

## Contributions de l'ADN environnemental à la conservation de la biodiversité.

### De la capacité des biofilms aquatiques à capter l'ADN environnemental pour détecter l'Écrevisse à pattes blanches : résultats préliminaires.

Lang Iris<sup>1,2</sup>, Marc Daniel<sup>1,3</sup> et Michaux Johan<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Conservatoire d'espaces naturels d'Occitanie, 26 Allée de Mycènes, 34000 Montpellier, France. Emails : iris.lang@cen-occitanie.org / daniel.marc@cen-occitanie.org

<sup>2</sup> École d'Ingénieurs de Purpan, 75 Voie du TOEC, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 3, France.

<sup>3</sup> Université Jean Jaurès GEODE UMR5602, 5 allée Antonio Machado, Toulouse, France.

<sup>4</sup> GECOLAB, Université de Liège, Chemin de la Vallée, 4, Institut de Botanique (Bât. 22), 4000 Liège, Belgique. Email : johan.michaux@uliege.be

**Mots clefs :** biofilms aquatiques ; metabarcoding ; ADNe ; *Austropotamobius pallipes*

#### Résumé :

Parmi les différentes techniques utilisées pour l'étude de la biodiversité en vue de sa conservation, l'ADN environnemental (ADNe) est souvent présenté comme un outil facilitant les opérations de terrain et simplifiant les prospections. Les prélèvements et analyses sont réalisés sur diverses matrices comme l'eau, le terreau ou les fèces. L'usage de l'ADNe est apprécié pour son caractère non invasif et rapide à mettre en œuvre. Son utilisation se démocratise et tend à se systématiser en complément des techniques plus traditionnelles. Nous faisons ici un bilan des opérations que nous avons menées, avec présentation des résultats obtenus et leur traduction en actions de gestion. Ces exemples concernent notamment le Desman des Pyrénées, la Loutre d'Europe, des espèces exotiques envahissantes (Grenouille taureau), les Naiades (*Margaritifera* spp.) et des coléoptères (bousiers et Taupin violacé). Nous présentons aussi une étude en cours sur la diversité de la fonge et de la faune des sols forestiers. Enfin, nous rendons compte de résultats inédits sur l'analyse moléculaire d'une matrice moins connue : les biofilms aquatiques. Ces derniers, constitués par des communautés de micro-organismes tels que les bactéries, les virus, les micro-algues et les protozoaires, se développent naturellement sur les surfaces immergées auxquelles ils sont fixés par des exopolysaccharides qu'ils produisent. La capacité des biofilms à capter l'ADNe de macro-invertébrés benthiques et de poissons du milieu prélevés a été démontrée. C'est la première fois que cela est testé pour la détection et le suivi des Écrevisses à pattes blanches en cours d'eau.

#### Abstract :

Among the various techniques used to study biodiversity with a view to its conservation, environmental DNA (eDNA) is often presented as a tool that facilitates field operations and simplifies surveys. Samples and analyses are taken from various matrices such as

water, soil or faeces. eDNA is appreciated for being non-invasive and quick to use. Its use is becoming more widespread and more systematic as a complement to more traditional techniques. Here we present an overview of the operations we have carried out, with a presentation of the results obtained and their translation into management actions. Examples include the Pyrenean Desman, the European Otter, invasive alien species (Bullfrog), Naiads (*Margaritifera* spp.) and beetles (dung beetles and the Violet click beetle). We also present an ongoing study on the diversity of fungi and fauna in forest soils. Finally, we report unpublished results on the molecular analysis of a lesser-known matrix: aquatic biofilms. Finally, we report unpublished results on the molecular analysis of a lesser-known matrix: aquatic biofilms. Biofilms, made up of communities of microorganisms such as bacteria, viruses, microalgae and protozoa, develop naturally on the submerged surfaces to which they are attached thanks to the exopolysaccharides they produce. The ability of biofilms to capture eDNA from benthic macro-invertebrates and fish in the environment sampled has been demonstrated. This is the first time that this has been tested for the detection and monitoring of white-clawed crayfish in rivers.

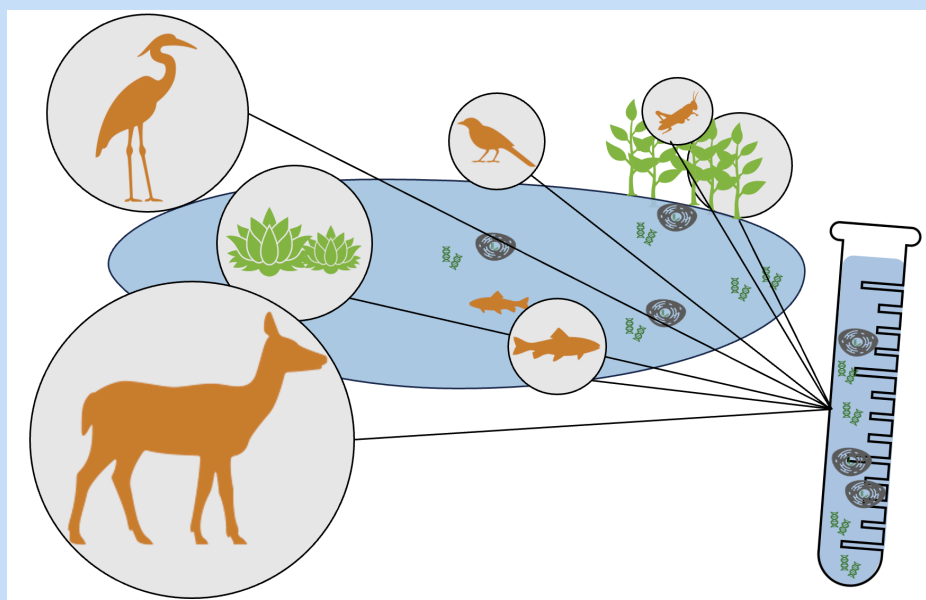
### 1. Introduction

La connaissance, comme point de départ pour la conservation de la biodiversité, est une étape incontournable que les conservatoires d'espaces naturels ont intégrée dans leur ligne de conduite Connaître, Protéger, Gérer, Valoriser, Accompagner (CPGVA). Le Conservatoire d'espaces naturels d'Occitanie (CEN Occitanie) œuvre depuis plus de 30 ans en faveur du patrimoine naturel et mène de nombreuses études sur la biodiversité afin d'assurer une meilleure action conservatoire et un meilleur accompagnement des politiques publiques. Pour mener ces études, de nombreux outils sont disponibles, plus ou moins invasifs et destructeurs pour la biodiversité, et plus ou moins chronophage et coûteux : la détermination morphologique impliquant ou non la capture ou le

piégeage d'individus. Les méthodes de prospection permettant de détecter des espèces, même lorsqu'elles sont présentes en faible abondance, ont longtemps été invasives voire destructrices, y compris pour les espèces ciblées (Ranius & Jansson, 2002). D'autres méthodes, s'appuyant sur la bio-écoacoustique ou la recherche d'indices de présence (ex : poils, fèces, empreintes), ont permis de limiter l'impact sur les populations étudiées (Andersen et al., 2021; Arguel et al., 2022; Mosconi et al., 2017; Poncet et al., 2021). Les méthodes basées sur l'ADN environnemental (ADNe) apportent une meilleure réponse à ce problème, en permettant la détection d'organismes ciblés sans les capturer, et en réduisant les perturbations sur l'écosystème avec des campagnes de terrain moins chronophages (Barnes & Turner, 2016; Poulet & Basilico, 2019; Encart 1).

### Encart 1. L'ADN environnemental

L'ADNe est de l'ADN contenu dans une cellule ou sous forme de fragment libre que l'on retrouve dans l'environnement (Figure 1). Il n'est donc pas forcément collecté directement sur l'individu, mais à travers différentes matrices environnementales telles que l'eau, le sol, les fèces, les sédiments ou les biofilms (Poulet & Basilico, 2019).



**Figure 1 :** Représentation schématique de molécules d'ADN environnemental contenues dans des cellules ou sous forme de fragments libres, prélevées dans un milieu aquatique.

L'ADN contenu dans ces matrices est ensuite extrait en laboratoire dans une salle dédiée, où un protocole de stérilisation aux rayons UV est appliqué afin d'éviter tout risque de contamination. L'extraction se fait suivant un protocole défini par le laboratoire, la plupart du temps en utilisant un kit commercial.

