

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Écologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Chimie, Écologie, Géosciences et AgroSciences Théodore Monod (Poitiers)
Secteur de recherche : Biologie des Populations et Écologie

Présentée par :
Thomas Baudry

Étude des impacts de l'écrevisse exotique envahissante Cherax quadricarinatus sur les hydrosystèmes de Martinique

Directeur(s) de Thèse :
Frédéric Grandjean, Juliette Smith-Ravin

Soutenue le 03 octobre 2022 devant le jury

Jury :

Président	Philippe Jarne	Directeur de recherches CNRS, CEFE, Université de Montpellier
Rapporteur	Philippe Jarne	Directeur de recherches CNRS, CEFE, Université de Montpellier
Rapporteur	Jean-Marc Paillisson	Ingénieur de Recherche CNRS, ECOBIO, Université de Rennes
Membre	Jérôme Moreau	Maître de conférences, Biogéosciences, Université de Dijon
Membre	Karine Monceau	Maître de conférences, CEBC, Université de la Rochelle

Pour citer cette thèse :

Thomas Baudry. *Étude des impacts de l'écrevisse exotique envahissante Cherax quadricarinatus sur les hydrosystèmes de Martinique* [En ligne]. Thèse Biologie des Populations et Écologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2022. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale :
Chimie Ecologie Géosciences Agrosociétés « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Biologie des Populations et Ecologie

Présentée par :

Thomas BAUDRY

Étude des impacts de l'écrevisse exotique envahissante *Cherax quadricarinatus* sur les hydrosystèmes de Martinique

Directeur de Thèse :

Frédéric GRANDJEAN et Juliette SMITH-RAVIN

Soutenue le

devant la Commission d'Examen

JURY

Philippe JARNE	Directeur de Recherche, CEFE Montpellier	Rapporteur
Jean-Marc PAILLISSON	Ingénieur de Recherche, Université de Rennes 1	Rapporteur
Karine MONCEAU	Maitre de Conférence, Université de La Rochelle	Examineur
Jérôme MOREAU	Maitre de Conférence, Université de Bourgogne	Examineur
Frédéric GRANDJEAN	Professeur, Université de Poitiers	Directeur
Juliette SMITH-RAVIN	Professeur, Université des Antilles	Co-directeur

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, à l'Université de Poitiers, et au sein du groupe de recherche Biosphère, de l'Université des Antilles. Elle a été co-financée par la Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et de Logement de Martinique (DEAL) et l'Office de l'Eau de Martinique (ODE). Des fonds supplémentaires ont été apportés par l'Office Français pour la Biodiversité (OFB), ainsi que la Collectivité Territoriale de Martinique (CTM).



DEAL de la Martinique

Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement



Remerciements

Dans un premier temps grâce à mon stage de Master 2 (en 2018), puis dans le cadre de ma thèse, j'ai eu la chance de mettre un pied dans le monde de la recherche appliquée pour la protection de l'environnement et plus particulièrement dans la lutte contre les Espèces Exotiques Envahissantes, dans un cadre magnifique, la Martinique. Je voudrais donc remercier tous ceux qui ont rendu cela possible et qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ces travaux !

Tout d'abord, je souhaite remercier Philippe Jarne et Jean-Marc Paillisson, qui ont accepté d'être rapporteur de ma thèse, ainsi que Karine Monceau et Jérôme Moreau, qui ont accepté d'évaluer mon travail, en tant qu'examinateur.

Un grand merci à Juliette et Fred, mes directeurs de thèse, pour leurs encouragements et leurs relectures sur les différents manuscrits / articles, tout au long de la thèse. Je remercie également Jean-Pierre et Alex, mes deux encadrants de la DEAL Martinique et de l'ODE Martinique, sans qui rien n'aurait été possible, merci à vous deux pour votre soutien durant le stage, la thèse et les différents projets menés en parallèle !

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer : Carine, pour toutes les astuces en laboratoire, désolé de t'avoir dérangé si souvent ... , Thomas Senior, merci pour ton aide sur ce premier article et tous les traitements de séquences génétiques ! Quentin, un grand merci pour le temps que tu m'as consacré sur les différents articles ADN environnemental ... Un grand merci à Eric pour ton aide en laboratoire sur les protocoles écotox ainsi que pour structurer la rédaction de l'article. Et enfin, un grand merci à Julien, merci pour ton temps (qui est, je le sais, très précieux !), pour ton accueil à Toulouse et pour ton aide sur les analyses isotopiques !

