic data of *A. pallipes* from French territory (from GenBank) (Appendix C). The experimental set giving the most satisfactory results (amplicon size < 120 bp and no mismatch) was the one developed by Atkinson et al. (2019). The others gave greater degrees of nucleotide incompatibility of the probe (Chucholl et al., 2021), or one of the two primers (Troth et al., 2020), some with excess mismatches (Manfrin et al., 2022).

The *A. pallipes* COI primers and probe (Forward: 5'-GGGTTAGT GGAGAGAGGGT-3', Reverse: 5'-AATCCCGATCCACAGACG-3'

and 6-FAM probe 5'-TCAGCTATTGCCACGCA-3') specificity was assessed by visual alignment using COI sequences of potentially co-occurring alien crayfish species (*Pontastacus leptodactylus*, *Procambarus clarkii*, *Pacifastacus leniusculus*) which could cross amplify (Appendix D). After in-silico validation, in-vitro specificity tests were performed using DNA extracted from the following species: *P. clarkii*, *P. leniusculus*, *Cherax quadricarinatus*, and *C. destructor*.

In-silico tests showed high specificity of primers and probe for *A. pallipes*, with no amplification of co-occurring or genetically closely related species. For example, when aligned with sequences *P. leptodactylus* (genetically closed species of *A. pallipes*; GenBank access number: KU571462 and KU571463), five mismatches were found in reverse primer and probe, and forward primer was not able to bind to the sequence (Appendix D). In-vitro tests, on DNA samples extracted from tissues showed no amplification either on tested species.

2.4 | DNA extraction from filters

DNA extractions were performed in a PCR-free dedicated room, separated from that used for the qPCR mix preparation. Before processing samples, all equipment and benches were bleach-disinfected. DNA extractions were performed on ¼ section of the filter, using Qiagen DNeasy® Blood & Tissue commercial kit and following manufacturers guidelines with slight modifications described in Baudry et al. (2021), with a final elution volume of 50 µL in AE Buffer. Extraction yields were checked by measuring DNA concentration using NanoDrop® 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) and DNA samples were then stored at -20°C until further analysis.

2.5 | qPCR and ddPCR treatments

Each of the three biological replicates (i.e., water sample) was analyzed in duplicate by qPCR and ddPCR, giving a final number of six replicates of qPCR and 6 replicates of ddPCR per sampling station. Sample preparations were performed in a sterile room, decontaminated every night using UV-light treatment.

qPCR reactions were carried out in a 25 µL final volume containing: 12.5 µL of TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies, Applied Biosystems), 2 µL of each primer (final concentration 1000 nM each), 1 µL of probe (final concentration of 250 nM), 2.5 µL of DNA-free water, and 5 µL of DNA template. Amplifications were performed on a Roche LightCycler® 480 II quantitative thermocycler (Roche), using the following conditions: activation at 95°C for 10 min followed by 55 cycles of 95°C for 15 s and 58°C for 1 min.

ddPCR reactions were also carried out in 25 µL final volume containing: 10 µL of ddPCR Supermix (no dUTP) 2x, 1.8 µL of each primer (final concentration 900 nM), 1 µL of probe (final concentration of 250 nM), 5.4 µL of DNA-free water and 5 µL of template. Droplets generation was performed by adding 70 µL of "Droplet

TABLE 1 List of primers and probes specific to white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* available in the literature.

References	Primer sequences	Probe sequences	Targeted gene	Amplicon length (bp)
Atkinson et al. (2019)	5'-GGGTTAGTGGAGAGAGGGGT-3' 5'-AATCCCCAGATCCACAGACG-3'	5'-6-FAM-TCAGCTATTGCCACGCA-3'	COI	96
Troth et al. (2020)	5'-GCTGGGATAGTAGGACTTCTTT-3' 5'-CATGGGCGGTAACCACTAC-3'	5'-6-FAM-CTGCCCGGCTGCCCTAATTC-3'	COI	109
Churchill et al. (2021)	5'-GAGGGTTAGTGGAGAGAGGG-3' 5'-AAATCCCCAGATCCACAGACG-3'	5'-CATCACT/ZEN/TTGCCACGCGAGG	COI	99
Manfrin et al. (2022)	5'-CCCAGGAAATTTAAGCCTTTTCA 5'-TATTATGACCGTGCTAAGGTAGCA	5'-CAACCATTCATACCAGCCTTC	16S	136

Generation Oil for Probes" to each reaction and placed in the BioRad QX200 Droplet Generator. The emulsion was then transferred to a PCR plate sealed with a specific "Pierceable Foil Heat Seal" for 5 s at 180°C in the BioRad PX1 PCR Plate Sealer heating block. Final PCR amplification was carried out using the BioRad C1000 Touch Thermal Cycler thermocycler using the following conditions: 10 min at 95°C, 40 cycles of 30 s at 94°C and 1 min at 60°C then 10 min at 98°C. Results were finally read using the QuantaSoft software on the BioRad QX 200 Droplet Reader.

Each PCR plate (for both qPCR and ddPCR treatments) contained four negative controls (i.e. no-template DNA), to assess for potential contamination during the amplification, and four diluted positive standard samples (in duplicate for each concentration). These standards were generated using DNA extracted from *A. pallipes* tissue (40 ng/μL, quantified using a NanoDrop® 1000 Spectrophotometer) following the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) Guidelines (Bustin et al., 2009), and concentrations ranged from 4×10^{-1} to 4×10^{-5} ng/μL. Positive signals were considered when a Ct value <42 (i.e., considered "false positive" if above), by qPCR and one positive droplet (setting the FAM amplitude level = 2000), by ddPCR. A site was noted as "harbouring *A. pallipes*" if at least one replicate of the six technical replicates (per station and per PCR method) was positive (Atkinson et al., 2019; Bedwell & Goldberg, 2020).

2.6 | Limit of detection and limit of quantification

Limit of detection (LOD) and Limit of quantification (LOQ) were determined following MIQE guidelines requirement (Bustin et al., 2009), to compare the sensitivity of qPCR and ddPCR methods. LOD is the minimum concentration at which *A. pallipes* eDNA could be detected and LOQ is the minimum concentration at which its quantification was possible. To evaluate LOD and LOQ, DNA extracted from *A. pallipes* tissue was used to create 6 dilution series with concentrations ranging from 4 ng/μL to 4×10^{-6} ng/μL, and each of the 6 dilution levels was analyzed in 10 replicates by qPCR and ddPCR.

For qPCR method, LOD and LOQ were determined following Klymus et al. (2019) modeling, with slight modifications, as our concentrations were measured in ng/μL. Model was performed, for each PCR method, with "Best" parameter in the LOD.FCT and LOQ.FCT

functions, and 0.7 for the LOQ.threshold function, with a confidence interval <0.05.

For the ddPCR method, LOD was considered as the minimum concentration at which one replicate was positive (out of the 10 tested) and LOQ as the concentration at which nine replicates were positive (out of the 10 tested) (Mauvisseau et al., 2019).

2.7 | Inhibition tests

eDNA samples are known to be subject to potential inhibition due to the presence of natural compounds like Humic substances or Polyphenols in river water (Schrader et al., 2012; Takasaki et al., 2021).

To determine the level of inhibition in our eDNA samples, we followed the protocol used in Baudry et al. (2023), with some modifications. Briefly, we introduced 1 μL of controlled DNA (4 ng/μL) belonging to *C. quadricarinatus*, a crayfish species not occurring in France, in 4 μL of environmental samples referred as "test" sample and 4 μL of DNA-free water referred as "clean" control samples (with no inhibition). qPCR and ddPCR targeting *C. quadricarinatus* were performed in "test" and "clean" samples using dedicated primers et probe (Baudry et al., 2021) following the conditions described above.

This protocol was applied to each filter (biological replicate) used in this study and the inhibition level was determined for each station, by subtracting the average number of "test" cycles from the average number of "control" cycles. Inhibition was characterized if a $\Delta Ct > 1$ was observed (concerning qPCR treatment) and a $\Delta copy > 10$ (concerning ddPCR treatment).

2.8 | Analyses

Cartography was performed on QGIS 2.18 (Las Palmas) software (QGIS Team Development, 2016), with resources provided from the database ©IGN. All statistical analyses were performed using RStudio V1.1.463 (R Development Core Team, 2019, RGui v4.0.2). The normal distribution of the data and its homogeneity were verified with Shapiro-Wild and Bartlett tests.

Effects of covariates (temperature, oxygen, distance, and total volume filtered) on the probability of *A. pallipes* eDNA occurrence in



water samples were modeled following MacKenzie et al. (2002) and Royle and Dorazio (2009) approaches. "eDNAoccupancy" R package was used, following procedures given in Dorazio and Erickson (2018) ("occModel" fitting determination and 10,000 iterations MCMC chains).

False negative errors were calculated using Griffin et al. (2019) modeling (<https://seak.shinyapps.io/eDNA/>), for qPCR and ddPCR, on samples collected for spatial variation (see above Section 2.2). The probability of species presence (ψ) was set at 1 for sites where *A. pallipes* was known to occur and fixed by the random parameters for sites sampled downstream (where the *A. pallipes* was unknown). Probabilities of eDNA occurrence in a PCR replicate (p) were investigated for qPCR and ddPCR, then both approaches were compared using Student's t-test.

