



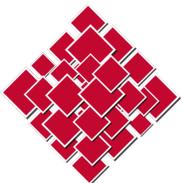
**PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie

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

CrableuDNAInv



École Pratique
des Hautes Études



CENTRE D'ÉCOLOGIE
FONCTIONNELLE
& ÉVOLUTIVE



MUSE

MONTPELLIER UNIVERSITÉ D'EXCELLENCE



**PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie

L'équipe « CrabeBleuDNAinv »

Laetitia Cornil
Chargée de
mission

CEFE-EPHE

MARBEC-IRD

Claude Miaud

Stéphanie Manel

Régis Hocdé



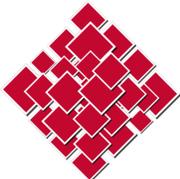
Erwan Delrieu-Trottin

Véronique Arnal

Expertises:

- Ecologie
- ADN environnemental
- Génétique
- Terrain-Echantillonnage
- Expérimentation
- Laboratoire
- Bio-informatique
- Statistiques
- Conservation
- Communication

...



École Pratique
des Hautes Études





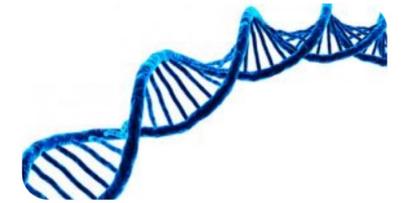
**PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE**

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Développer une méthode de **détection précoce** et de **suivi** dans le temps du crabe bleu

Travail sur l'ADN environnemental (ADNe) = ADN « libre » dans l'eau; ADN intracellulaire/extracellulaire





**PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE**

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Développer une méthode de **détection précoce** et de **suivi** dans le temps du crabe bleu

Travail sur l'ADN environnemental (ADNe) = ADN « libre » dans l'eau; ADN intracellulaire/extracellulaire



→ Etudes des organismes présents en un lieu donné à partir de l'ADN présent dans l'environnement

Principe du Barcoding : identification moléculaire à l'espèce à partir d'une courte portion d'ADN



**PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE**

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Développer une méthode de **détection précoce** et de **suivi** dans le temps du crabe bleu

Travail sur l'ADN environnemental (ADNe) = ADN « libre » dans l'eau

Pour l'échantillonner ? → Filtration





**PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE**

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Développer une méthode de **détection précoce** et de **suivi** dans le temps du crabe bleu

Travail sur l'ADN environnemental (ADNe) = ADN « libre » dans l'eau

Pour l'échantillonner ? → Filtration



**Extraction ADNe
à partir des filtres**

**Amplification ADN avec des
amorces « universelles »**
Metabarcoding de l'ADNe

**Amplification ADN avec des
amorces « spécifiques »**
Barcoding de l'ADNe
→ Permet de s'affranchir du
séquençage





Développer une méthode de **détection précoce** et de **suivi** dans le temps du crabe bleu

Travail sur l'ADN environnemental (ADNe) = ADN « libre » dans l'eau

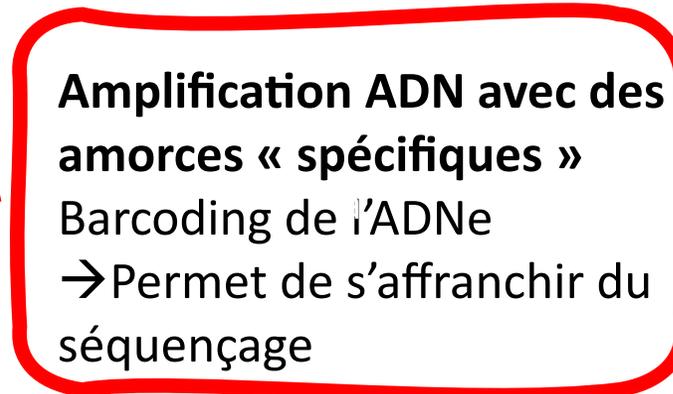
Pour l'échantillonner ? → Filtration



**Extraction ADNe
à partir des filtres**

**Amplification ADN avec des
amorces « universelles »**
Metabarcoding de l'ADNe

**Amplification ADN avec des
amorces « spécifiques »**
Barcoding de l'ADNe
→ Permet de s'affranchir du
séquençage





**PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE**

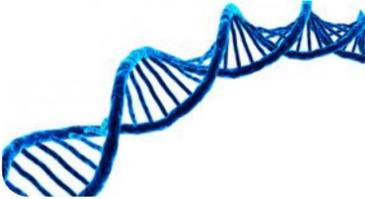
*Liberté
Égalité
Fraternité*

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie

Développer une méthode de **détection précoce** et de **suivi** dans le temps du crabe bleu