Deux approches complémentaires peuvent alors être utilisées :

- Une approche permettant la recherche d'une espèce cible bien définie (*barcoding*) à partir d'ADNe. Pour atteindre cet objectif, un gène d'intérêt est amplifié grâce à des amorces spécifiques à l'espèce cible (en général par PCR quantitative en temps réel – qPCR ou PCR digitales – ddPCR) par un thermocycleur spécifique. Ces analyses sont effectuées dans des conditions optimales de température.
- Une approche permettant un screening plus global de groupes d'organismes présents dans le milieu étudié (*metabarcoding*). Pour atteindre cet objectif, la technique de séquençage à haut débit (next-generation sequencing – NGS) permet l'acquisition simultanée de données relatives à des millions de fragments d'ADN, qui sont ensuite comparés aux séquences de bases de données de

référence avec des seuils de similarité. Le traitement bioinformatique des résultats permet alors de caractériser la biodiversité par obtention d'une liste de taxa (richesse spécifique, estimation d'abondance, analyse de régime alimentaire...).

En résumé, selon l'objectif de l'étude, plusieurs approches peuvent être envisagées : le *barcoding* permet de rechercher la présence (ou l'absence) d'une espèce (Arias et al., 2016; Gillet et al., 2016), voire de caractériser la variabilité intraspécifique, tandis que le *metabarcoding* fait office d'inventaire en caractérisant la biodiversité au niveau spécifique (Biffi et al., 2017).

Ces approches sont particulièrement intéressantes pour les études de présence/absence lorsqu'il s'agit d'espèces fragiles et menacées. En ce qui concerne les organismes

aquatiques, le *barcoding* de l'ADNe ou le *metabarcoding* sont généralement effectués à partir de sédiments ou d'échantillons d'eau filtrée (Poulet & Basilico, 2019; Encart 2)

## Encart 2. Exemples de contributions et travaux du CEN Occitanie par type de matrices environnementales

### 1.1. Matrice eau

Le CEN Occitanie a contribué à des études de l'application des méthodes ADNe pour la détection de mammifères semi-aquatiques en participant notamment à la récolte d'échantillons sur le terrain (Steinmetz et al., 2018). Usuellement, la recherche d'indices de présence (e.g. les restes de repas, les fèces ou d'autres traces) est privilégiée pour le suivi de ces taxons, dont la détection est très variable du fait d'un fort biais dû à l'observateur (détection et détermination). Pourtant, la connaissance et le suivi de leur répartition sont essentiels, d'autant que plusieurs de ces espèces font l'objet de plans nationaux d'actions (PNA), telles que la Loutre d'Europe (*Lutra lutra*), le Vison d'Europe (*Musteola lutreola*) et le Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*). Le *metabarcoding* réalisé avec un couple d'amorces universel pour les mammifères permet d'avoir une information de présence-absence pour chaque taxon. Cette étude montre que la méthode ADNe fonctionnait surtout pour les espèces présentes en forte densité dans le milieu ou laissant de nombreux indices de présence facilement identifiables (e.g. Ragondin). La pertinence de son utilisation pour les mammifères est donc limitée. La détection des espèces plus discrètes reste très faible avec ces approches de *metabarcoding*, notamment pour le Desman des Pyrénées, pour lequel le CEN Occitanie poursuit les études pour améliorer la technique dans le cadre d'une thèse CIFRE. D'autres approches basées sur la technologie des PCR digitales donnent maintenant des résultats très prometteurs.

L'utilisation de l'ADNe s'est montrée particulièrement efficace pour la recherche de populations d'espèces patrimoniales de bivalves dulçaquicoles. Ainsi, des populations de Grande Mulette (*Margaritifera auricularia*) ont été découvertes dans l'Arros (32) puis confirmées par des observations plongée, ce qui a notamment interrompu des travaux prévus en rivière et de classer le site de découverte en espace naturel sensible (ENS) (Prié, 2019; Prié & Néri, 2016). La Mulette perlière (*Margaritifera margaritifera*) a également fait l'objet de recherche par ADNe, ce qui a validé la disparition d'une population historique dans l'Agout (81) (Prié, 2020).

La détection précoce d'espèces exotiques envahissantes (EEE) est une application pertinente de l'ADNe, qui est notamment mobilisée par le CEN Occitanie dans le cadre de la Stratégie régionale relative aux EEE Faune d'Occitanie (Gilliot & Lang, 2021). Le CEN Occitanie a récemment réalisé des prélèvements d'eau au nord de Toulouse dans le cadre dans une démarche préventive suite à une alerte donnée par un bureau d'études. L'espèce cible du *barcoding* était la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*), reconnue au niveau mondial comme l'une des 100 espèces exotiques envahissantes les plus néfastes au monde. Les résultats des analyses ADNe, combinées à des prospections classiques ont confirmé l'absence de l'espèce, jusque-là inconnue dans la région. L'ADNe est amené à être utilisé à nouveau dans le cadre des actions de prévention menées par le CEN Occitanie sur le Xénope lisse (*Xenopus laevis*) notamment.

### 1.2. Matrice sol

À travers le projet InsylBioS dont la deuxième partie est en cours, le CEN Occitanie contribue, par *metabarcoding*, à la caractérisation de la diversité de la fonge et de la faune du sol dans des contextes de peuplements forestiers avec des historiques de gestion contrastés (Emberger et al., 2023). Ces travaux pourront notamment déboucher sur la création d'indices permettant de caractériser le fonctionnement du sol et en particulier la productivité, et de créer un outil de diagnostic de sensibilité de la biodiversité des sols. Ici, l'utilisation de l'ADNe contribue à l'amélioration de la compréhension des liens entre gestion forestière et biodiversité des sols, pour une meilleure prise en compte de la vie des sols par les forestiers.

### 1.3. Matrice fèces

Comme évoqué précédemment, il est des taxa tels que la Loutre d'Europe, pour lesquels l'ADNe n'est pas nécessaire en soi pour conclure à la présence-absence de l'espèce, celle-ci étant aisément identifiable par les épreintes laissées par les individus. Cependant, les prélèvements de fèces et leur analyse génétique permet d'en savoir plus sur les dynamiques de populations des espèces, tout en les impactant plus faiblement que par des prélèvements directs sur les individus. Dans le cas de la Loutre d'Europe, les études auxquelles le CEN Occitanie a contribué, ont mis en évidence un

brassage génétique entre populations, et d'identifier les causes du déclin de l'espèce telles que l'agriculture intensive – et donc la pollution et la perte de qualité d'habitat – plutôt que le manque de continuités écologiques (Couturier et al., 2023 ; Pigneur et al., 2018, 2019). Ces travaux ont justifié des changements de priorités dans les actions menées dans le PNA Loutre.

L'étude de l'ADNe contenu dans les fèces du Desman des Pyrénées a amélioré les connaissances sur la répartition de l'espèce, sur l'utilisation de l'espace par les individus, sur le régime alimentaire et sur la structuration génétique des populations en France (Biffi et al., 2016, 2017 ; Charbonnel et al., 2016 ; Gillet et al., 2016, 2017 ; Lim et al., 2021 – Liste non exhaustive de travaux auxquels le CEN Occitanie est affilié). En conséquence, l'action publique est désormais adaptée dans chaque zone hydrologique des Pyrénées, dans le cadre d'une gestion cohérente de l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce. Des livrets techniques de recommandations pour la prise en compte concrète du Desman des Pyrénées ont été rédigés par le CEN Occitanie. Le suivi génétique des populations associé aux prospections de terrain ont mené à inscrire l'espèce comme Vulnérable (VU) dans la liste rouge des mammifères de France métropolitaine à partir de 2017.

L'ADNe est de plus en plus utilisé par les gestionnaires d'espaces naturels depuis les deux dernières décennies. Au CEN Occitanie, les travaux concernent une diversité de groupes taxonomiques (coléoptères, mammifères semi-aquatiques, bivalves d'eau douce, fonge et faune des sols...), avec pour certains des techniques dont l'efficacité n'est plus à prouver, et d'autres méthodes améliorables (Tableau 1).