The effects of seasonality and PCR method (qPCR/ddPCR) on the detection efficiency/probability were analyzed with a two-way ANOVA, with a significant probability of less than 0.05.

3 | RESULTS

3.1 | Sensitivity of the methods and inhibition test

During all PCR experiments (qPCR and ddPCR), no false positive (amplification of no-DNA samples) or false negative (no amplification of *A. pallipes* DNA standards) was reported.

During qPCR assays, LOD was found at a concentration of 3.65×10^{-5} ng/ μ L, with a mean Ct value of 39.94 ± 0.03 , and LOQ was found at a concentration of 9.78×10^{-4} ng/ μ L, with a mean Ct value of 36.82 ± 0.4 .

ddPCR seemed to perform correctly with $18,392 \pm 2139.8$ droplets generated for each reaction. LOD and LOQ were respectively found at a concentration of 4×10^{-5} ng/ μ L (1.2 copy/5 μ L of eDNA) and 4×10^{-4} ng/ μ L (2.49 ± 0.49 copy/5 μ L of eDNA), highlighting no difference between the two PCR methods.

No inhibition was found in our water samples as the maximum inhibition level (Δ Ct and Δ copy between "test" and "control" samples) observed was, respectively Δ Ct = 0.53 ± 0.08 , for the "Duire" station and Δ copy = 2.48 ± 0.12 . We can, therefore, affirm that the detection probability of *A. pallipes* eDNA was not affected by the inhibition phenomenon in our study, enabling the interpretation of our results regarding spatial and seasonal variation.

3.2 | Environmental covariates influences

Occupancy modeling showed a significant effect of each environmental covariate tested (oxygen concentration, water temperature, and total volume filtered) on the probability of *A. pallipes* eDNA occurrence for both PCR methods (qPCR and ddPCR). The results were similar for each method, highlighting a significant positive

influence of oxygen concentration (p -value < 0.01), a significant negative influence of temperature (p -value < 0.05), and a significant positive influence of total volume filtered (p -value < 0.05) on the probability of *A. pallipes* eDNA occurrence. eDNA occurrence probability reached 75% in sites where oxygen concentration exceed 8 mg/L¹. For temperature and total volume filtered covariates, the eDNA detection probabilities remained very high, exceeding 80% when the measurements are below 20°C and 1000 mL of total volume filtered (Figure 2).

3.3 | Spatial variation and false negative errors

Occupancy modeling results showed a significant negative influence of the distance from the *A. pallipes* population on the eDNA detection efficiency, for both qPCR and ddPCR methods (p -value < 0.05; Figure 3a,b). qPCR detection probability decreased <60% when water was sampled at a distance from *A. pallipes* population >1 km (Figure 3a). For the ddPCR method, eDNA detection probability decreased to 50% when water was sampled at a distance from *A. pallipes* population >1 km (Figure 3b).

All sites by sites results showed the same trend (Figure 4): for example, at Le Long site (1), *A. pallipes* detection probabilities were 83.3% using both qPCR and ddPCR methods, on samples collected at the site harboring the crayfish population, with Ct values and copy number of 40.4 ± 0.7 (per 5 μ L of eDNA) and 2.34 ± 1.4 (per 5 μ L of eDNA), respectively. Crayfish detection probability decreased to 33.3%, using both PCR methods, on water samples filtered at 2300 m from the population, with lower Ct values and copies number (41.2 ± 0.05 per 5 μ L of eDNA and 0.45 ± 0.7 per 5 μ L of eDNA, respectively). Interestingly, *A. pallipes* detection probabilities were similar (only at Le Long site, using ddPCR method) or higher when water samples were taken 1000 m downstream of the crayfish population for 1-Le Long and 2-Rorthie (Figure 4).

Concerning 3-Quintaine and 4-Duire sites, crayfish detection probabilities and sensitivity decreased for both approaches (qPCR, ddPCR) at lower distances than observed previously for 1-Le Long and 2-Rorthie sites: for the Quintaine site, after only 300 m, *A. pallipes* detection probability was 13.3% using qPCR and the crayfish was undetectable using ddPCR method (Figure 4). For the Duire area, crayfish detection probabilities decreased <50% when water samples were taken at 700 m downstream of the crayfish population (Figure 4).

Modeling highlighted high probabilities of eDNA occurrence (>0.8) at the downstream site (ψ), for each station, even those >2000 m (Table 2). But a decrease in this probability of eDNA occurrence (ψ) was observed as we sampled downstream the crayfish population (Table 2). The "Probability of eDNA occurrence in a PCR replicate" (p) modeling results highlighted a significantly higher sensitivity of the qPCR method ($t = 21.102$, p -value < 0.001) and a decreased probability of eDNA detection as both qPCR and ddPCR

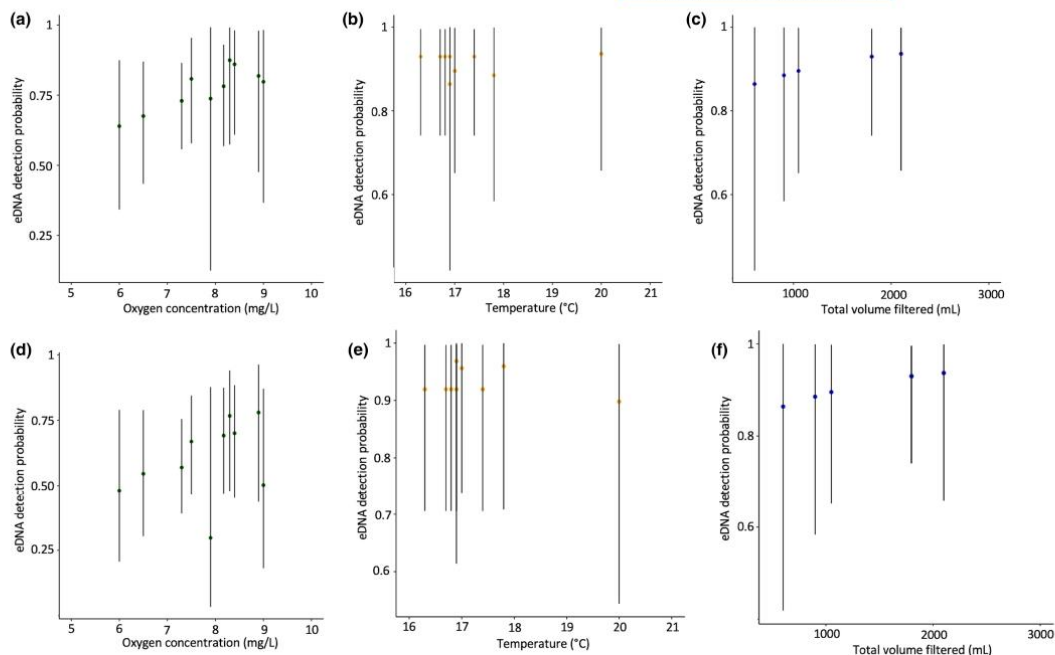


FIGURE 2 Influence of (a) oxygen concentration, (b) temperature, and (c) total volume filtered on the probability of *Austropotamobius pallipes* eDNA occurrence after a qPCR analysis, (d) oxygen concentration, (e) temperature, and (f) total volume filtered on the probability of *Austropotamobius pallipes* eDNA occurrence after a ddPCR analysis; following site occupancy modeling.

methods were applied on water samples collected downstream (Table 2).

3.4 | Effect of seasonality

The two-way ANOVA results performed on the 162 samples (nine sites, three biological replicates, two technical replicates) showed a positive effect of the season on the detection efficiency of *A. pallipes* ($p < 0.01$; Table 3). The PCR method (qPCR or ddPCR) had no significant effect on the crayfish detection ($p = 0.895$) as well as the cumulative effect of the "season AND the PCR method" ($p = 0.798$).

The probability of crayfish detection, as well as the signal intensity (Ct value for qPCR or copy number for ddPCR) were significantly higher in August than in June and October for the two PCR methods (Figure 5). In August, the detection probabilities of *A. pallipes* reached $90.7 \pm 18.8\%$ for qPCR and $83.3 \pm 28.9\%$ for ddPCR, with Ct values reaching 36.8 ± 2.6 and copy number 40.4 ± 72.2 copies per $5 \mu\text{L}$ (Figure 5). In June, the detection probabilities of *A. pallipes* reached $55.6 \pm 39.1\%$ using qPCR and $63 \pm 38.9\%$ using ddPCR, with Ct values of 38.2 ± 1.8 and copy number reaching 10.9 ± 9.9 copies per $5 \mu\text{L}$ (Figure 5). Finally, in October the detection probabilities of *A. pallipes* decreased to $44.4 \pm 37.2\%$ using qPCR and $40.7 \pm 38.3\%$ using ddPCR, with Ct values of 38.9 ± 1.6 and copy number reaching 2.1 ± 5.4 copies per $5 \mu\text{L}$ (Figure 5).