Travail sur l'ADN environnemental (ADNe) = ADN « libre » dans l'eau

Pour l'échantillonner ? → Filtration



**Extraction ADNe
à partir des filtres**



**Amplification ADN avec des
amorces « universelles »**
Metabarcoding de l'ADNe

**Amplification ADN avec des
amorces « spécifiques »**
Barcoding de l'ADNe
→ Permet de s'affranchir du
séquençage



**Détection potentielle de
l'espèce d'intérêt**
Quantification ADN





PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Le projet CrableuDNAInv :

- 1) Développement d'amorces pour obtenir un code barre spécifique *C. sapidus* et standardisation du protocole en laboratoire ([Actions 1-2-3](#))
- 2) Evaluer les conditions de détectabilité de *C. sapidus* : corrélation entre concentrations ADNe et densités de crabes ([Action 4](#))
- 3) Suivi de plusieurs zones cibles ([Action 5](#))



1) Développement d'amorces pour obtenir un code barre spécifique C. *sapidus* et standardisation du protocole en laboratoire - Mars- juillet 2022

❖ **Travail sur les amorces - pour éviter de faux positifs et de faux négatifs**

❖ **Tests sur tissus dans un premier temps puis sur filtres ADNe**

❖ **Travail sur la méthode d'amplification – différentes pistes explorées
au laboratoire**

- PCR quantitative avec un intercalant fluorescent (SYBRGreen)

- PCR quantitative avec Sonde

- droplet digital PCR (test collaboration avec le Laboratoire Évolution et Diversité
Biologique de Toulouse)



**PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE**

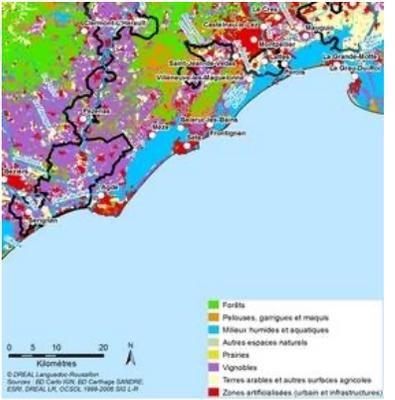
*Liberté
Égalité
Fraternité*

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie



2) Evaluer les conditions de détectabilité de *C. sapidus* – Juin - Décembre 2022

Prélèvements



min: 18 spécimens
crabe bleu
Callinectes sapidus
(début juin 2022)

Expérimentation en aquarium



**Plateforme EXAAQT
EXpérimentation Animale
AQuaTique de Montpellier**

Plan d'expérimentation

4 bacs de 220 L
1 bac témoin vide
3 bacs avec individus (séparés pour éviter les combats) avec 3 concentrations / sur une échelle de progression géométrique de raison 2: 2, 4, 8