**Tableau 1 :** Synthèse des techniques fonctionnelles (case verte) ou non (case rouge) par groupe taxonomique (fonge, bivalves, mammifères semi-aquatiques, coléoptères) et par type de matrice environnementale (sol, eau, fèces) mises en œuvre dans les travaux du CEN Occitanie

	Eau	Fèces	Sol
Fonge et faune du sol	Non applicable (NA)	NA	
Bivalves		-	-
Mammifères semi-aquatiques	Que pour les mammifères présents en forte densité, ou avec des techniques en cours de développement (ddPCR)		-
Coléoptères	-		

L'Écrevisse à pattes blanches *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), originaire du sud-ouest de l'Europe, est aujourd'hui une espèce menacée. Le déclin récent des populations dans son aire de répartition d'origine est principalement dû aux épidémies de peste de l'écrevisse, à la pollution, à l'évolution des conditions environnementales et à la perte d'habitat dans le cadre du changement global (Haddaway et al., 2015; Jussila et al., 2021). La perte des populations indigènes s'accompagne de l'expansion d'espèces exotiques envahissantes, en particulier l'Écrevisse signal, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) (Grandjean et al., 2017). En conséquence, l'Écrevisse à pattes blanches ne persiste qu'en tête de bassins versants (Trouilhé et al., 2007). Le dernier inventaire coordonné au niveau national d'*A. pallipes* en France date de 2014 (Collas et al., 2015). La connaissance de la répartition de l'espèce en France est mise à jour par des inventaires locaux chronophages, qui ne sont pas coordonnés à grande échelle. Globalement, le déclin de son aire de répartition est estimé de 50 à 80 % (Poupelin et al., 2019). Cependant, de nouvelles populations insoupçonnées sont également découvertes lors des inventaires. Une évaluation de la répartition de l'espèce est nécessaire pour pouvoir mettre en œuvre des mesures de gestion et de conservation appropriées.

Cependant, les nombreuses tentatives de développement de méthodes de détection des écrevisses *in situ* se sont

révélées peu concluantes, notamment pour *A. pallipes* (Manfrin et al., 2022) (mais voir les développements récents dans l'eau et les sédiments, Dawkins et al., 2024; Troth et al., 2020; Trujillo-Gonzalez et al., 2021). Les volumes d'eau à filtrer nécessaires pour détecter l'espèce sont souvent importants (500 ml à plus de 14 L; Agersnap et al., 2017; Baudry et al., 2023) ou s'ils sont plus faibles (i.e. 15 à 40 ml; Tréguier et al., 2014), des réplicats sont alors nécessaires, allongeant le temps passé sur le terrain (en général au moins 30 minutes par répétition). La carapace chitineuse des écrevisses pourrait expliquer un faible relargage d'ADN libre dans l'eau à l'inverse d'espèces produisant beaucoup de mucus (mollusques, amphibiens, poissons) ou de cellules épithéliales (Mammifères). Cela peut également être renforcé par les mœurs nocturnes de l'espèce. Si *A. pallipes* est prospectée de nuit lors des inventaires naturalistes, les prélèvements d'eau sont plus souvent réalisés de jour. La saison semble également être déterminante avec des détections plus fréquentes à la fin du printemps et en période estivale, quand l'espèce est plus active (Baudry et al., 2023). Il a été démontré que d'autres matrices agissent comme des capteurs naturels d'ADNe : c'est le cas des biofilms aquatiques, qui se développent à l'interface entre les sédiments et l'eau (Akbari et al., 2016) et, à notre connaissance, l'ADNe d'écrevisses n'a pas encore été recherché dans ce type de matrice.

Les biofilms aquatiques sont formés de communautés de micro-organismes tels que des bactéries, des virus, des micro-algues et des protozoaires qui se développent naturellement sur des surfaces immergées. Les biofilms sont attachés à leur substrat par les exopolysaccharides (EPS) qu'ils produisent (Wolfaardt et al., 1998). Les communautés qui composent les biofilms sont directement influencées par les caractéristiques du lieu où le biofilm se forme et répondent rapidement aux conditions environnementales (pH, température, nutriments, oxygène, polluants, etc. ; Battin et al., 2004). C'est pourquoi les biofilms sont des bio-indicateurs pertinents de l'état de santé des milieux aquatiques et de leur bon fonctionnement (Akbari et al., 2016). La capacité des biofilms à capter l'ADNe a été récemment démontrée, permettant d'analyser la structure et la composition des communautés de diatomées, de macro-invertébrés et de poissons dans l'environnement sans avoir recours aux inventaires traditionnels (détermination par approche morphologique), plus longs et plus coûteux (Rivera et al., 2020). Cette méthode est également plus rapide que la collecte d'ADNe par filtration de l'eau. L'analyse moléculaire des biofilms est donc un outil efficace à développer pour le suivi du fonctionnement et de l'état de santé des cours d'eau, notamment dans le cas de projets de restauration écologique. Les écrevisses indigènes, avec leurs fortes exigences écologiques, sont également

de bons indicateurs de la qualité des cours d'eau (Reynolds & Souty-Grosset, 2011).

Nous avons saisi l'opportunité d'un suivi réalisé dans le cadre d'un projet de restauration de cours d'eau avec restauration de biotope d'*A. pallipes*, pour tester une nouvelle méthode d'échantillonnage pour la détection de l'Écrevisse à pattes blanches (on soupçonne une plus longue conservation de l'ADNe et une plus grande concentration dans ce type de matrice ; Harrison et al., 2019). Nous avons donc supposé que l'ADNe de l'Écrevisse à pattes blanches était capturé par les biofilms et ce, même pour de faibles densités de populations. Cette étude pourrait conduire au développement d'une méthode de détection de la présence d'Écrevisses à pattes blanches qui permettrait de gagner du temps sur le terrain et d'économiser de l'argent. Cette méthode serait notamment utile pour cibler des sites en vue d'une prospection ultérieure ou pour une utilisation dans le cadre d'applications de la Loi sur l'eau.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Modèle et système d'étude

Depuis plusieurs décennies, les populations d'écrevisses indigènes connaissent un fort déclin en France, en raison de la dégradation de l'habitat et de la présence croissante d'espèces exotiques envahissantes (EEE). En particulier, les écrevisses envahissantes telles que l'Écrevisse de Louisiane

(*Procambarus clarkii*) et l'Écrevisse signal (*Pacifastacus leniusculus*) sont des porteurs sains de la peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*), qui décime les populations indigènes (Grandjean et al., 2017; Jussila et al., 2021). La problématique de l'Écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*) est sous-estimée dans les bassins versants de la Justale et du Louch-Rieumajou (affluents de l'Arbas, Haute-Garonne, Occitanie, France). Les menaces environnementales liées au piétinement des berges et des cours d'eau par les troupeaux de bovins, ou à la coupe rase de la végétation riveraine sont pourtant avérés. Le colmatage du lit mineur, l'érosion des berges, la dégradation de la qualité de l'eau (contamination bactériologique, eutrophisation), la disparition des systèmes racinaires et l'augmentation de la température de l'eau due à la disparition de la végétation rivulaire sont autant de conséquences fatales pour ce crustacé protégé. Dans le cadre du plan de relance « France Relance », un programme de restauration de cours d'eau à Écrevisse à pattes blanches a donc été engagé par le CEN Occitanie et le Syndicat de rivières Salat-Volp (SSV). Étaient prévues la mise en exclos d'une partie des cours d'eau et la mise en place de systèmes d'arrosage adaptés à chaque contexte, la rédaction de cahiers des charges par le CEN Occitanie et le SSV, et l'implication des agriculteurs.