4 | DISCUSSION

In this study, we evaluated the operability of eDNA-based approaches as a conservation tool to monitor the endangered crayfish *A. pallipes* populations in rivers. Prior evaluating spatial, seasonal, and potential effects of environmental covariates on eDNA detection, we applied a rigorous validation procedure to improve the interpretation of our results. We confirmed *in silico* and *in vitro* that the most adapted *A. pallipes* qPCR and ddPCR primers and probes available in the literature were the ones proposed by Atkinson et al. (2019), targeting a 96bp long region of the COI gene. We evaluated the LOD and the LOQ of our qPCR (Klymus et al., 2019) and ddPCR (Mauvisseau et al., 2019) assays, which are key factors to determine the limits of eDNA approaches and improve the confidence of ecological interpretation. Another aspect we evaluated was the potential effect of environmental PCR inhibitors known to affect particularly qPCR approaches (Lance & Guan, 2019). As no inhibition effect was observed in our environmental samples, qPCR and ddPCR results were not influenced by inhibitors in our context. If we refer to the eDNA approach validation scale proposed by Thalinger et al. (2021), we reach a high level of validation for our eDNA species-specific assays. Thus, our validation procedure was performed for *A. pallipes* but could easily be reproduced in other crayfish taxa. Our results highlighted seasonal and spatial variation in eDNA detection efficiency. We determined an optimal sampling period for the eDNA

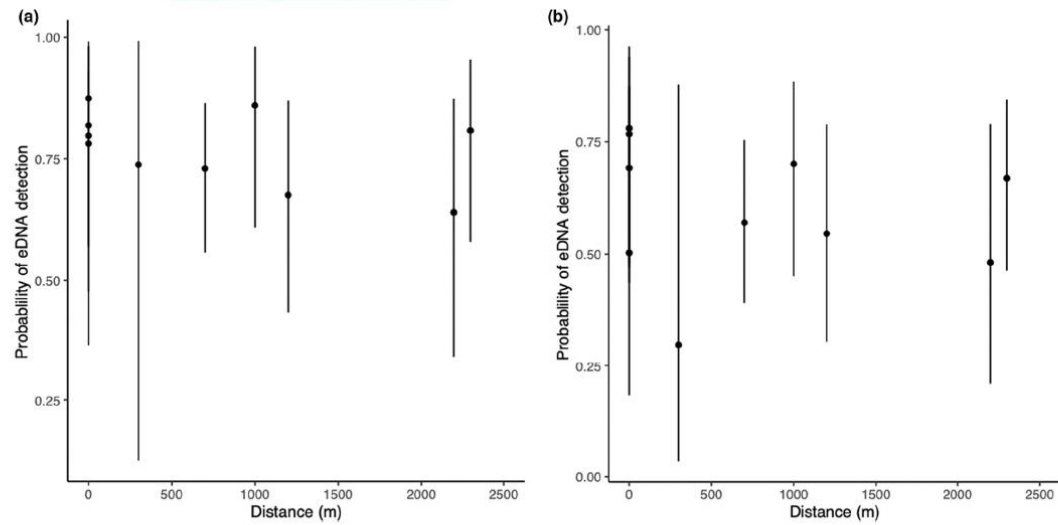


FIGURE 3 Effect of sampling distance from the *Austroptamobius pallipes* population on the probability of *A. pallipes* eDNA detection, following occupancy modeling.

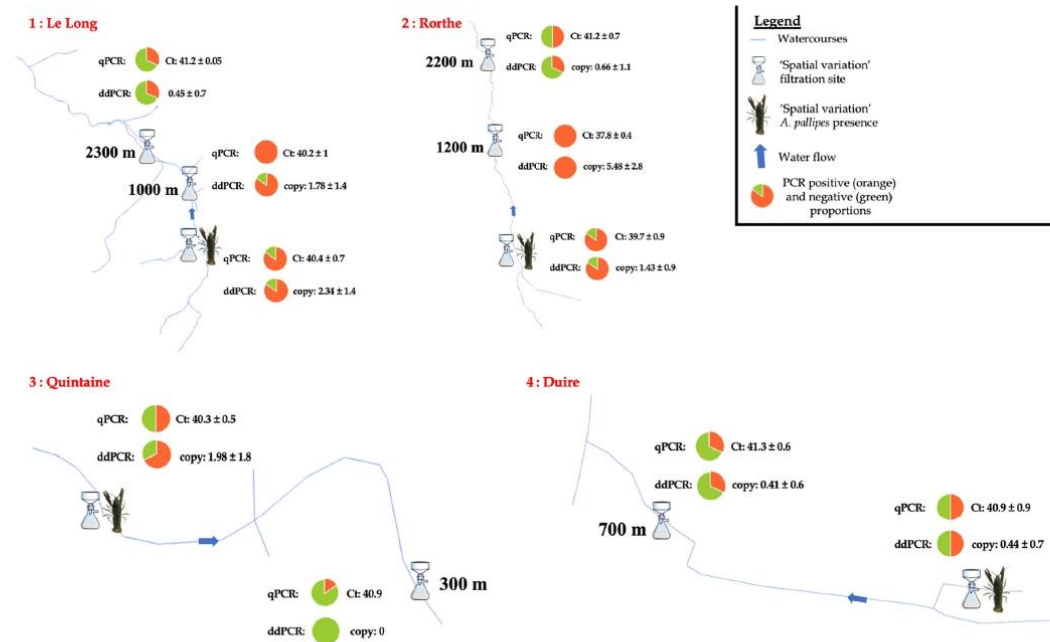


FIGURE 4 Cartography of the "Spatial variation" results investigated at the four considered areas, Le Long, Rorthe, Quintaine, and Duire (red numbered squared).

TABLE 2 Probability of eDNA occurrence calculated following Dorazio and Erickson (2018) and Griffin et al. (2019).

Sites	Distance (m)	Probability of eDNA Occurrence on site (ψ)		Probability of eDNA Occurrence in a PCR replicate (p)	
		qPCR	ddPCR	qPCR	ddPCR
Le Long	0	1	1	0.874	0.767
	1000	0.899	0.932	0.86	0.701
	2300	0.827	0.888	0.808	0.669
Rorthé	0	1	1	0.818	0.78
	1200	0.907	0.935	0.675	0.546
	2200	0.827	0.888	0.64	0.481
Quintaine	0	1	1	0.797	0.503
	300	0.827	0.888	0.738	0.297
Duire	0	1	1	0.781	0.692
	700	0.8	0.888	0.73	0.57

TABLE 3 Two-way Analysis of Variance (ANOVA) investigating the effects of seasonal effect and PCR method used on the detection efficiency of *Austropotamobius pallipes*, using ddPCR and qPCR eDNA methods.

Source of variation	Sum of square	df	F	p-value
Season	18,148	2	7.6863	<0.01 **
Method (qPCR vs. ddPCR)	21	1	0.0174	0.895
Season × method	535	2	0.2266	0.798
Residuals	56,667	48		

Note: ** symbols mark the significance of the results.

detection of *A. pallipes* as well as the distance to eDNA source assumption to give advice regarding field sampling strategies.

4.1 | Effects of environmental covariates

For both qPCR and ddPCR methods, the crayfish detection probability was significantly and positively influenced by the water oxygen concentration and the total volume filtered, and negatively influenced by the water temperature. Water temperature and its oxygen concentration are well known to be correlated (not obligatorily significantly, as in this study) and an increase in temperature is known to significantly accelerate the degradation of eDNA fragments (Saito & Doi, 2021). As an example, Moyer et al. (2014) showed a decrease in detection efficiency up to 1.7 times, when the temperature increases by 1°C.

The results showed a positive and significant correlation between the total filtered volume and the detection probability of *A. pallipes* eDNA. This is reassuring given that many recent studies seek to optimize protocols to filter ever more water, up to 100L (Valentini et al., 2016) or even from 1000 to 3000L (Schabacker

et al., 2020). However, these studies use filtration methods different from those used here and if we compare similar protocols, other studies have also demonstrated an efficiency up to 5 times higher when 2L of water were filtered instead of one, in a lotic environment (Bedwell & Goldberg, 2020).

Nevertheless, it would therefore seem that here, these results were mainly guided by the ecological preferences of our target species, *A. pallipes*. The white-clawed crayfish is a species that preferentially occurs in headwater areas (Souty-Grosset et al., 2006; Trouilhé et al., 2007). These headwater areas, in the temperate zone, are characterized by colder and well-oxygenated waters, unlike the downstream zones, where the temperature increase, and the oxygen concentration decrease, with the drop in altitude (Trouilhé et al., 2007). These areas at the head of the watersheds are often also mostly characterized by rather clear water, with a low organic matter content (Tamooch et al., 2012), which, therefore, logically allows larger volumes of water filtered before membrane clogging. It was therefore not surprising to obtain results demonstrating a high probability of detection of *A. pallipes* in these highly oxygenated and low-tempered areas, where larger volumes of water could be filtered.