Enfin merci aux équipes de la DEAL Martinique (Bruno, Julie, Clarisse, Stéphan, Aude, l'équipe des hydromètres Loulou, Alfred, Daniel, Jean-Michel ... J'espère ne pas en oublier) et de l'ODE Martinique (Mélissa, Lucas, Laurent, Guillaume) pour votre accueil durant mes passages dans vos locaux !

Un grand merci également à toute l'équipe de l'IFREMER Martinique et plus spécialement à Emmanuel Thouard, qui nous a acceptés mes écrevisses et moi, pendant près d'un an et demi pour mes diverses manip, merci encore à toi !

Merci également au CIRAD Martinique et Mathieu Coulis, qui m'a permis d'utiliser les salles de manips pour les dissections de crustacés et les étuves !

Un grand merci également aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, vous vous êtes tous énormément investis et vous avez fourni un gros travail ! Thomas, Matthis et Lola, merci pour votre aide et je vous souhaite tout le meilleur pour la suite !

Je remercie bien évidemment toute l'équipe EES qui m'a chaleureusement accueilli lors de mes retours au labo pour les manips ! Merci au staff technique, Carine (encore merci) et Maryline, bon courage pour cette dernière ligne droite avant une retraite bien méritée ! Christelle, encore toutes mes excuses pour les 10 aines d'OM, parfois envoyés en retard ou au dernier moment, un grand merci à toi pour ta patience ! Merci à tous les doctorants et post-doctorants que j'ai pu côtoyer durant ces 3 années de thèse : merci à Thomas et Sylvine pour votre sagesse en tant que jeunes docteurs et ces quelques bières au PLB, merci également à Marius, Clémentine, Charlotte et Cybèle, tous passés jeunes docteurs avec brio ! Cécilia, une de mes collègues de promo 2019-2022, bon courage pour la finalisation de ce manuscrit !! Et enfin Baptiste, Victor, bonne continuation à vous et bon courage dans la course à la publication et Maud, tiens bon, ça va aller, tu vas réussir à te sortir des multiples filtrations / dissections !

Eeeeh Elie, et toi mon loup ! On se suit depuis la seconde au lycée dans cette magnifique ville de Bressuire ! Chaque année dans la même classe, maintenant avec le même directeur de thèse, va falloir commencer à envisager de me lâcher ! Un grand merci à toi pour tous ces bons moments, par message / appel quand j'étais en Martinique, nos traditionnels moments café du premier jour lors de mes retours à Poitiers et tous les autres !! Tu vas gérer pour la fin, c'est sur et je serais là pour ta soutenance ! Tout plein de bécots

Un immense merci à tous les potes de Martinique, il y en a beaucoup qui se sont succédé avec ce turn-over sur cette belle île ... Merci à tous les Martiniquais (ou expatriés depuis un certain temps) pour leur accueil, depuis 2018, les sorties bateau, la plongée sous-marine chez Deep Turtle, les rando ... Quel kiff !!

Fanny et Louckas, merci à vous pour cette belle année de coloc, ça n'aura pas été de tout repos avec ces apéros et ce rythme de barjot ... Serge et Adèle peuvent en témoigner ! Henri et Clara, un grand merci à vous, vous avez égayé cette dernière année, toutes ces randos, ces sorties, ça a redynamisé mon aventure là-bas et j'ai pu redécouvrir plein de choses avant mon départ définitif, un grand merci à vous !

Alex et Pauline, un grand merci à vous, pour votre accueil, votre gentillesse ... Alex un immense merci à toi, tu m'as tellement aidé, aussi bien pour la thèse qu'en dehors, pour la mécanique sur la Clio, les prêts de matériel, de voiture ... Vous êtes géniaux, on se reverra !

Et enfin, Arnaud, mon frère ! Depuis 2018, un premier carnaval ensemble et ensuite ces deux belles années de coloc ensemble, ce magnifique confinement COVID (et ça, y a pas grand monde qui peut le dire comme ça je pense !) un énorme merci à toi, on a partagé tellement de choses ... je t'en remercie encore, ce n'est qu'un au revoir !