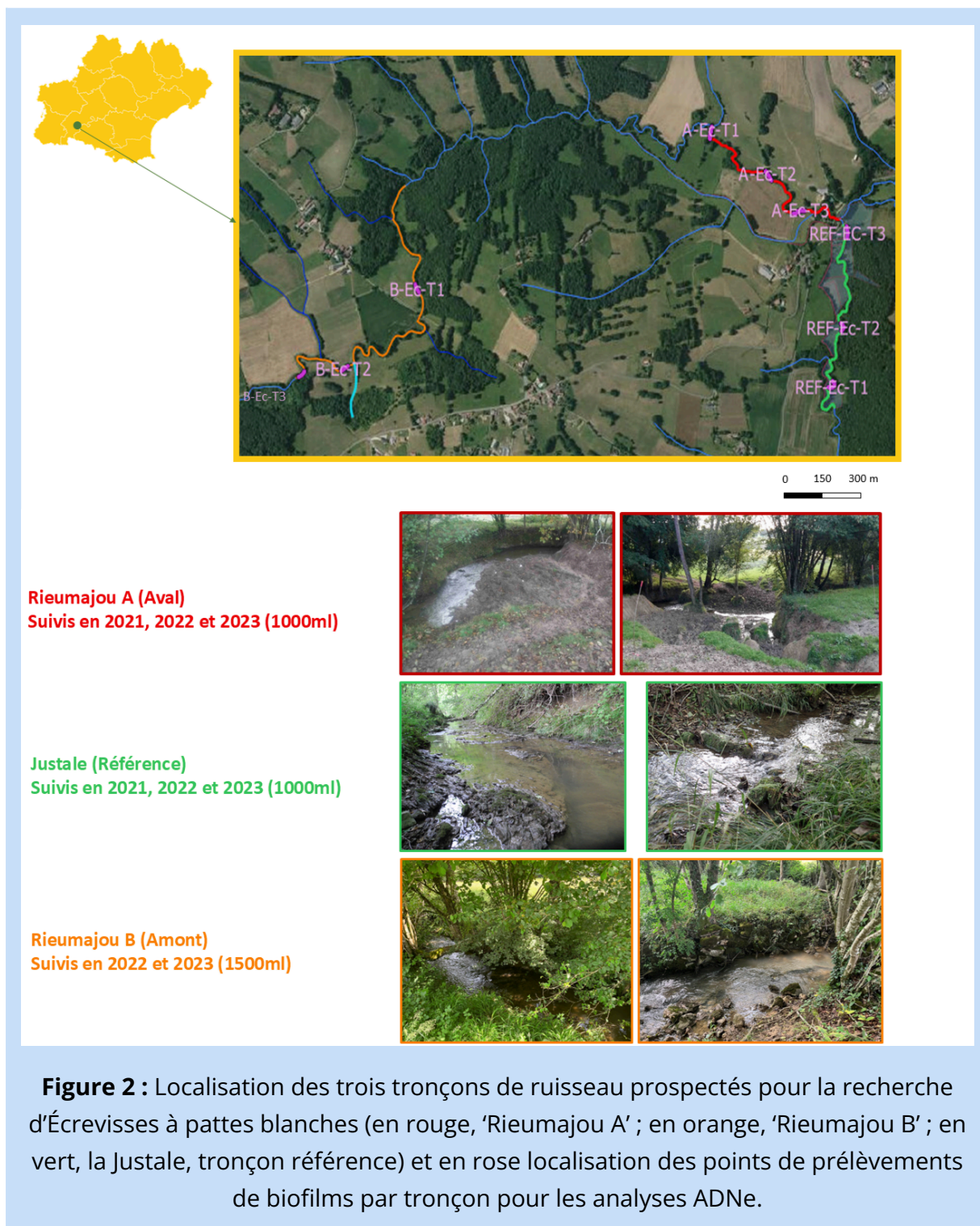
Le Rieumajou (coordonnées géographiques de la source : N 43.0481°, E 0.8409°, à environ 415 m

d'altitude) est un ruisseau long de 8,8 km, affluent de la Justale, qui traverse 6 communes de la Haute-Garonne. L'altitude (moyenne  $\pm$  écart-type) des points échantillonnés sur le Rieumajou étaient de  $335 \pm 11$  m. De la même manière, la largeur du lit mineur (moyenne  $\pm$  écart-type) aux points d'échantillonnage était de  $3.4 \pm 0.6$  m, la largeur du lit mouillé était de  $2.2 \pm 0.8$  m et la hauteur d'eau était de  $0.25 \pm 0.2$  m. La Justale (coordonnées géographiques de la source : N 43.0466°, E 0.8848° à environ 406 m d'altitude) est un ruisseau de 9.1 km, affluent de la rivière l'Arbas, qui traverse 5 communes du même département. L'altitude (moyenne  $\pm$  écart-type) des points échantillonnés sur la Justale étaient de  $336 \pm 3$  m. De la même manière, la largeur du lit mineur (moyenne  $\pm$  écart-type) aux points d'échantillonnage était de  $3.1 \pm 1$  m, la largeur du lit mouillé était de  $2.4 \pm 0.8$  m et la hauteur d'eau était de  $0.23 \pm 0.15$  m. Les deux ruisseaux comportent une grande variété de substrats (litières, vases, galets...) et de types de faciès d'écoulement (radier, plat lentique, plat courant, mouille de concavité...voir Malavoi & Souchon, 2002).

L'Écrevisse à pattes blanches est historiquement connue dans le secteur, et sa présence est toujours avérée sur la Justale et la partie amont du Rieumajou. La Justale, globalement en bon état en amont de la confluence avec le Rieumajou, comporte le tronçon de référence pour cette étude (Figure 2). Le tronçon A du Rieumajou était

extrêmement dégradé en amont des actions de restauration menées ou encadrées par le CEN Occitanie (Figure 2), et constitue une zone potentielle de

recolonisation par l'Écrevisse à pattes blanches, depuis la Justale ou depuis l'amont du Rieumajou (tronçon B) où une population subsiste (Figure 2).



## 2.2. Prospections et échantillonnages

La Justale et le 'Rieumajou A' ont fait l'objet de suivis d'Écrevisses à pattes blanches et d'échantillonnages de biofilms en 2021, 2022 et 2023, et le 'Rieumajou B' en 2022 et 2023. Les tronçons étaient de 1000 mètres linéaires (ml) pour la Justale et le 'Rieumajou A', et de 1500 ml pour le 'Rieumajou B' (Figure 2). Les points d'échantillonnages ont été sélectionnés de manière à diversifier les types de faciès d'écoulement et les substrats.

Les prospections pédestres nocturnes étaient réalisées par 2 opérateurs, sur 3 segments de 30 mètres linéaires pour chaque tronçon de ruisseau. Les suivis étaient réalisés à l'aide d'une frontale, au maximum depuis les berges. Les individus étaient dénombrés par classe de taille. Une prospection par campagne de terrain était également réalisée sur l'entièreté de chaque tronçon afin d'identifier les limites de populations.

Un prélèvement de biofilm était réalisé sur chaque segment de 30 ml prospecté par ailleurs, de façon à diversifier les faciès d'écoulement et ce, 2 ou 3 fois par campagne de terrain selon les années, les répliques étant réalisés dans une période d'un mois maximum. Les biofilms ont été collectés en grattant la surface supérieure de pierres avec une brosse à dents propre : cinq pierres ont été prélevées à chacun des 12 points de prélèvement, soit un total de 60 pierres

par site (Figure 3). Les échantillons de biofilms étaient conservés dans des tubes Falcon® stériles de 50 mL, fixés dans de l'éthanol (70 %), conformément à la norme européenne EN 13946 (AFNOR, 2014). Tous les échantillons étaient placés dans la glace sur site et pendant le transport (environ 1 heure) afin d'éviter la dégradation de l'ADNe, puis stockés au laboratoire à 4° C pour les biofilms jusqu'à extraction. En 2021, les prélèvements étaient réalisés de jour. À partir de 2022, afin de maximiser la détection de l'Écrevisse à pattes blanches, plus active la nuit, les prélèvements étaient réalisés en soirée et début de nuit.

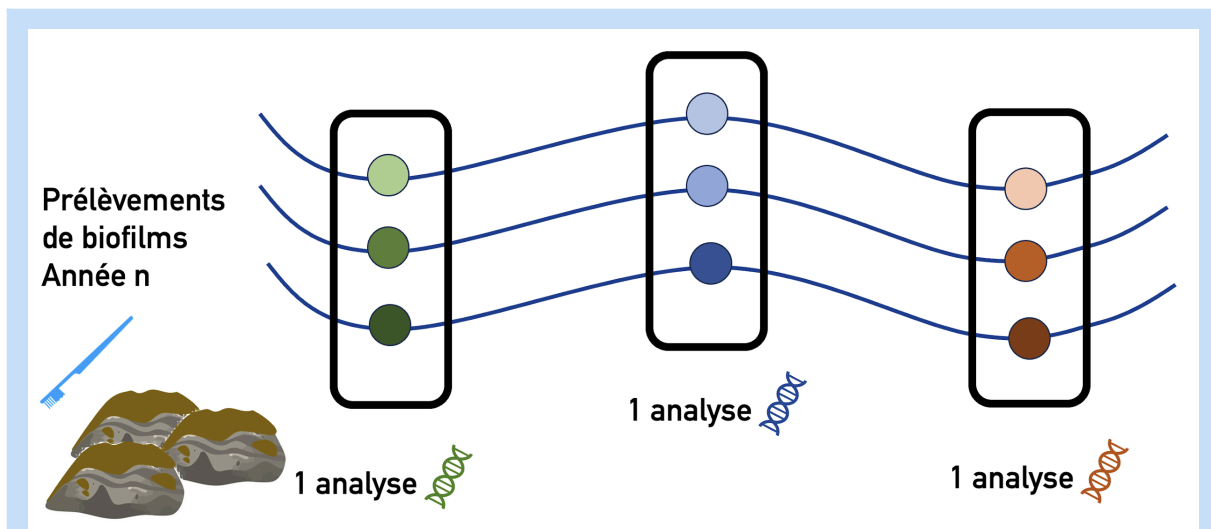
Chaque point a également fait l'objet d'une caractérisation de l'habitat et un prélèvement de macro-invertébrés était réalisé au filet Surber (surface d'échantillonnage 0.05 m<sup>2</sup>, maille de 500 µm), selon le protocole européen standardisé (norme XP T 90-333 ;AFNOR, 2010) pour caractériser les ressources trophiques disponibles pour les Écrevisses et la qualité du cours d'eau. Les macro-invertébrés ont été conservés dans des flacons hermétiques contenant de l'alcool à 95°. Les spécimens ont ensuite été triés, comptés et identifiés au niveau du genre, ou à la famille et sous-famille par un expert sur la base de leurs caractères morphologiques. Les résultats ne seront pas présentés ici (analyses en cours).