= 12 filtrations eDNA/

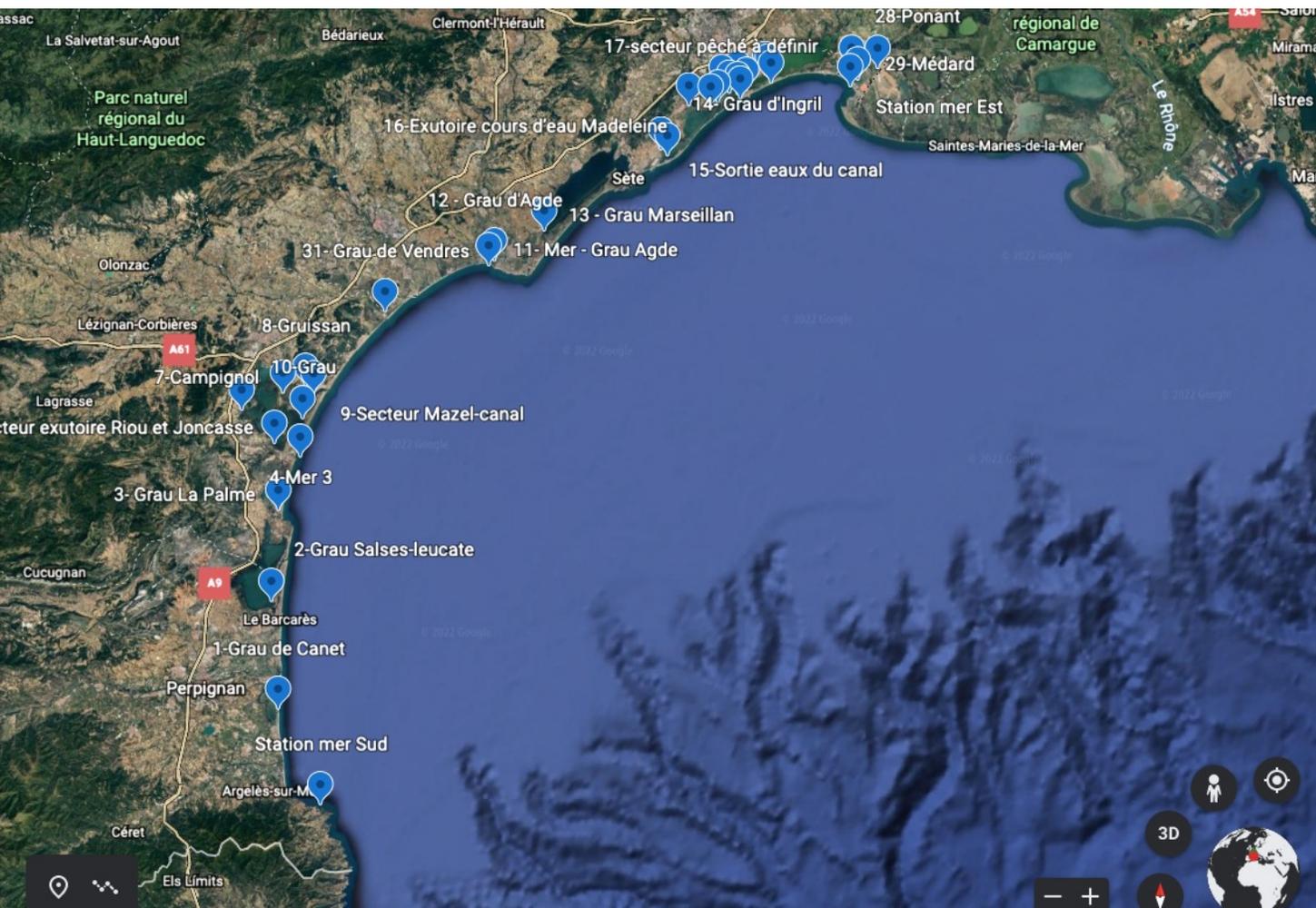


Seuil de détection





3) Suivi de plusieurs zones cibles – Juin - Décembre 2023



Pré-visualisation des points potentiels
(concertation avec
Nathalie Barre, Conservatoire Espaces
Naturels Occitanie & **Laetitia Cornil**
DREAL)

30 sites en milieu lagunaire;
2 répliqués par site,
soit un total de 60 échantillons eDNA

→ Carte de détection du crabe
bleu en Occitanie en 2023

1-Grau de Canet	1
2-Grau Salses-leucate	2
3- Grau La Palme	3
4-Mer 3	4
5-Secteur exutoire Riou et Joncasse	5
6-Secteur exutoire de la Berre	6
7-Campagnol	7
8-Gruissan	8
9-Secteur Mazel-canal	9
10-Grau	10
11- Mer - Grau Agde	11
12 - Grau d'Agde	12
13 - Grau Marseillan	13
15-Sortie eaux du canal	14
14- Grau d'Ingril	15
16-Exutoire cours d'eau Madeleine	16