4.2 | Spatial variation

From the four sampling areas used to investigate the influence of distance from source populations on the eDNA detection, the results showed a decrease in both the probability of detection, by calculation (Figure 4) and by modeling (Table 2), and the detection efficiency (for ddPCR and qPCR), when the sampling sites were downstream the *A. pallipes* population. The interpretation of these spatial results is quite challenging to discuss because the detection distance is clearly dependent on many biotic, abiotic, and experimental factors, such as eDNA source depending on taxa/species and biomass, river hydrodynamics, decay rates depending on environmental factor like temperature and UV, volume filtered. Several studies have focused on the study of the eDNA dispersal distance, considering these different factors, in lotic environments, via experimental caged-species systems, field observation, and/or modeling (Baudry et al., 2023; Nukazawa et al., 2018; Van Driessche et al., 2022; Wacker et al., 2019). Certain trends seemed to converge, and to fit with our results (for the eDNA dispersal distance): the eDNA quantity released at the source, correlated to the biomass of target individuals and their activity, including molting—for crustaceans—and breeding, has a positive influence on its downstream dispersion, with reliable detection up to 2 to 3 km, on different fish species (Baudry et al., 2023; Nukazawa et al., 2018; Van Driessche et al., 2022) and bivalves (Wacker et al., 2019).

Crayfish, in general, are well known to release very little eDNA quantities into the environment, because of their morphology, composed of an exoskeleton and a cuticle, releasing little mucus in the water (Dougherty et al., 2016). White-clawed crayfish populations are also often of low densities, fragmented in some places, or locally

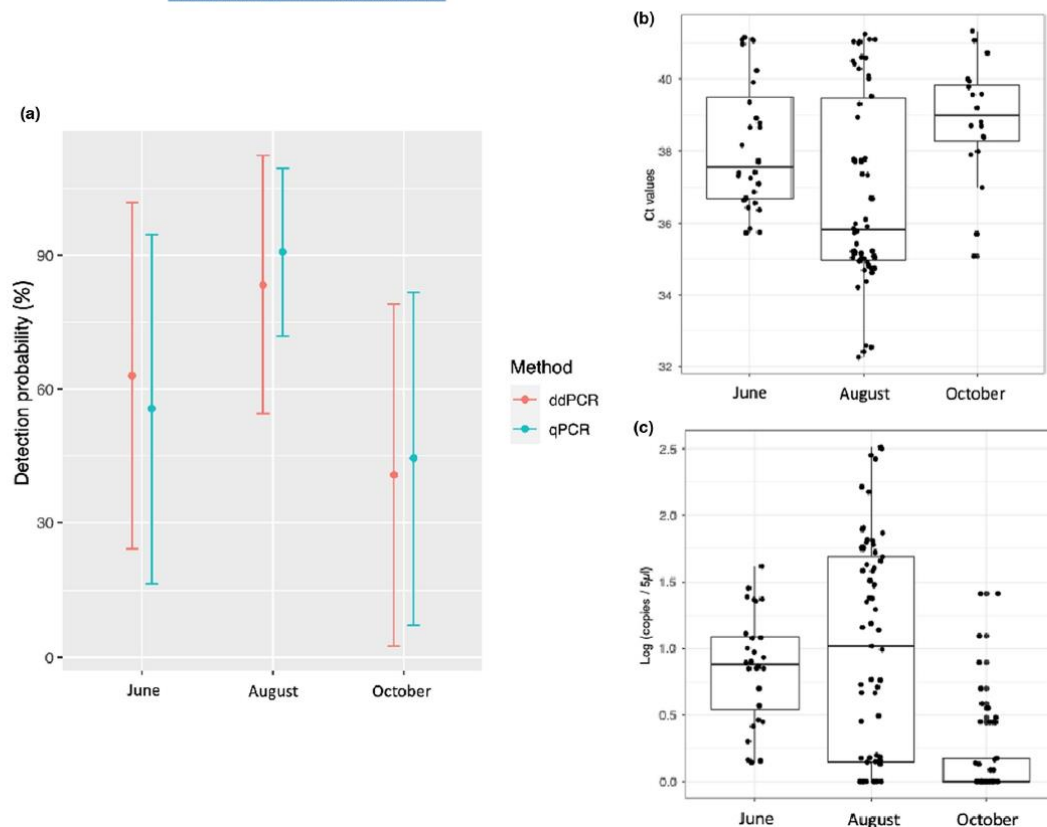


FIGURE 5 Graphical representations of (a) detection probability of *Austropotamobius pallipes* by qPCR and ddPCR methods; and sensitivity of (b) the quantitative PCR method (Ct values) and (c) the digital droplet PCR (Log copies number/5µL), through three seasonal periods (June, August, and October).

extinct (Collas et al., 2016; Füreder et al., 2010), reducing the eDNA source emission. Nevertheless, here, detection of crayfish remained possible up to more than 1 km and even 2 km in some cases, representing very encouraging results in the context of *A. pallipes* population monitoring, especially in this area, where the brooks sampled are small, narrow, and shallow, certainly harboring low population densities. By sampling favorable areas, within a linear distance of approximately 2 km, it becomes possible to detect the crayfish using eDNA method, and to delimit areas to sample by the traditional way (observation or trapping).

4.3 | Seasonal variation

Our experiments showed a significative influence of the season on the *A. pallipes* detection efficiency and probability, which is in accordance with other studies on the same species (Dunn et al., 2017; Troth et al., 2021). This is not surprising as crayfish activity is known

to change according to the water temperature (and so, seasons), ranging from low activity/torpor in winter, juvenile hatching in May/June, high activity level and molting in summer, and breeding before winter (October/November) (Troth et al., 2021). Higher activity levels and molting in August, seem to lead to a higher amount of eDNA in the water and better detection by PCR methods. However, contrarily to our results, Dunn et al. (2017) and Troth et al. (2021) highlighted a better white-clawed eDNA detection in June, during the juveniles emergence period. But these two cited experiments were run under controlled conditions, without considering variations in water levels observed in the wild. This can explain the difference with our study, where the water was sampled during the low water period, in August.

In addition to these periods of high organism activity, these water levels and/or flow rates have an important role in the eDNA detection efficiency, as demonstrated by Curtis et al. (2020), for the Asian corbicula (*Corbicula fluminea*). During the summer period, the water levels (and the flow rates) of the rivers decrease (linked

to the increase of air temperature and the scarcity of precipitation), favoring the increase of eDNA concentration (by reducing the dilution effect) and, therefore, making its detection easier. Finally, given the actual context of climate change, we advise to adapt the sampling from year to year. This phenomenon has a considerable impact on water temperature, precipitation, and the hydrological regime (Graham et al., 2007), and seems to be discontinuous, with some inter-annual variations possible. With this climate change, suitable areas for *A. pallipes* tend to decrease (Préau et al., 2020) and periods of severe drought to become more and more frequent, with high water temperatures in summer, making eDNA detection yields questionable. It is therefore difficult to predict, to the nearest month, the optimal period for eDNA sampling in an *A. pallipes* population monitoring context, but we suggest sampling when water temperatures are below 18–20°C.

4.4 | qPCR versus ddPCR

We compared two PCR methods commonly used for eDNA species detection surveys (qPCR and ddPCR), with a known bias, with no differences being apparent in our study context. These results contrast with other studies, which showed a greater efficiency of ddPCR for eDNA detection (Doi et al., 2015; Wood et al., 2019). For example, Wang et al. (2022) systematically compared the two PCR methods (qPCR and ddPCR) for quantitating both bacteria and fungi, in test samples (mock communities) and environmental/field samples. Under test conditions, ddPCR was found to be significantly closer to expected values, with less variation between replicates (p -value < 0.05). These same observations were made in the field, highlighting a better precision, repeatability, sensitivity, and stability in bacterial and fungal quantitation than qPCR. This study, even if it appears to be very robust, relates to the detection of particular species (bacteria and fungi), very different from animal species, such as crayfish (Wang et al., 2022). The detection of crustaceans is known to be relatively challenging: they shed less eDNA than other organisms in the water (Allan et al., 2021), probably due to their exoskeleton. This phenomenon was accentuated in case of low density of population, as may be the case for *A. pallipes*, resulting in weak eDNA signals using PCR methods. Certain environmental parameters must be considered, such as the presence of PCR inhibitors due to the high amount of suspended matter in the water.

However, in our study, we demonstrated an absence of inhibition in our samples, resulting in similar yields from the two PCR methods. This absence of inhibition can be due to the use of Taqman Environmental Mastermix 2.0 during our PCR experiments: Strand et al. (2011) showed the great efficiency of this mix, able to remove close to 100% of the observed inhibition in eDNA extracts, including from water with high content of humic substances. Considering these similar detection efficiencies, we recommend the qPCR approach in the context of *A. pallipes* monitoring populations in France, under our experimental conditions.

In our study context, qPCR, in addition to allowing a very satisfactory detection of crayfish, turns out to be less expensive and less time-consuming than ddPCR. Regarding the price, it is dependent on the cost of the reagents, which can be negotiated differently depending on the geographical areas and the laboratories considered. For our study, the cost of one eDNA sample analysis (for *A. pallipes* detection) is 17€60 for qPCR against 30€50 for ddPCR (from the extraction of eDNA, from filters, to the results visualization, without considering all the standard costs, such as equipment depreciation and human time).

qPCR also has an advantage over ddPCR regarding the experimentation time, something on which all the studies carried out agrees (Doi et al., 2015; Wang et al., 2018, 2022). No difference occurs in the eDNA extraction and preparation phases, both methods using similar protocols and similar concentrations of eDNA, but in the PCR reactions preparation and results visualization. For the two PCR methods, the mixes are relatively similar, not necessarily in terms of reagents and their concentrations but in terms of preparation time. However, while qPCR only requires plate filling, with mixes and templates (eDNA, DNA-free samples, standards, and negative controls, etc...), it is necessary to generate droplets for ddPCR, using the BioRad QX200 Droplet Generator, a step that can take more than 30 min per plate. The amplification protocols, once the generation of droplets has been completed for ddPCR, are the same for both methods (qPCR and ddPCR) and therefore last the same time. But a new difference appears when visualizing the results: qPCR (using a Roche LightCycler® 480 II quantitative thermocycler) allows live visualization of the results, while for ddPCR it is necessary to read the results, when the PCR amplification run was completed, using the BioRad QX 200 Droplet Reader, a new step that can last more than 1 h per plate.