**Figure 3 :** Prélèvements de biofilms sur pierres récoltées dans le ruisseau

### 2.3. Analyses génétiques

Pour des raisons budgétaires, les réplicas des prélèvements de biofilms réalisés sur un même point au cours d'une campagne de terrain ont été regroupés pour faire l'objet d'une unique analyse génétique (Figure 4).



**Figure 4 :** Schématisation du regroupement des échantillons pour les analyses génétiques dans le cas où 3 réplicas étaient réalisés lors d'une campagne de terrain.

L'ADN inclus dans les tubes Falcon® de 50 mL concentrant les particules organiques présentes dans le biofilm aquatique des sites étudiés a été extrait à l'aide du kit d'extraction « mini kit » de

la société Qiagen selon un protocole adapté par Gecolab à partir du protocole du fabricant. L'ADN extrait a ensuite été amplifié par réactions PCR, via plusieurs couples d'amorces

s'hybridant sur différentes portions de gènes propres aux crustacés (gènes mitochondriaux 12S et COI).

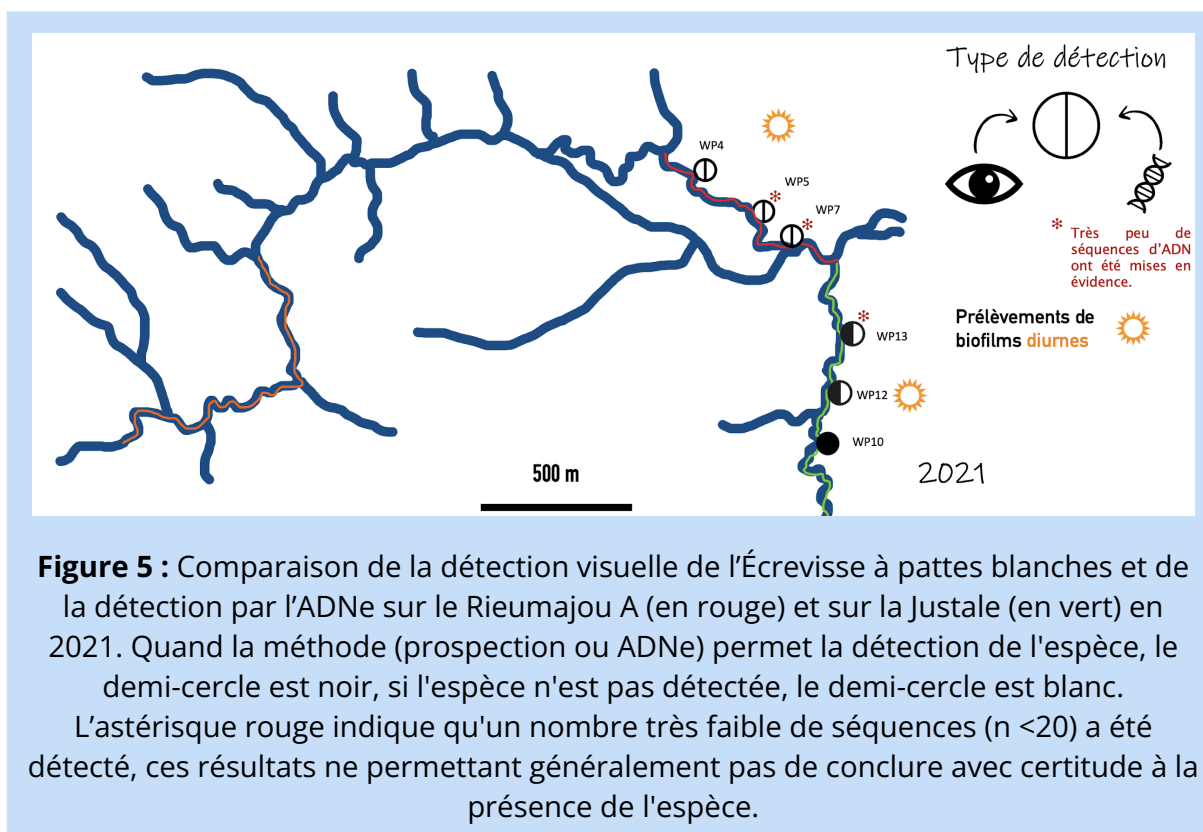
Une seconde PCR permettant l'ajout de tags spécifiques à la technique de séquençage nouvelle génération a ensuite été réalisée. Ces produits PCR ont subi une étape de purification puis ont été séquencés sur un séquenceur nouvelle génération de la marque Illumina (modèle Novaseq). Les millions de séquences brutes obtenues ont été traitées par un script bio-informatique mis au point au sein du laboratoire Gecolab afin de ne garder que les séquences d'intérêt (élimination de séquences provenant d'artéfacts). Enfin, les séquences traitées ont été attribuées à chaque taxon en les comparant à plusieurs bases de données publiques (e.g. GenBank et BOLD) et privée (base de données de Gecolab) de séquences génétiques de crustacés décapodes mais aussi des invertébrés européens.

Afin de garantir la fiabilité des données obtenues par analyse ADNe, seules les identifications obtenues avec un nombre de séquences (reads) supérieur à 20 et une correspondance de plus 98 %, c'est-à-dire un bon pourcentage d'identification des séquences obtenues

avec les séquences de références provenant des bases de données, sont retenues.

### 3. Résultats préliminaires et discussion

En 2021, les prospections visuelles n'ont pas permis de détecter l'Écrevisse à pattes blanches dans le tronçon 'Rieumajou A'. En revanche, des individus ont été détectés dans la Justale, avec une densité croissante selon la distance à la confluence (Annexe 1). Les analyses ADNe n'ont pas permis, non plus, de détecter la présence de l'Écrevisse à pattes blanches dans le 'Rieumajou A' avec certitude, bien que quelques séquences (moins de 20) aient été détectées au niveau des 2 points les plus proches de la confluence. Sur la Justale, l'ADNe a permis de détecter l'Écrevisse à pattes blanches en WP13, où la densité de population était plus importante. Quelques séquences d'Écrevisses à pattes blanches (moins de 20) ont également été détectées à proximité de la confluence où seuls 3 individus ont été observés lors des prospections classiques, mais pas en WP12 (Figure 5).



**Figure 5 :** Comparaison de la détection visuelle de l’Écrevisse à pattes blanches et de la détection par l’ADNe sur le Rieumajou A (en rouge) et sur la Justale (en vert) en 2021. Quand la méthode (prospection ou ADNe) permet la détection de l’espèce, le demi-cercle est noir, si l’espèce n’est pas détectée, le demi-cercle est blanc. L’astérisque rouge indique qu’un nombre très faible de séquences ( $n < 20$ ) a été détecté, ces résultats ne permettant généralement pas de conclure avec certitude à la présence de l’espèce.