Tous les potes de métropole, que je voyais à chaque retour, mais plus particulièrement ceux de toujours, ceux de la bande, merci pour votre accueil, votre soutien et tous ces moments de fête / détente, vous gérez ! Vico, Laf, Elo, Marv, Aurel, Agathe, Marion, Max, Duj, Pasq, Banb, Alice, Amandine, Pag, Axelle, Fanny, Louis, Louloux, Marine, Matlu, Vali, Nath, Orlane (je vous vois venir, il n'y a aucun ordre de préférence, j'ai pris dans l'ordre de la conv' Facebook) jvous kiffe ! Petit clin d'œil spécial à Bob, Pierrot, Coco et Pat, merci mes animaux préférés pour votre accueil au zoo de Montbernage et bon voyage à vous !!

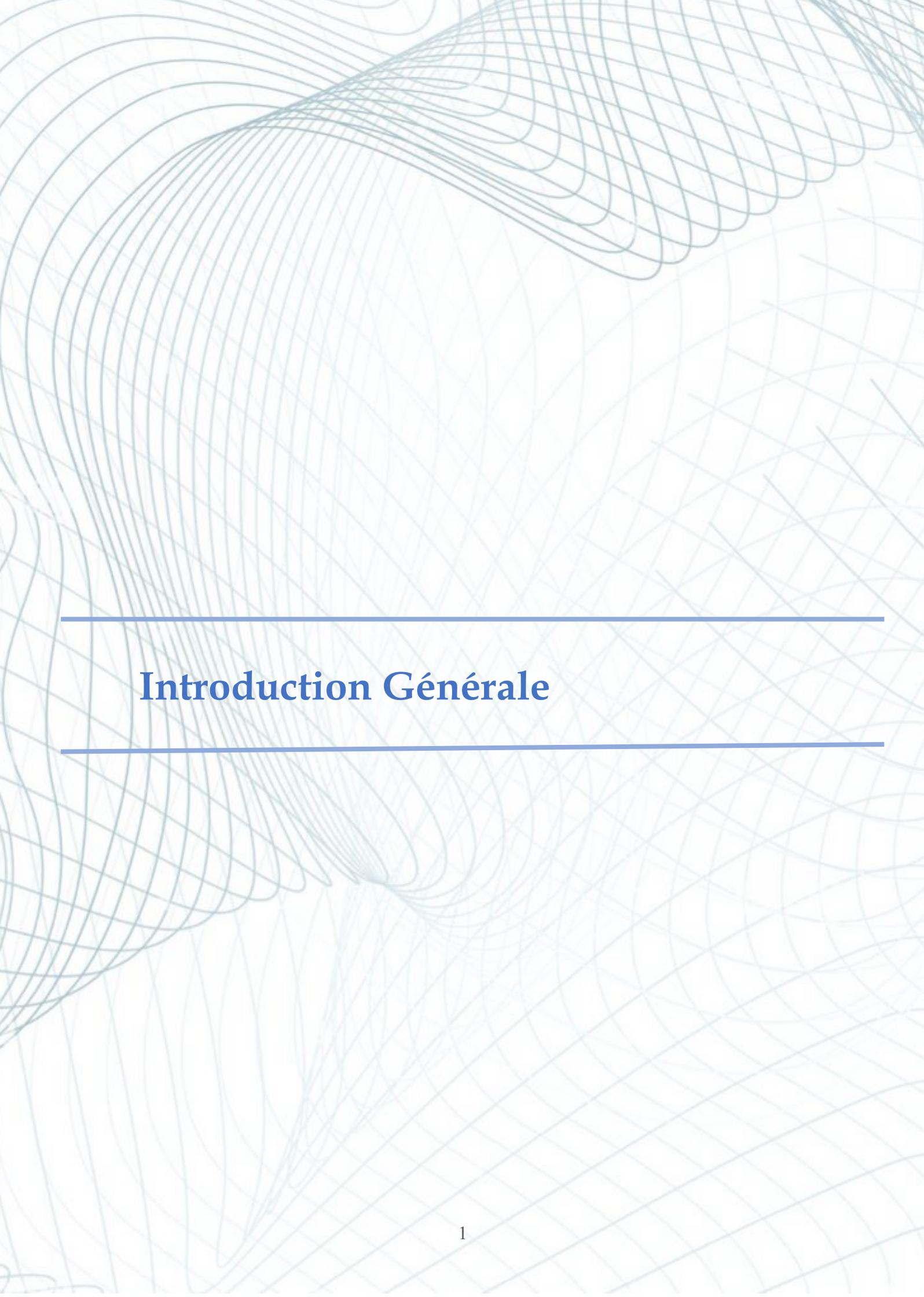
Je tiens également à remercier ma famille, mes grand-parents, qui croient que je travaille sur les crevettes et que ma thèse consiste à les pêcher pour les manger ... et mes parents, qui se sont toujours intéressés à ce que je faisais, qui m'ont écouté chaque semaine, merci beaucoup à vous pour votre aide et votre soutien ... ! Merci à toi aussi Chloé, pour ces bons moments lors de mes retours en Métropole et pour les quelques semaines de colocation !