5 | CONCLUSION

We adapted and optimized an eDNA-based approach allowing the detection of the endangered white-clawed crayfish *A. pallipes* in French watercourses. Improved laboratory procedures allowed a confident validation of the method and the detection of the species in the natural environment. It allowed detection of the crayfish species up to 2 km downstream of the population, even in context with low densities, considering this endangered species. Thus, eDNA could be a useful tool for freshwater managers and stakeholders to refine the presence of crayfish on large number of sites, in order to orient precisely conventional field surveys (e.g., population genetics, counting). This method proved its reliability for *A. pallipes* population monitoring, unfortunately highlighting the disappearance of one population between 2021 and 2022 (Brule-Choux). Even if the summer period seems to be the most conducive to the *A. pallipes* detection using the eDNA method, it would seem judicious to adapt the sampling from year to year, given that these seasons are bound to change, in a growing context of climate change. Finally, we recommend to stakeholders a detection approach by qPCR, under our

experimental conditions, offering very satisfactory results, at costs almost two times lower than those of ddPCR (proven to be of equal performance).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Thomas Baudry: methodology, software, formal analysis, data curation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization, and manuscript validation; **Maud Laffitte:** lab experiments, data curation, writing—review and editing, and manuscript validation; **Charlotte Noizat:** lab experiments, data curation, and manuscript validation; **Carine Delaunay:** lab experiments and manuscript validation; **Grégoire Ricou:** field investigation, project administration, funding acquisition, and manuscript validation; **Valentin Vasselon:** writing—review and editing, visualization, and manuscript validation; **Frédéric Grandjean:** conceptualization, supervision, project administration, funding acquisition, and writing—review and editing.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christopher M. Austin, professor at Deakin University (Australia) for the English proofreading of the manuscript. We thank Grand Poitiers Communauté urbaine and the Région Nouvelle Aquitaine for granted the Maud Laffitte's PhD. We also thank the Fédération de Pêche et de Protection du Milieu Aquatique d'Indre et Loire (Fdaappma37) which funded this study, as well as the Center National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Poitiers for the provision of all the equipment necessary to carry out the study.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its supplementary information files) and additional information and data are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Thomas Baudry  <https://orcid.org/0000-0001-5699-6837>

REFERENCES

- Allan, E., Zhang, W., Lavery, A., & Govindarajan, A. (2021). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 3, 492–514. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>
- Atkinson, S., Carlsson, J. E. L., Ball, B., Kelly-Quinn, M., & Carlsson, J. (2019). Field application of an eDNA assay for the threatened white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Science*, 38, 503–509. <https://doi.org/10.1101/562710>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2015). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Baudry, T., Mauvisseau, Q., Arqué, A., Goût, J. P., Delaunay, C., de Boer, H. J., & Grandjean, F. (2023). Environmental DNA survey to detect an endemic cryptic fish, *Anablepsoides cryptocallus*, in tropical freshwater streams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 1–11, 325–335. <https://doi.org/10.1002/aqc.3916>
- Baudry, T., Mauvisseau, Q., Goût, J., Arqué, A., Delaunay, C., Smith-ravin, J., & Sweet, M. (2021). Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot, an eDNA-based success story. *Ecological Indicators*, 126, 107637. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107637>
- Becking, T., Kiselev, A., Rossi, V., Street-Jones, D., Grandjean, F., & Gaulin, E. (2021). Pathogenicity of animal and plant parasitic *Aphanomyces* spp and their economic impact on aquaculture and agriculture. *Fungal Biology Reviews*, 40, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.08.001>
- Bedwell, M. E., & Goldberg, C. S. (2020). Spatial and temporal patterns of environmental DNA detection to inform sampling protocols in lotic and lotic systems. *Ecology and Evolution*, 10, 1602–1612. <https://doi.org/10.1002/ece3.6014>
- Bruce, K., Blackman, R. C., Bourlat, S. J., Hellström, M., Bakker, J., Bista, I., Bohmann, K., Bouchez, A., Brys, R., Clark, K., Elbrecht, V., Fazi, S., Fonseca, V. G., Hänfling, B., Leese, F., Mächler, E., Mahon, A. R., Meissner, K., Panksep, K., ... Deiner, K. (2021). A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. *Pensoft Publisher*. <https://doi.org/10.3897/ab.e68634>
- Bryant, D., Crowther, D., & Papas, P. (2012). *Improving survey methods and understanding the effects of fire on burrowing and spiny crayfish in the Bunyip and South Gippsland catchments: Black Saturday Victoria 2009 - Natural values fire recovery program*. <https://doi.org/10.13140/2.1.4059.6166>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Carraro, L., Stauffer, J. B., & Altermatt, F. (2021). How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. *Environmental DNA*, 3, 157–172. <https://doi.org/10.1002/edn3.137>
- Chucholl, F., Fiolka, F., Segelbacher, G., & Epp, L. S. (2021). eDNA detection of native and invasive crayfish species allows for year-round monitoring and large-scale screening of lotic systems. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.639380>
- Collas, M., Becking, T., Delpy, M., Pflieger, M., Bohn, P., Reynolds, J., & Grandjean, F. (2016). Monitoring of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) population during a crayfish plague outbreak followed by rescue. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 417, 1–8. <https://doi.org/10.1051/kmae/2015037>
- Cowart, D. A., Breedveld, K. G. H., Ellis, M. J., Hull, J. M., & Larson, E. R. (2018). Environmental DNA (eDNA) applications for the conservation of imperiled crayfish (*Decapoda: Astacidea*) through monitoring of invasive species barriers and relocated populations. *Journal of Crustacean Biology*, 38, 257–266. <https://doi.org/10.1093/jcbl/ruy007>
- Curtis, A. N., Tiemann, J. S., Douglass, S. A., Davis, M. A., & Larson, E. R. (2020). High stream flows dilute environmental DNA (eDNA) concentrations and reduce detectability. *Diversity and Distributions*, 1–14, 1918–1931. <https://doi.org/10.1111/ddi.13196>
- Deiner, K., & Altermatt, F. (2014). Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One*, 9, e88786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>