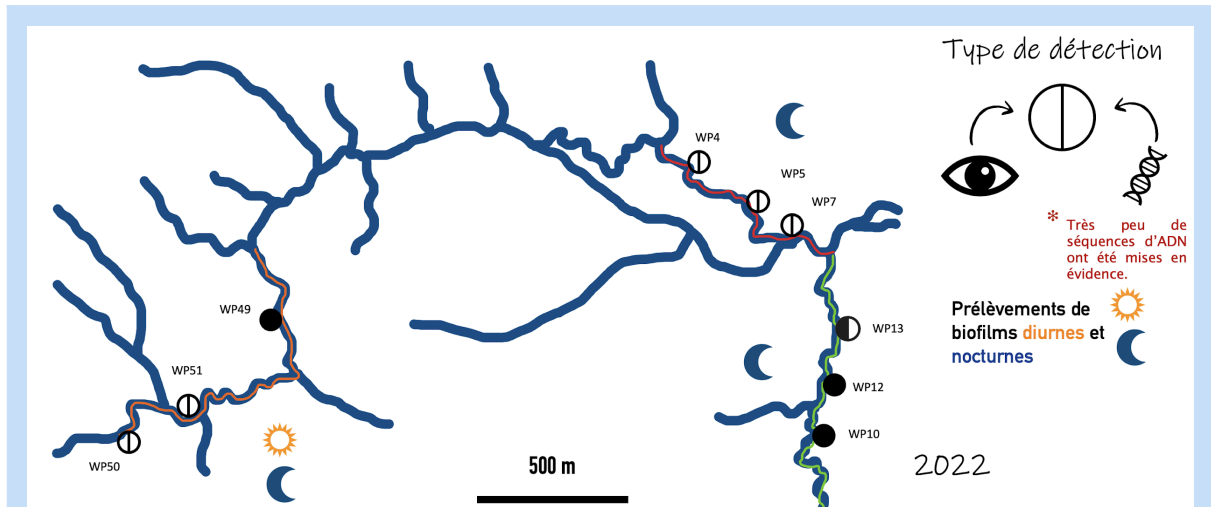
En 2022, les assècs ont été très importants en raison de la sécheresse estivale extrême. Les prospections visuelles ont permis de détecter l’Écrevisse à pattes blanches sur la Justale, avec une densité croissante avec la distance à la confluence à l’instar de 2021. Cependant, les quantités d’individus observées étaient beaucoup plus faibles que l’année précédente. Encore une fois, aucune Écrevisse à pattes blanches n’a été observée sur le ‘Rieumajou A’, qui était en assèc à l’exception de quelques trous d’eau. Sur le ‘Rieumajou B’, les seules Écrevisses observées étaient concentrées au niveau du WP49, en eau au moment des prospections. Les points prospectés par ailleurs étaient également en eau, mais espacés par des zones en assèc. L’ADNe a permis de détecter l’Écrevisse à pattes

blanches sur la Justale, excepté au niveau du WP13 où 9 individus avaient été observés par ailleurs en prospections classiques. Sur le ‘Rieumajou A’ et le ‘Rieumajou B’ les résultats ADNe concordaient parfaitement avec ceux des prospections classiques (Figure 6).

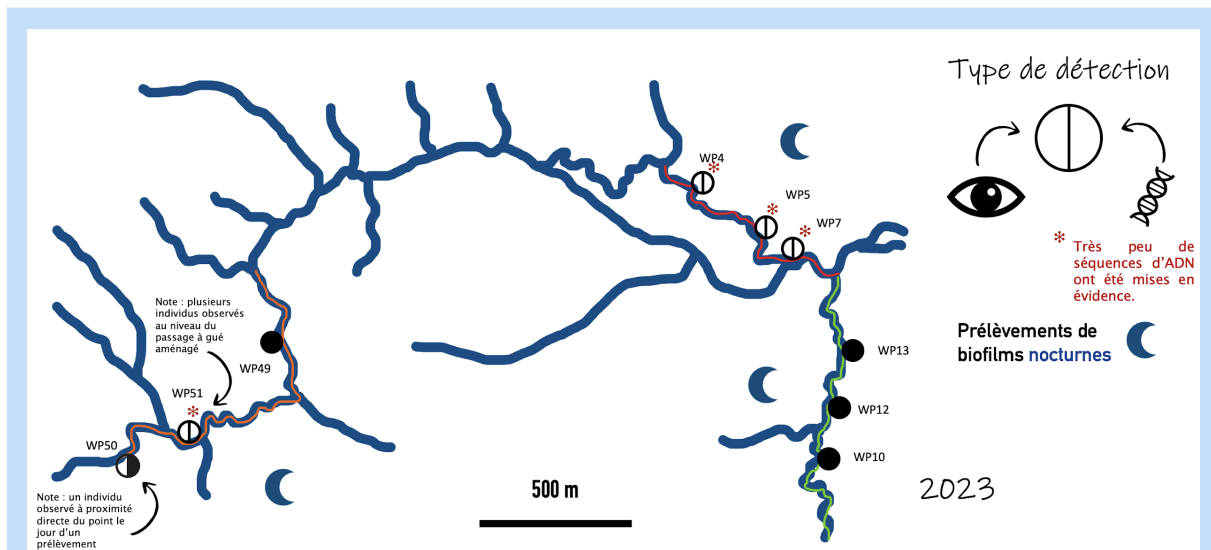
En 2023, l’Écrevisse à pattes blanches a été détectée sur la Justale à l’aide des prospections visuelles et de l’ADNe. Sur le ‘Rieumajou A’ aucun individu n’a été détecté visuellement et de très petites quantités de séquences (moins de 20 par point) ont été détectées sur les 3 points du tronçon. Enfin, sur le ‘Rieumajou B’, les prospections classiques ont permis de détecter des individus d’Écrevisses à pattes blanches en WP49 uniquement, tandis que l’ADNe a permis de confirmer la présence de

l'Écrevisse à pattes blanches en WP49 et WP50, et quelques séquences (moins de

20) ont également été mises en évidence en WP51 (Figure 7).



**Figure 6 :** Comparaison de la détection visuelle de l'Écrevisse à pattes blanches et de la détection par l'ADNe sur le Rieumajou A (en rouge), le Rieumajou B (en orange) et sur la Justale (en vert) en 2022.



**Figure 7 :** Comparaison de la détection visuelle de l'Écrevisse à pattes blanches et de la détection par l'ADNe sur le Rieumajou A (en rouge), le Rieumajou B (en orange) et sur la Justale (en vert) en 2023.

Les inventaires classiques ont permis de détecter l'Écrevisse à pattes blanches sur 46 % des tronçons. La détectabilité de l'Écrevisse à pattes blanches est plus

importante avec l'ADNe, méthode pour laquelle 66 % des tronçons sont positifs. Au total, 58 % des résultats sont

parfaitement concordants entre les deux méthodes.

Sept résultats sur 24 sont négatifs en prospections classiques mais positifs à l'ADNe, parmi lesquels :

- 5 détections faibles (moins de 20 séquences) peuvent s'expliquer par une population à l'amont du point d'échantillonnage ('Rieumajou A' en 2021 et 2023 ; Figures 5 et 7).
- 2 sont vérifiées par des observations hors protocole (WP50 et WP51 en 2023 ; Figure 7).

Il y a également un cas de détection en prospection classique et de faible détection par l'ADNe (WP13 en 2021). Ceci peut s'expliquer par la faible densité d'individus observée lors des prospections classiques (Annexe 1). Il ressort que 33 % des résultats, qui ne sont pas parfaitement concordants, sont donc explicables facilement.

En revanche, il reste 2 cas sur 24 de faux négatifs via l'ADNe, malgré des détections visuelles lors des prospections classiques (sur le Justale en 2021 et en 2022). A noter que la première année, les prélèvements ont tous été réalisés en plein jour, alors que les Écrevisses sont moins actives.

#### 4. Conclusion et perspectives

La présente étude apporte une nouvelle méthode de détection de l'Écrevisse à pattes blanches. À l'instar de nombreuses autres études, ce travail montre que l'ADNe et les inventaires classiques sont complémentaires. En

particulier, l'ADNe démontre une meilleure efficacité de détection de l'espèce tandis que les inventaires classiques sont indispensables pour estimer les abondances et suivre l'état des populations. Il ressort de ces premiers résultats que l'ADNe est un outil pertinent à utiliser pour la mise à jour des connaissances sur la répartition de l'Écrevisse à pattes blanches en amont d'un programme de conservation de l'espèce sur un bassin-versant par exemple, pour prioriser les tronçons à prospecter. Il serait utile de comparer la détection de l'Écrevisse à pattes blanches dans les biofilms prélevés de jour et de nuit pour conclure sur la plus-value du protocole nocturne, et de comparer la détection dans les matrices biofilm et eau. Enfin, il serait utile de tester la capacité des biofilms pour d'autres groupes taxonomiques pour lesquels les résultats sont peu concluants jusqu'à maintenant dans la matrice eau, comme les mammifères semi-aquatiques.