Et enfin, merci à toi baby ... Hafsa, de m'avoir aidé et encouragé durant cette dernière année ! C'est maintenant fini, on va pouvoir être plus tranquille, pour de nombreuses belles années encore je l'espère !

Sommaire

Introduction Générale	1
I. Une diminution de la biodiversité globale	3
II. Les invasions biologiques	7
a. Définitions	7
b. Les prérequis d'une espèce exotique envahissante	9
c. La nature et les causes de ces introductions	10
d. Les milieux aquatiques d'eau douce et les écosystèmes insulaires	16
III. Impacts des espèces aquatiques envahissantes	18
a. La modification de l'habitat	18
b. Des espèces vectrices de pathogènes	19
c. La compétition pour les ressources	20
d. Les relations de prédation	21
IV. Le coût des espèces exotiques envahissantes	22
V. Les écrevisses exotiques envahissantes	26
a. Généralités	27
b. Les écrevisses et l'Homme	28
c. Les impacts des écrevisses exotiques envahissantes	34
Modifications physiques et chimiques de l'habitat	34
La dissémination de pathogènes	35
Les impacts sur les communautés végétales	35
Les impacts sur les invertébrés benthiques	36
Les impacts sur les vertébrés	37
Objectifs	39
Chapitre 1 – Contexte de l'étude : la Martinique et la faune sauvage	41
I. La Martinique	42
a. Géographie et climat	42
b. Le réseau hydrographique	42
c. L'occupation des sols	45
d. La pêche récréative et l'aquaculture	48
II. Matériel biologique	51
a. <i>Cherax quadricarinatus</i>	51
Origine et distribution	51
Morphologie spécifique et dimorphisme sexuel	52
Croissance et reproduction	52
Exigences écologiques	54
b. La faune dulçaquicole locale	55
Généralités	55
Les décapodes	56
Les poissons	56
Les espèces introduites	57
Les gastéropodes	58
Une faune dulçaquicole sensible	59

Chapitre 2 - Diversité génétique et distribution spatiale de <i>Cherax quadricarinatus</i> au sein des hydrosystèmes de Martinique	61
Introduction du Chapitre 2	62
Invasion and distribution of the redclaw crayfish, <i>Cherax quadricarinatus</i> , in Martinique	73
Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot, an eDNA-based success story	83
Chapitre 3 - Écologie trophique de <i>Cherax quadricarinatus</i> et ses impacts sur les communautés des cours d'eau de Martinique	93
I. Introduction du Chapitre 3	94
II. Matériel et méthode	97
a. Analyses isotopiques	97
Prélèvement in-situ et morphométrie	97
Préparation des échantillons	99
Analyses statistiques	100
b. Expérimentations en condition contrôlée	102
Prélèvement in-situ et morphométrie	102
Conditions expérimentales	102
III. Résultats	104
a. Écologie trophique de l'écrevisse	104
b. Contributions au régime alimentaire	105
c. Effets sur la niche trophique des communautés autochtones	107
d. Expérimentations en conditions contrôlées	109
IV. Discussion	110
V. Conclusion	114
Chapitre 4 - Étude de la bioaccumulation et de la décontamination du chlordécone chez <i>C. quadricarinatus</i>.	117
Introduction du Chapitre 4	118
The invasive crayfish <i>Cherax quadricarinatus</i> facing chlordecone in Martinique: Bioaccumulation and depuration study	123
Discussion générale et perspectives	133
I. Une invasion susceptible d'évoluer	135
II. Des impacts sous-estimés	137
III. Des perspectives de lutte mitigées	141
IV. Conclusion générale	147
Références bibliographiques	149
Annexes	176
Annexe 1	177
Annexe 2	178
Annexe 3	192
Annexe 4	194
Annexe 5	201
Annexe 6	205