- Deiner, K., Walser, J. C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>
- Djurhuus, A., Port, J., Closek, C. J., Yamahara, K. M., Romero-Maraccini, O., Walz, K. R., Goldsmith, D. B., Michisaki, R., Breitbart, M., Boehm, A. B., & Chavez, F. P. (2017). Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Frontiers in Marine Science*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314>
- Doi, H., Takahara, T., Minamoto, T., Matsuhashi, S., Uchii, K., & Yamanaka, H. (2015). Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species. *Environmental Science and Technology*, 49, 5601–5608. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00253>
- Dorazio, R. M., & Erickson, R. A. (2018). Ednaoccupancy: An R package for multiscale occupancy modelling of environmental DNA data. *Molecular Ecology Resources*, 18, 368–380. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12735>
- 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, 722–732. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12621>
- Dubreuil, T., Baudry, T., Mauvisseau, Q., Arqué, A., Courty, C., Delaunay, C., Sweet, M., & Grandjean, F. (2021). The development of early monitoring tools to detect aquatic invasive species: eDNA assay development and the case of the armored catfish *Hypostomus robini*. *Environmental DNA*, 1–14, 349–362. <https://doi.org/10.1002/edn3.260>
- Dunn, N., Priestley, V., Herraiz, A., Arnold, R., & Savolainen, V. (2017). Behavior and season affect crayfish detection and density inference using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 7, 7777–7785. <https://doi.org/10.1002/ece3.3316>
- Ficetola, G. F., Mialud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4, 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Füreder, L., Gherardi, F., Holdich, D., Reynolds, J., Sibley, P., & Souty-Grosset, C. (2010). *Austropotamobius pallipes*. The IUCN red list of threatened species 2010 (Version 2010.3). <https://www.iucnredlist.org>
- Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2011). Molecular detection of vertebrates in stream water: A demonstration using rocky mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS One*, 6, e22746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746>
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., Spear, S. F., McKee, A., Oyler-McCance, S. J., Cornman, R. S., Laramie, M. B., Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., Takahara, T., Herder, J. E., & Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7, 1299–1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>
- Graham, L. P., Andréasson, J., & Carlsson, B. (2007). Assessing climate change impacts on hydrology from an ensemble of regional climate models, model scales and linking methods—a case study on the Lule River basin. *Climatic Change*, 81, 293–307. <https://doi.org/10.1007/s10584-006-9215-2>
- Grandjean, F., Cornuault, B., Archambaud, S., Bramard, M., & Otrebsky, G. (2000). Life history and population biology of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*, in a brook from the Poitou-Charentes region (France). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 356, 55–70. <https://doi.org/10.1051/kmae:2000004>
- Grandjean, F., Roques, J., Delaunay, C., Petrussek, A., Becking, T., & Collas, M. (2017). Status of *Pacifastacus leniusculus* and its role in recent crayfish plague outbreaks in France: Improving distribution and crayfish plague infection patterns. *Aquatic Invasions*, 12, 541–549. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.4.10>
- Griffin, J. E., Matechou, E., Buxton, A. S., Bormpoudakis, D., & Griffiths, R. A. (2019). Modelling environmental DNA data; Bayesian variable selection accounting for false positive and false negative errors. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C: Applied Statistics*, 69, 377–392. <https://doi.org/10.1111/rssc.12390>
- Hänfling, B., Handley, L. L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., Oliver, A., & Winfield, I. J. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 25, 3101–3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660>
- Harper, K., Anucha, P., Turnbull, J., Bean, C., & Leaver, M. (2018). Searching for a signal: Environmental DNA (eDNA) for the detection of invasive signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). *Management of Biological Invasions*, 9, 137–148. <https://doi.org/10.3391/mbi.2018.9.2.07>
- Jane, S. F., Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Schwartz, M. K., Lowe, W. H., Letcher, B. H., & Whiteley, A. R. (2015). Distance, flow and PCR inhibition: EDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15, 216–227. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12285>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts1199>
- King, A. C., Krieg, R., Weston, A., & Zenker, A. K. (2022). Using eDNA to simultaneously detect the distribution of native and invasive crayfish within an entire country. *Journal of Environmental Management*, 302, 113929. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113929>
- Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., Jackson, C. A., Lance, R. F., Mangan, A. M., Monroe, E. M., Piaggio, A. J., Stokdyk, J. P., Wilson, C. C., & Richter, C. A. (2019). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2, 271–282. <https://doi.org/10.1002/edn3.29>
- Kouba, A., Petrussek, A., & Kozák, P. (2014). Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: Update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 413, 5. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014007>
- Lance, R. F., & Guan, X. (2019). Variation in inhibitor effects on qPCR assays and implications for eDNA surveys. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 71, 23–33. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2018-0263>
- Lawson Handley, L., Read, D. S., Winfield, I. J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., Hahn, C., Blackman, R., Wilcox, R., Donnelly, R., Szitenberg, A., & Hänfling, B. (2019). Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England's largest lake. *Environmental DNA*, 1, 26–39. <https://doi.org/10.1002/edn3.5>
- MacKenzie, D. I., Nichols, J. D., Lachman, G. B., Droege, S., Royle, A., & Langtimm, C. A. (2002). Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one. *Ecology*, 83, 2248–2255. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083)
- Majaneva, M., Diserud, O. H., Eagle, S. H. C., Boström, E., Hajibabaei, M., & Ekrem, T. (2018). Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific Reports*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23052-8>
- Manfrin, C., Zanetti, M., Stanković, D., Fattori, U., Bertucci-Maresca, V., Giulianini, P. G., & Pallavicini, A. (2022). Detection of the endangered stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank,



- 1803) and its Congeneric a. pallipes in its last Italian biotope by eDNA analysis. *Diversity*, 14, 205. <https://doi.org/10.3390/d14030205>
- Mauvisseau, Q., Davy-Bowker, J., Bulling, M., Brys, R., Neyrinck, S., Troth, C., & Sweet, M. (2019). Combining ddPCR and environmental DNA to improve detection capabilities of a critically endangered freshwater invertebrate. *Scientific Reports*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50571-9>
- Moyer, G. R., Díaz-Ferguson, E., Hill, J. E., & Shea, C. (2014). Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. *PLoS One*, 9, e103767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103767>
- Nukazawa, K., Hamasuna, Y., & Suzuki, Y. (2018). Simulating the advection and degradation of the environmental DNA of common carp along a river. *Environmental Science and Technology*, 52, 10562–10570. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02293>
- Piggott, M. P. (2016). Evaluating the effects of laboratory protocols on eDNA detection probability for an endangered freshwater fish. *Ecology and Evolution*, 6, 2739–2750. <https://doi.org/10.1002/ece3.2083>
- Préau, C., Nadeau, I., Sellier, Y., Isselin-Nondedeu, F., Bertrand, R., Collas, M., Capinha, C., & Grandjean, F. (2020). Niche modelling to guide conservation actions in France for the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in relation to the invasive *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater Biology*, 65, 304–315. <https://doi.org/10.1111/fwb.13422>
- QGIS Team Development. (2016). QGIS geographic information system. Open Source Geospatial Foundation Project.
- R Development Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Robinson, C. V., Uren Webster, T. M., Cable, J., James, J., & Consuegra, S. (2018). Simultaneous detection of invasive signal crayfish, endangered white-clawed crayfish and the crayfish plague pathogen using environmental DNA. *Biological Conservation*, 222, 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.04.009>
- Royle, J., Dorazio, R. (2009). *Hierarchical modeling and inference in ecology. The analysis of data from populations, metapopulations and communities*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374097-7.X0001-4>
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Saito, T., & Doi, H. (2021). A model and simulation of the influence of temperature and amplicon length on environmental DNA degradation rates: A meta-analysis approach. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.623831>
- Schabacker, J. C., Amish, S. J., Ellis, B. K., Gardner, B., Miller, D. L., Rutledge, E. A., Sepulveda, A. J., & Luikart, G. (2020). Increased eDNA detection sensitivity using a novel high-volume water sampling method. *Environmental DNA*, 2, 244–251. <https://doi.org/10.1002/edn3.63>
- Schenekar, T. (2022). The current state of eDNA research in freshwater ecosystems: Are we shifting from the developmental phase to standard application in biomonitoring? *Hydrobiologia*, 850, 1263–1282. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04891-z>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & John, R. (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Souty-Grosset, C., Holdich, D. M., Noël, P. Y., Reynolds, J. D., & Haffner, P. (2006). Atlas of crayfish in Europe. *Collection Patrimoines Naturels*, 64, 187.
- Strand, D., Holst-Jensen, A., Vijugrein, H., Edvardsen, B., Klaveness, D., Jussila, J., & Vrålstad, T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: Direct monitoring approach for aquatic environments. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95, 9–17. <https://doi.org/10.3354/dao02334>
- Takasaki, K., Aihara, H., Imanaka, T., Matsudaira, T., Tsukahara, K., Usui, A., Osaki, S., & Doi, H. (2021). Water pre-filtration methods to improve environmental DNA detection by real-time PCR and metabarcoding. *PLoS One*, 16, e0250162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250162>
- Tamooch, F., Van den Meersche, K., Meysman, F., Marwick, T. R., Borges, A. V., Merckx, R., Dehairs, F., Schmidt, S., Nyunja, J., & Bouillon, S. (2012). Distribution and origin of suspended matter and organic carbon pools in the Tana River basin, Kenya. *Biogeosciences*, 9, 2905–2920. <https://doi.org/10.5194/bg-9-2905-2012>
- Thalinger, B., Deiner, K., Harper, L. R., Rees, H. C., Blackman, R. C., Sint, D., Traugott, M., Goldberg, C. S., & Bruce, K. (2021). A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. *Environmental DNA*, 3, 823–836. <https://doi.org/10.1002/edn3.189>
- Troth, C. R., Burian, A., Mauvisseau, Q., Bulling, M., Nightingale, J., Mauvisseau, C., & Sweet, M. J. (2020). Development and application of eDNA-based tools for the conservation of white-clawed crayfish. *Science of the Total Environment*, 748, 141394. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141394>
- Troth, C. R., Sweet, M. J., Nightingale, J., & Burian, A. (2021). Seasonality, DNA degradation and spatial heterogeneity as drivers of eDNA detection dynamics. *Science of the Total Environment*, 768, 144466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144466>
- Trouilhé, M.-C., Souty-Grosset, C., Grandjean, F., & Parinet, B. (2007). Physical and chemical water requirements of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in western France. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 17, 520–538. <https://doi.org/10.1002/aqc.793>
- Valentini, A., Taberlet, P., Mlaid, C., Civate, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J. M., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25, 929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
- Van Driessche, C., Everts, T., Neyrinck, S., & Brys, R. (2022). Experimental assessment of downstream environmental DNA patterns under variable fish biomass and river discharge rates. *Environmental DNA*, 5, 102–116. <https://doi.org/10.1002/edn3.361>
- Wacker, S., Fossey, 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, 64–73. <https://doi.org/10.1002/edn3.10>
- Wang, D., Wang, S., Du, X., He, Q., Liu, Y., Wang, Z., Feng, K., Li, Y., & Deng, Y. (2022). ddPCR surpasses classical qPCR technology in quantitating bacteria and fungi in the environment. *Molecular Ecology Resources*, 22, 2587–2598. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13644>
- Wang, M., Yang, J., Gai, Z., Huo, S., Zhu, J., Li, J., Wang, R., Xing, S., Shi, G., Shi, F., & Zhang, L. (2018). Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.011>
- Wang, S., Yan, Z., Hänfling, B., Zheng, X., Wang, P., Fan, J., & Li, J. (2021). Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and



- environment. *Science of the Total Environment*, 755, 142622. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142622>
- Wood, S. A., Pochon, X., Laroche, O., von Ammon, U., Adamson, J., & Zaiko, A. (2019). A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and metabarcoding for species-specific detection in environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 19, 1407–1419. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13055>
- Wood, Z. T., Lacoursière-Roussel, A., LeBlanc, F., Trudel, M., Kinnison, M. T., Garry McBrine, C., Pavey, S. A., & Gagné, N. (2021). Spatial heterogeneity of eDNA transport improves stream assessment of threatened Salmon presence, abundance, and location. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 650717. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.650717>

How to cite this article: 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*, 5, 733–749. <https://doi.org/10.1002/edn3.435>



APPENDIX A

eDNA collection locations including field data (GPS coordinates and total volume filtered) for each of the nine sites prospecting for the "Seasonal variation" experiment, in 2021. Results are reported by month (June, August, and October) with the qPCR and ddPCR position proportion of replicates and the sensitivity of the positive signal (Mean Ct for qPCR and Mean copy number for ddPCR). A (-) symbol represents no amplification of *Austropotamobius pallipes* eDNA.