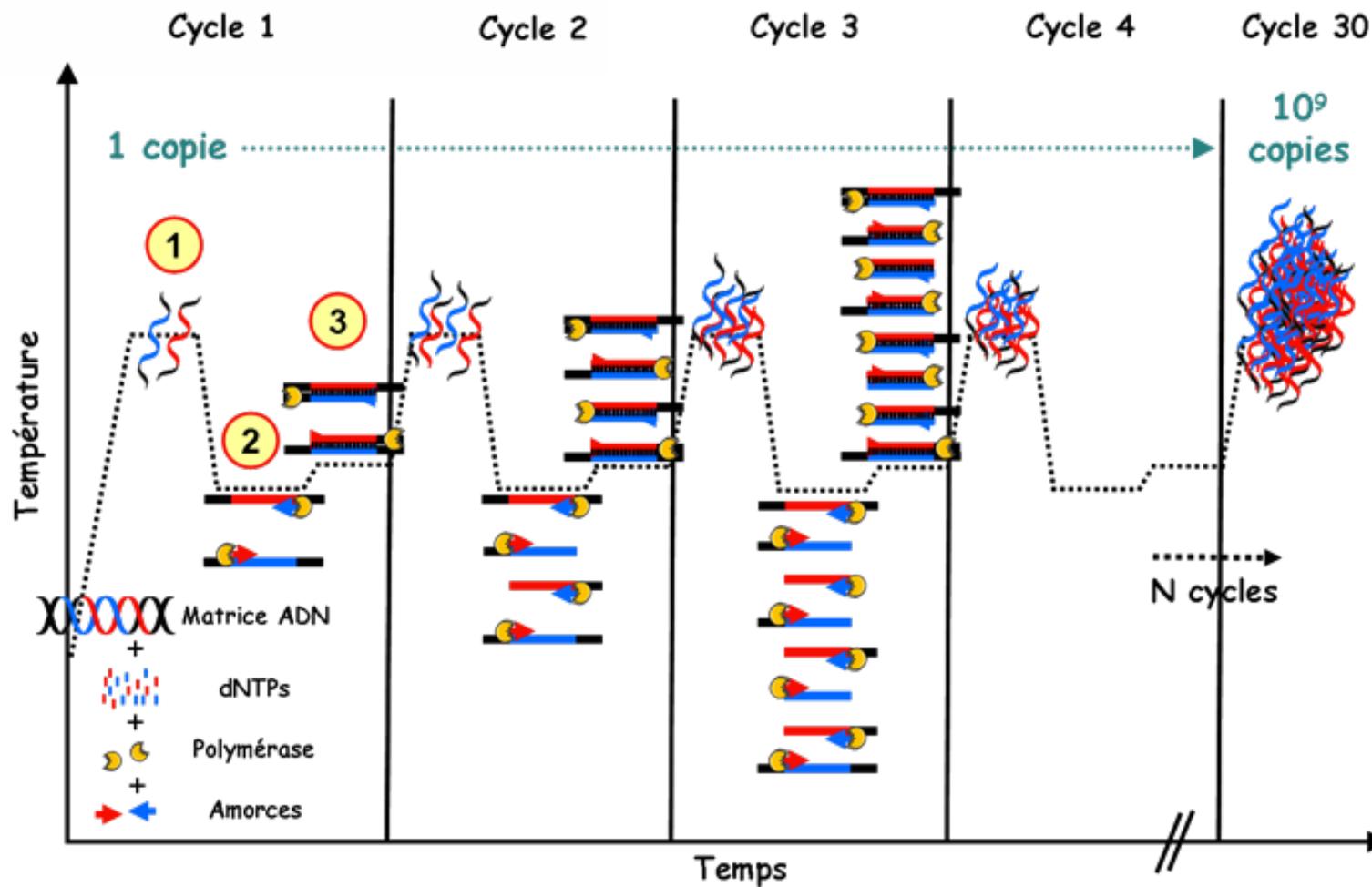
17-secteur pêché à définir	17
18-Pierre Blanche	18
19 -Grau du Prévost	19
20- MER-2	20
21 -Canal + passes	21
22-Exutoire de la Mosson	22
23-Canal de palavas	23
24-Arrivée d'eau du Lez	24
25 -MER - 1	25
26- Grau de Carnon	26
27-Passe aux cabanes de Pérols	27
28-Ponant	28
29-Médard	29
30-Marette	30
31- Grau de Vendres	31
Station mer Sud	32



PRÉFET DE LA RÉGION OCCITANIE

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie





**PRÉFET
DE LA RÉGION
OCCITANIE**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Direction régionale de l'environnement,
de l'aménagement et du logement
Occitanie

Résultats Projet 2020-2021 : CrabeeDNA (C. Miaud, S. Manel, V. Arnal, Stagiaire)



- Tissus : individu male et un femelle (pêcheurs Saint Cyprien, avril 2021)
- Un Barcode mt (Cytb) spécifique du crabe bleu qui détecte des individus crabe bleu mais pas eDNA (q-PCR SPYGEN)
- 16 échantillons eDNA disponibles

14 eDNA (6 thau, 8 Canet) + 2 biodiversarium Banyuls sur mer (Pascal ROMANS)



Coll Canet: Roland Mivière ;
pêcheur Jean-Claude Pons)