#### 5. Remerciements

Nous remercions André Bervillé pour sa relecture avisée. Un immense merci à l'équipe des *Gratteurs de Cailloux*, en particulier à Justine Nicolas, Lucie Pascarel, Emile Poncet, Baptiste Charlot, Marc Enjalbal, Frédéric Blanc, et Mathilde Cassé pour leur aide et leur bonne humeur lors du travail de terrain nocturne. Mention spéciale pour Marc, Chloé, Scapin, Patte-folle et Tripou qui nous ont fait l'honneur de nous accueillir chaleureusement ! Nous remercions

également Adrien André, Lise-Marie Pigneur et Alix Attaque pour leur aide précieuse au laboratoire. Ce travail a été soutenu par l'État et l'Agence de l'eau Adour-Garonne via le plan France Relance et le Fonds Vert, et n'aurait pas pu voir le jour sans la volonté et la mobilisation de Marc Enjalbal pour monter le projet sur lequel s'est appuyé ce travail (*Plan de restauration "France Relance" "Restauration du réservoir biologique des cours d'eau et zones humides des bassins versants de la Justale et du Louch Rieumajou, dans le cadre d'une démarche locale concertée"*). Enfin, merci au Syndicat de Rivière Salat-Volp ainsi qu'aux agriculteurs qui se sont impliqués dans ce projet.

## 6. Références

- AFNOR. (2010). *Qualité de l'eau - Guide d'application de la norme expérimentale XP T 90-333: 2009 (Prélèvement des macro-invertébrés aquatiques en rivières peu profondes): Vol. GA T90-733* (AFNOR, Ed.).
- AFNOR. (2014). *Qualité de l'eau - Guide pour l'échantillonnage en routine et le prétraitement des diatomées benthiques de rivières et de plans d'eau: Vol. NF EN 13946* (AFNOR, Ed.).
- Agersnap, S., Larsen, W. B., Knudsen, S. W., Strand, D., Thomsen, P. F., Hesselsøe, M., Mortensen, P. B., Vrålstad, T., & Møller, P. R. (2017). Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179261>
- Akbari, F., Andrade, N., Artigas, J., Aulenta, F., Balaguer, M. D., Barral-Fraga, L., Bernet, N., Besemer, K., Bonet, B., Bonnineau, C., Canals, O., Carmona-Martínez, A., Carvajal-Arroyo, J. - M., Coma, M., Corcoll, N., Courtens, E., Dobretsov, S., Foulquier, A., Freixa, A., ... Yuan, Z. (2016). *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment* (A. M. Romani, H. Guasch, & M. D. Balaguer, Eds.). Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190173.11>
- Andersen, L. W., Schousgaard, H. S., Kahlert, J., Linnet, A., Jensen, O. H., Thomsen, E. A., Sørensen, F., Baagøe, H. J., Frikke, J., Jacobsen, H., Håkansson, B., Loeschcke, V., & Madsen, A. B. (2021). Assessing the current feces identification method of the European otter *Lutra lutra*. In *Wildlife Biology* (Vol. 2021, Issue 1). Nordic Council for Wildlife Research. <https://doi.org/10.2981/wlb.00764>
- Arguel, L., Denis, A. S., Danflous, S., Gouix, N., Santoul, F., Buisson, L., & Pelozuelo, L. (2022). Detection and Monitoring of Riverine Dragonfly of Community Interest (Insecta: Odonata): Proposal for a Standardised Protocol Based on Exuviae Collection. *Diversity*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/d14090728>
- Arias, M. C., Aulagnier, S., Baerwald, E. F., Barclay, R. M. R., Batista, J. S., Beasley, R. R., Bezerra, R. A., Blanc, F., Bridge, E. S., Cabria, M. T., Caputo, L. I., Chen, J., Chen, J.-H., Chen, Z., Chen, C.-H., Chu, P.,

- Contina, A., da Silva Carmo, F. M., de Carvalho, L. C., ... Zou, S. (2016). Microsatellite records for volume 8, issue 1. *Conservation Genetics Resources*, 8(1), 43–81. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0522-2>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. In *Conservation Genetics* (Vol. 17, Issue 1, pp. 1–17). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Battin, T. J., Wille, A., Psenner, R., & Richter, A. (2004). Large-scale environmental controls on microbial biofilms in high-alpine streams. *Biogeosciences*, 1(2), 159–171. <https://doi.org/10.5194/bg-1-159-2004>
- 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(4), 733–749. <https://doi.org/10.1002/edn3.435>
- Biffi, M., Charbonnel, A., Buisson, L., Blanc, F., Némoz, M., & Laffaille, P. (2016). Spatial differences across the French Pyrenees in the use of local habitat by the endangered semi-aquatic Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26(4), 761–774. <https://doi.org/10.1002/aqc.2612>
- Biffi, M., Gillet, F., Laffaille, P., Colas, F., Aulagnier, S., Blanc, F., Galan, M., Tiouchichine, M. L., Némoz, M., Buisson, L., & Michaux, J. R. (2017). Novel insights into the diet of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) using next-generation sequencing molecular analyses. *Journal of Mammalogy*, 98(5), 1497–1507.
- Charbonnel, A., Laffaille, P., Biffi, M., Blanc, F., Maire, A., Némoz, M., Sanchez-Perez, J. M., Sauvage, S., & Buisson, L. (2016). Can recent global changes explain the dramatic range contraction of an endangered semi-aquatic mammal species in the French pyrenees? *PLoS ONE*, 11(7), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159941>
- Collas, M., Burgun, V., Poulet, N., & Grandjean, F. (2015). *La situation des écrevisses en France - Résultats de l'enquête nationale 2014*.
- Couturier, T., Steinmetz, J., Defos du Rau, P., Marc, D., Trichet, E., Gomes, R., & Besnard, A. (2023). Intensive agriculture as the main limiting factor of the otter's return in southwest France. *Biological Conservation*, 279. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2023.109927>.
- Dawkins, K. L., Nevill, P., Chambers, B., Herbert, S., & Burnham, Q. F. (2024). Testing multiple environmental DNA substrates for detection of the cryptic and Critically Endangered burrowing freshwater crayfish *Engaewa pseudoreducta*. *Environmental DNA*, 6(4). <https://doi.org/10.1002/edn3.594>
- Emberger, C., Molines, L., Dumas, Y.,

Gosselin, M., Gosselin, F., Aubert, M., Moulin, V., Vincenot, L., & Chauvin, C. (2023). *Rapport final du projet InSylBioS - Mieux comprendre et INTégrer dans les pratiques SYLvicoles le rôle de la BIOdiversité des Sols dans le fonctionnement des forêts du sud du Massif central.*

- Gillet, F., Cabria Garrido, M. T., Blanc, F., Fournier-Chambrillon, C., Némoz, M., Sourp, E., Vial-Novella, C., Zardoya, R., Aulagnier, S., & Michaux, J. R. (2017). Evidence of fine-scale genetic structure for the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in the French Pyrenees. *Journal of Mammalogy*, 98(2), 523–532.  
<https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx002>

- Gillet, F., Roux, B. Le, Blanc, F., Bodo, A., Fournier-Chambrillon, C., Fournier, P., Jacob, F., Lacaze, V., Némoz, M., Aulagnier, S., & Michaux, J. R. (2016). Genetic monitoring of the endangered pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in the Aude River, France. *Belgian Journal of Zoology*, 146(1), 44–52.  
<https://doi.org/10.26496/bjz.2016.38>

- Gilliot, C., & Lang, I. (2021). Stratégie régionale relative aux espèces exotiques envahissantes Faune (EEE Faune) d'Occitanie 2021-2030. *CEN Occitanie*, 91 p + Annexes.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28811.50722>

- 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(4), 541–549.  
<https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.4.10>

- Haddaway, N. R., Mortimer, R. J. G., Christmas, M., & Dunn, A. M. (2015). Water chemistry and endangered white-clawed crayfish: A literature review and field study of water chemistry association in *Austropotamobius pallipes*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 416.  
<https://doi.org/10.1051/kmae/2014037>

- Harrison, J. B., Sunday, J. M., & Rogers, S. M. (2019). Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 286, Issue 1915). Royal Society Publishing.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1409>

- 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.  
<https://doi.org/10.3389/fevo.2021.648495>

- Lim, M., Blanc, F., Michaux, J., Pigneur, L.-M., Gillet, F., Marc, D., Poncet, É., & Némoz, M. (2021). Étude comparative de la densité et du déplacement des Desmans des Pyrénées *Galemys pyrenaicus* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811) par une méthode non invasive. *Naturae*, 17, 233–242.  
<https://doi.org/10.5852/naturae2021a17>