Sampling site	June 2021				August 2021				October 2021			
	Coordinates (X, Y)	Total volume filtered (mL)	qPCR positive proportion (mean Ct)	ddPCR positive proportion (mean copy number)	Total volume filtered (mL)	qPCR positive proportion (mean Ct)	ddPCR positive proportion (mean copy number)	Total volume filtered (mL)	qPCR positive proportion (mean Ct)	ddPCR positive proportion (mean copy number)	Total volume filtered (mL)	ddPCR positive proportion (mean copy number)
Milletiere	515,783, 6,672,481	1150	1 (36.45)	1 (22.23)	1300	1 (35.93)	1 (28.72)	1100	0.67 (37.31)	0.83 (9.59)	1100	0.33 (0.68)
Ribault	526,836, 6,654,425	1300	0.83 (37.67)	1 (5.44)	1400	1 (34.2)	1 (200.86)	1100	0 (-)	0.33 (0.68)	1100	0.33 (0.68)
Grand Vau	533,890, 6,644,870	1200	1 (36.91)	1 (4.4)	1600	1 (37.19)	1 (29.37)	1300	1 (38.65)	0.83 (4.72)	1300	0.83 (4.72)
Peruzin	555,412, 6,678,601	900	0.17 (41.1)	0.5 (4.18)	1600	1 (39.65)	0.83 (10.21)	1100	0.33 (38.94)	0 (-)	1100	0.33 (38.94)
Duire	509,699, 6,725,506	1100	0.33 (40.53)	0.5 (1.91)	1500	1 (38.53)	1 (18.14)	1100	0.33 (40.31)	0.67 (1.71)	1100	0.67 (1.71)
Courtineau	520,406, 6,673,441	900	0.17 (40.24)	0.17 (1.59)	1200	0.5 (39.97)	0.33 (3.32)	900	0 (-)	0 (-)	900	0 (-)
Quintaine	543,987, 6,718,225	600	0.17 (41.09)	0.5 (1.91)	700	1 (37.43)	1 (14.69)	700	0.33 (39.89)	0.17 (3.03)	700	0.33 (39.89)
Rorthe	525,665, 6,734,053	1050	0.33 (41.02)	0 (-)	1400	0.67 (40.87)	0.33 (1.495)	1100	0.33 (41.03)	0 (-)	1100	0.33 (41.03)
Brule-Choux	493,269, 6,726,406	850	1 (38.76)	1 (7.86)	1000	1 (34.83)	1 (59.55)	750	1 (38.64)	0.83 (3.26)	750	0.83 (3.26)

APPENDIX B

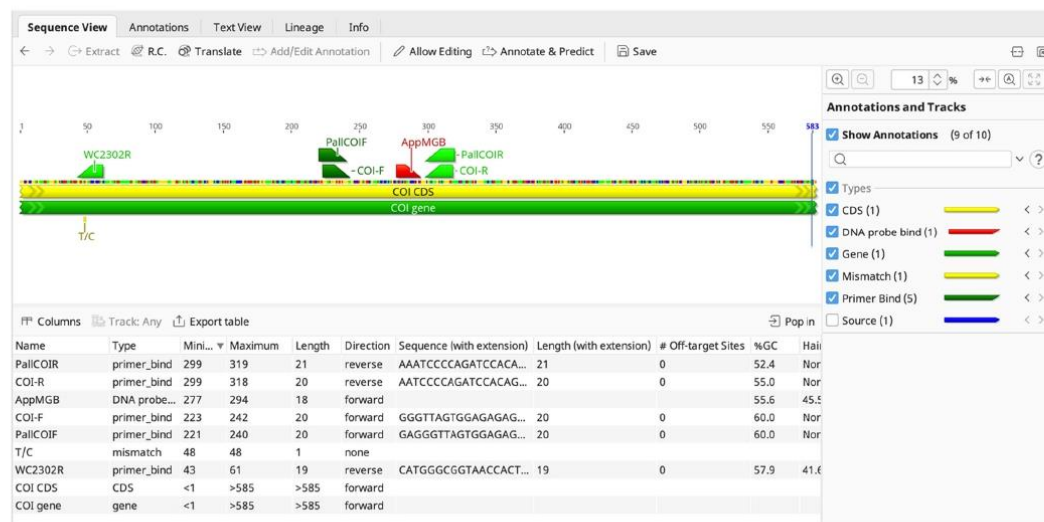
eDNA sampling data (with distance from *Austropotamobius pallipes* population) including field data (GPS coordinates, total volume filtered, temperature, and oxygen concentration) for each site prospecting for the "Spatial variation" experiment, in 2022. Results of qPCR and ddPCR are reported with the proportion of positive replicates and the sensitivity of the positive signal (Mean Ct for qPCR and Mean copy number for ddPCR, $\pm$ standard deviation). A (-) symbol represents no amplification of *Austropotamobius pallipes* eDNA.

Sampling area	Distance from <i>A. pallipes</i> population (m)	Coordinates (X, Y)	Total volume filtered (mL)	Temperature (°C)	Oxygen (mg/L)	qPCR		ddPCR	
						Proportion of positive replicates	Mean Ct $\pm$ SD	Proportion of positive replicates	Mean copy number $\pm$ SD
Le Long	0	521,646, 6,720,824	600	16.9	8.3	0.83	40.45 $\pm$ 0.75	0.83	2.34 $\pm$ 1.45
	1000	521,479, 6,721,872	900	17.8	8.4	1	40.18 $\pm$ 0.99	0.83	1.78 $\pm$ 1.42
	2300	520,537, 6,722,607	1050	17	7.5	0.33	41.16 $\pm$ 0.06	0.33	0.45 $\pm$ 0.69
Rorthe	0	525,665, 6,734,053	1800	16.3	8.9	0.83	39.72 $\pm$ 0.95	0.83	1.43 $\pm$ 0.88
	1200	524,029, 6,734,149	1800	16.7	6.5	1	37.78 $\pm$ 0.36	1	5.48 $\pm$ 2.77
	2200	523,026, 6,764,343	1800	16.9	8	0.5	41.17 $\pm$ 0.68	0.33	0.66 $\pm$ 1.14
Quintaine	0	543,987, 6,718,225	2100	20	9	0.5	40.26 $\pm$ 0.46	0.67	1.98 $\pm$ 1.76
	300	543,934, 6,717,850	2100	21.2	7.9	0.17	40.98	0	-
Duire	0	509,699, 6,725,506	1800	16.8	11.2	0.5	40.99 $\pm$ 0.91	0.5	0.44 $\pm$ 0.69
	700	510,199, 6,725,786	1800	17.4	10.7	0.33	41.3 $\pm$ 0.57	0.33	0.41 $\pm$ 0.66



APPENDIX C

Example of alignment of primers and probes developed by Atkinson et al. (2019), Troth et al. (2020), Chucholl et al. (2021), and Manfrin et al. (2022) with a DNA sequence of *Austropotamobius pallipes* (here access number AY667115), performed on Geneious Pro R10. It can be seen that only the Forward primers PallCOIF (developed by Chucholl et al., 2021) and COI-F (developed by Atkinson et al., 2019), the Reverse primers WC2302R (developed by Troth et al., 2020, 2021), PallCOIR (developed by Chucholl et al., 2021) and COI-R (developed by Atkinson et al., 2019) and the AppMGB probe (developed by Atkinson et al., 2019) were able to hybridize correctly.



APPENDIX D

Example of sequences alignment of co-occurring species in the wild with *Austropotamobius pallipes* with the PCR set (primers and probe) developed by Atkinson et al. (2019), performed on Geneious Pro R10. The species sequences were found on GenBank (in this example *Pontastacus leptodactylus*: KC789387, KC789391, KU571462, KU571463.1, KU603529; *Procambarus clarkii*: KP976367, KP976368, KT959364.1, MF170535, MF170536, and *Pacifastacus leniusculus*: ON059119, ON059120). Here, only the Reverse primer and the probe of the set hybridize with 2 sequences (of *P. leptodactylus*), highlighting 2 mismatches (in yellow) for the probe and 3 mismatches for the reverse primer.



Annexe 5 : Poster présenté à l’occasion des doctoriales de la biodiversité 2022 organisé par Biosena à la réserve du Ornithologique Teich et lors du DIPEE (Dispositifs de Partenariat en Ecologie et Environnement) 2022 à Poitiers.

First record of a rusty crayfish *Faxonius rusticus* in France

Maud Laffitte¹, Martine Guilmet², Thierry Andrieu³, Nicolas Poulet³, Théo Duperray¹, Carine Delaunay¹, Marc Collas⁵, Bouziane Moumen¹ and Frédéric Grandjean¹

¹ Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions – UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, Bâtiment B8-835, 6, rue Michel Brunet, TSA 51106, 86073, Poitiers, France

² Fédération de pêche de l'Aveyron, Moulin de la Gascardie, 12000 Rodez, France

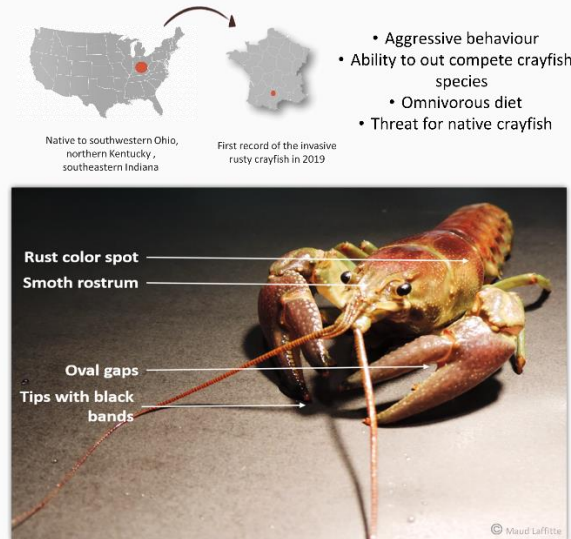
³ Office Français de la Biodiversité, 2 Allée du Pr Camille Soula, 31400 Toulouse

⁴ Saules & Eaux, Lapra, 07 310 - Intres

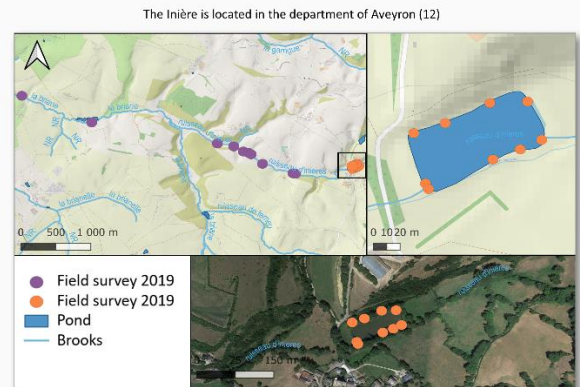
⁵ Office Français de la Biodiversité, Service départemental des Vosges, Direction régionale du Grand Est, 22-26 Avenue Dutac - 88026 Epinal cedex

Background : The situation of native crayfish in France has become worrying in recent decades due to several factors including habitat destruction also the introduction of non-native crayfish species. Most come from the North American continent and are healthy carriers of *Aphanomyces astaci*, an oomycete responsible for numerous local extinctions of native crayfish populations in Europe. Today, six crayfish species of North American origin are present in the wild in France: *Faxonius limosus*, *Pacifastacus leniusculus*, *Procambarus clarkii*, *Faxonius juvenilis*, *Faxonius immunis*, *Procambarus virginialis*. In this paper, we report the first record of the invasive rusty crayfish *Faxonius rusticus* in France and in Europe. The species is considered as one of the most invasive crayfish and represent a real threat for local biodiversity particularly towards the native white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* which could share similar habitat in the head of water systems.

Why is *F. rusticus* so invasive



Field surveys

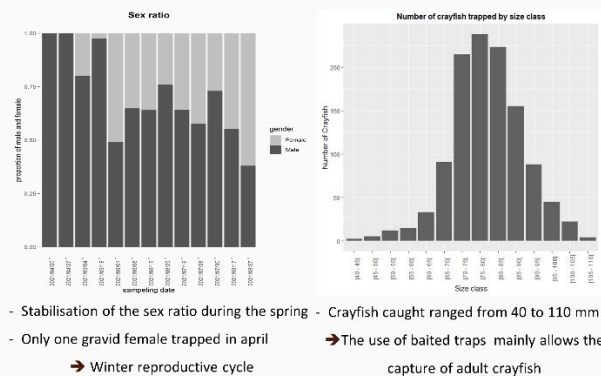


Two survey campaigns :

- September-October 2019 in the Inière brook and its tributary
- April-August 2021 in the Inière pond

→ **847 individuals trapped** during the two-survey sessions, 37 the first year in the brooks and 817 in the pond the second year

Population description



Prevalence of the crayfish plague

- **100% of prevalence** in the Inière brook and its tributary in 2019
- **High level of infection** between A5-A6

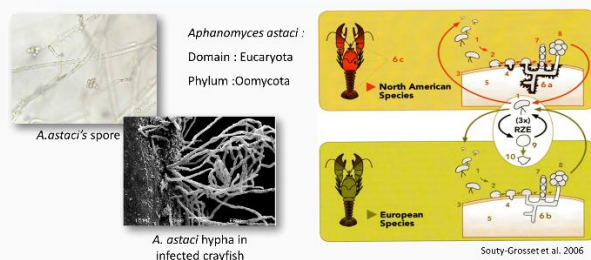
A new *Aphanomyces astaci* strain ?

	Aast 2	Aast 4	Aast 6	Aast 7	Aast 9	Aast 10	Aa 12	Aa 13	Aa 14
Fr INIE 4	142-148	87-89	148	204-215	164-168-182	132-138	226-240	202	248
Fr INIE 6	142	87	148	215	164-182	ND	226-240	202	248
Souche B <i>P. leniusculus</i>	148	87	148	215	164-168	132	226-240	202	248

Grandjean et al. 2014

→ Microsatellites markers reveal the presence of at least two strains close to type B reflecting a **co-infection**

What is the crayfish plague



Take home message

- **First report** of *Faxonius rusticus* in France and in Europe
- **Real threat for local biodiversity** and particularly for native white-clawed crayfish
- **Carrier of the crayfish plague**, one of the most virulent pathogens known for crayfish
- Urgent action should be taken to eradicate this species considered as **one of the most invasive crayfish species**



Find this poster



GRAND POITIERS
Communauté urbaine
grandpoitiers.fr



Résumé :

Les écosystèmes d'eau douce abritent une biodiversité exceptionnelle par rapport à la surface limitée qu'ils occupent, ce qui les rend particulièrement vulnérables, vis-à-vis de l'introduction d'espèces exotiques. Les écrevisses exotiques envahissantes d'origine américaine en sont le parfait exemple d'autant plus qu'elles sont porteuses saines d'un oomycète pathogène, *Aphanomyces astaci*, impliqués dans de nombreuses épizooties d'écrevisses autochtones en Europe. Cette étude vise à réactualiser l'aire de distribution des populations d'écrevisses nord-américaines en France. La caractérisation de la présence en milieu naturel de l'écrevisse à tâches rouges, *Faxonius rusticus* sur l'Aveyron (non répertoriée en Europe) porteuse d'une souche spécifique d'Aphanomycose est considérée comme fortement préoccupante, car hautement invasive. Cette étude évalue également le rôle de ces écrevisses envahissantes en tant que réservoirs d'*A. astaci*. Nous avons d'abord démontré que *Procambarus clarkii* et *Pacifastacus leniusculus* sont les principaux vecteurs d'*A. astaci* en France, jouant un rôle crucial en tant que réservoirs du pathogène et à l'origine de nombreuses épizooties dans les peuplements d'écrevisses à pattes blanches. Le suivi des prévalences dans le temps révèle également une dynamique spatio-temporelle à l'échelle intrapopulationnelle. La présence de populations sympatriques d'espèces nord-américaines au sein de mêmes stations, a révélé des transferts interspécifiques de souches d '*A. astaci*. Ainsi, une souche fortement virulente (en termes de sporulation et d'effet sur l'hôte naïf) pourrait se propager à l'échelle du territoire par ses transferts interspécifiques. À terme, elle pourrait engendrer de plus forts événements de mortalité au sein des populations d'écrevisses natives. La caractérisation des différentes souches d'*A. astaci* est donc cruciale pour mieux comprendre les dynamiques épidémiques du pathogène dans les écosystèmes. Afin d'améliorer la précision de ces études, de nouveaux microsatellites ont été développés pour détecter la variabilité intragroupe au sein des souches d'*A. astaci*. Ces outils permettent non seulement de différencier les génotypes du pathogène, mais aussi de comprendre l'origine des épidémies et de suivre leur propagation dans les écosystèmes affectés. Il a été montré des populations d'écrevisses natives dites résistantes à des événements de peste, la caractérisation des gènes impliqués dans la réponse immunitaire semble une étape incontournable pour développer des stratégies de conservation plus efficaces. Des efforts en matière de stratégies de gestion des espèces exotiques envahissantes sont également essentiels afin de préserver l'intégrité des écosystèmes aquatiques dans leur ensemble.

Mots-clés : Invasions biologiques, écrevisses, *Aphanomyces astaci*, prévalence, épidémiologie, variabilité génétique