- Malavoi, J. R., & Souchon, Y. (2002). Standardized description of streams and rivers channel geomorphic units: Qualitative description key and physical measurements. *BFPP - Bulletin Français de La Pêche et de La Protection Des Milieux Aquatiques*, 365-366, 357-372. <https://doi.org/10.1051/kmae:2002040>
- 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(3). <https://doi.org/10.3390/d14030205>
- Mosconi, F., Campanaro, A., Carpaneto, G. M., Chiari, S., Hardersen, S., Mancini, E., Maurizi, E., Sabatelli, S., Zauli, A., Mason, F., & Audisio, P. (2017). Training of a dog for the monitoring of *Osmoderma eremita*. *Nature Conservation*, 20, 237-264. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.20.12688>
- Pigneur, L.-M., Caublot, G., Fournier-Chambrillon, C., Fournier, P., Giralda-Carrera, G., Grémillet, X., Le Roux, B., Marc, D., Simonnet, F., Smitz, N., Sourp, E., Steinmetz, J., Urra-Maya, F., & Michaux, J. R. (2019). Current genetic admixture between relictual populations might enhance the recovery of an elusive carnivore. *Conservation Genetics*, 20(5), 1133-1148. <https://doi.org/10.1007/s10592-019-01199-9>
- Pigneur, L.-M., Michaux, J., Caublot, G., Fournier, P., Marc, D., Simonnet, F., & Jacob, G. (2018). Apport de la génétique pour l'étude de la dynamique des populations de Loutre d'Europe *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758) en France. *Naturae*, 6(6), 63-71.
- Poncet, É., Blanc, F., Lim, M., Marc, D., & Némoz, M. (2021). Pyrenean Desman (*Galemys pyrenaicus* É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811) 2011-2018, assessment and feedback on eight years of trapping in the French Pyrenees. *Naturae*, 2021, 35-47. <https://doi.org/10.5852/naturae2021a3>
- Poulet, N., & Basilico, L. (2019). *L'ADN environnemental pour l'étude de la biodiversité - Etat de l'art et perspectives pour la gestion*. Collection Rencontres-Synthèse. <https://professionnels.afbiodiversite.fr/node/103>
- Poupelin, M., Pustoc'h, P., Pasco, P.-Y., & Capoulade, M. (2019). *L'écrevisse à pattes blanches (Austropotamobius pallipes) en Bretagne*.
- Prié, V. (2019). *Recherche de la Grande Mulette Margaritifera auricularia par analyse de l'ADN environnemental*.
- Prié, V. (2020). *La Mulette perlière Margaritifera margaritifera dans l'Agout - Recherche par analyse de l'ADN environnemental*.
- Prié, V., & Néri, F. (2016). *Recherche de la Grande Mulette Margaritifera auricularia sur l'Arros (Gers)*.
- Ranius, T., & Jansson, N. (2002). A comparison of three methods to survey saproxylic beetles in hollow oaks.

*Biodiversity and Conservation*, 11(10), 1759–1771.

<https://doi.org/10.1023/A:1020343030085>

- Reynolds, J., & Souty-Grosset, C. (2011). Monitoring in conservation and management of indigenous crayfish populations. In *Management of Freshwater Biodiversity* (pp. 169–194). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139031790.011>

- Rivera, S. F., Vasselon, V., Mary, N., Monnier, O., Rimet, F., & Bouchez, A. (2020). Exploring the capacity of aquatic biofilms to act as environmental DNA samplers: Test on macroinvertebrate communities in rivers. *Science of the Total Environment*, 763, 144208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144208>

- Steinmetz, J., Ruelle, S., Ruys, T., Jean, P., & Dejean, T. (2018). Vers une nouvelle méthode de détection des espèces de mammifères semi-aquatiques : étude pilote et approche « Metabarcoding ADN ». *Faune Sauvage, Connaissance & Gestion Des Espèces*, 319 (2e trimestre), 11–17.

- Tréguier, A., Paillisson, J. M., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M. A., & Roussel, J. M. (2014). Environmental DNA surveillance for invertebrate species: Advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of*

*Applied Ecology*, 51(4), 871–879. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12262>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141394>

- 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(5), 520–538. <https://doi.org/10.1002/aqc.793>

- Trujillo-Gonzalez, A., Hinlo, R., Godwin, S., Barmuta, L. A., Watson, A., Turner, P., Koch, A., & Gleeson, D. (2021). Environmental DNA detection of the giant freshwater crayfish (*Astacopsis gouldi*). *Environmental DNA*, 3(5), 950–958. <https://doi.org/10.1002/edn3.204>

- Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., & Caldwell, D. E. (1998). In situ Characterization of Biofilm Exopolymers Involved in the Accumulation of Chlorinated Organics. *Microbial Ecology*, 35, 213–223. <https://doi.org/10.1007/s002489900077>

**Annexe 1** : Comparaison de la détection visuelle et de la détection ADNe de l'Écrevisse à pattes blanches dans échantillon de biofilm

Site	Point d'échantillonnage	Année	<i>A. pallipes</i> détectée visuellement (nombre d'individus captés sur le tronçon correspondant prospection pédestre nocturne)	<i>A. pallipes</i> détectée par ADNe	Remarques prélèvement
Rieumajou A	A-EC-T1 (WP4A)	2021	Non	Non	Prélèvements de jour
Rieumajou A	A-EC-T1 (WP4B)	2022	Non	Non	Prélèvements de nuit
Rieumajou A	A-EC-T1 (WP4C)	2023	Non	Non*	Prélèvements de nuit
Rieumajou A	A-EC-T2 (WP5A)	2021	Non	Non*	Prélèvements de jour
Rieumajou A	A-EC-T2 (WP5B)	2022	Non	Non	Prélèvements de nuit
Rieumajou A	A-EC-T2 (WP5C)	2023	Non	Non*	Prélèvements de nuit
Rieumajou A	A-EC-T3 (WP7A)	2021	Non	Non*	Prélèvements de jour
Rieumajou A	A-EC-T3 (WP7B)	2022	Non	Non	Prélèvements de nuit
Rieumajou A	A-EC-T3 (WP7C)	2023	Non	Non*	Prélèvements de nuit
Justale Reference	REF-EC-T1 (WP10A)	2021	Oui (35)	Oui	Prélèvements de jour
Justale Reference	REF-EC-T1 (WP10B)	2022	Oui (28)	Oui	Prélèvements de nuit

Justale Reference	REF-EC-T1 (WP10C)	2023	Oui (87)	Oui	Prélèvements de nuit
Justale Reference	REF-EC-T2 (WP12A)	2021	Oui (46)	Non	Prélèvements de jour
Justale Reference	REF-EC-T2 (WP12B)	2022	Oui (15)	Oui	Prélèvements de nuit
Justale Reference	REF-EC-T2 (WP12C)	2023	Oui (29)	Oui	Prélèvements de nuit
Justale Reference	REF-EC-T3 (WP13A)	2021	Oui (3)	Non*	Prélèvements de jour
Justale Reference	REF-EC-T3 (WP13B)	2022	Oui (9)	Non	Prélèvements de nuit
Justale Reference	REF-EC-T3 (WP13C)	2023	Oui (7)	Oui	Prélèvements de nuit
Rieumajou B	B-EC-T1 (WP49A)	2022	Oui (20)	Oui	Prélèvements de nuit ET de jour
Rieumajou B	B-EC-T1 (WP49B)	2023	Oui (11)	Oui	Prélèvements de nuit
Rieumajou B	B-EC-T2 (WP51A)	2022	Non	Non	Prélèvements de nuit ET de jour
Rieumajou B	B-EC-T2 (WP51B)	2023	Non <sup>1</sup>	Non*	Prélèvements de nuit  <i><sup>1</sup>plusieurs individus observés au niveau du passage à gué aménagé à proximité directe du prélèvement</i>

Rieumajou B	B-EC-T3 (WP50A)	2022	Non	Non	Prélèvements de nuit ET de jour
Rieumajou B	B-EC-T3 (WP50B)	2023	Non <sup>2</sup>	Oui	Prélèvements de nuit  <sup>2</sup> Un individu entre 2 et 5 cm a été observé le 05/09/2023 lors du prélèvement  Hypothèse : Population réfugiée à l'amont ?

\* Très peu de séquences d'ADN (moins de 20) d'*A. pallipes* ont été mises en évidence. La présence de l'espèce est ainsi probable mais devrait être confirmée par des observations visuelles, des données historiques ou un nouvel échantillonnage.