Introduction Générale

I. Une diminution de la biodiversité globale

Depuis la révolution industrielle, les activités anthropiques ont augmenté de manière exponentielle et s'accroissent d'années en années, ayant un impact négatif considérable sur les écosystèmes et les espèces qui les peuplent (Aluko et al., 2021). Si aucun effort en termes de conservation et de restauration de la nature n'est fait, ce rythme dramatique va entraîner des extinctions massives d'espèces : jusqu'à un million d'espèces seraient menacées dans les décennies à venir (500 000 plantes et animaux et 500 000 insectes), sur les quelques huit millions que comptent la Terre (WWF, 2020). Cette perte de biodiversité est déjà amorcée, avec une baisse globale de 68% entre 1970 et 2016 (Figure I.1), basé sur le suivi de 20 811 populations de 4 392 espèces (WWF, 2020). Cette tendance globale s'explique par 5 causes majeures, qui peuvent agir de manière séparée ou en synergie (Figure I.1) :



La modification des habitats (terrestres et marins) (37.2%) causée notamment par l'agriculture intensive, l'exploitation forestière, les transports avec la construction de réseaux routiers et ferroviaires, l'expansion des zones résidentielles et commerciales, la production d'énergie et l'exploitation minière. Ces activités anthropiques entraînent bien souvent une réduction de la qualité de l'habitat, sa fragmentation ou bien sa suppression. L'occupation des zones urbaines a ainsi doublé depuis 1992, un tiers des terres du globe et 75% des eaux douces de surface sont utilisées en agriculture, provoquant une perte de 2.9 millions d'hectares de forêts.



La surexploitation des ressources (23.7%) est également une cause de cette baisse de biodiversité. Elle fait surtout référence à la chasse et à la pêche non durables, au braconnage ou à la récolte abusive, dans la majorité des cas pour le commerce. A titre d'exemple, 90% des espèces de poissons marins se retrouvent maintenant en danger critique à cause de la surpêche ou bien de la surexploitation indirecte, lorsque ces espèces non-ciblées se retrouvent prises dans les filets. Cette surexploitation des ressources est aussi visible dans le domaine de l'agriculture avec la création de « zones mortes » (400 à travers le monde) due aux sols dégradés par les engrais, entraînant une perte de productivité de près de 23%.



La pollution (14.6%) au plastique, multipliée par 10 depuis 1980, ainsi qu'aux métaux lourds et autres déchets (400 millions de tonnes), rejetés dans les rivières et océans, est responsable de dégâts parfois irréversibles sur les écosystèmes. Cette pollution peut avoir des effets plus ou moins directs sur une espèce, en rendant son environnement toxique ou bien en affectant sa capacité de reproduction et de développement (LeBlanc, 2007).



Les espèces exotiques envahissantes et les maladies associées (10.5%) sont des espèces, introduites par l'Homme dans de nouvelles zones géographiques, qui entrent en compétition directe ou indirecte avec les espèces autochtones. Elles peuvent, à terme, provoquer des déplacements d'espèces ou, pire, des extinctions (Mooney and Cleland, 2001). Les effets de ces espèces exotiques envahissantes peuvent également être accentués par la dissémination de leurs parasites associés, entraînant parfois des disparitions brutales de populations. Ce fut le cas des lapins européens (*Oryctolagus cuniculus*) introduits en Australie au 18^{ème} siècle, pour l'alimentation, qui ont proliféré jusqu'aux années 1950, engendrant de graves dommages sur les écosystèmes locaux (par surpâturage, notamment) (Kerr, 2012). Face à l'ampleur de cette invasion, les autorités australiennes ont disséminé volontairement le virus du myxome (myxomatose). Les effets ont été rapides, avec une forte mortalité observée chez les lapins (Kerr, 2012). Mais plusieurs décennies après, grâce à la sélection naturelle, les populations de lapins sont redevenues abondantes et résistantes au virus, le transmettant même aux mammifères domestiques (Kerr, 2012).



Le changement climatique (13.8%) est en quelques sortes causé par la combinaison des raisons précédentes, au fur et à mesure du temps. Ceci se traduit par une augmentation des températures, obligeant certaines espèces à se déplacer afin de retrouver une niche écologique plus appropriée à leurs exigences écologiques (Sala et al., 2000). Ces changements de température peuvent aussi perturber les cycles de vie des espèces, en décalant par exemple les périodes de reproduction ou de migration. En s'appuyant sur 30 ans de données d'étude (1970-2002) sur les passereaux, Miller-Rushing et al. (2008) constatent des temps de migration raccourcis (correspondant à des distances plus courtes) et des retours plus précoces.

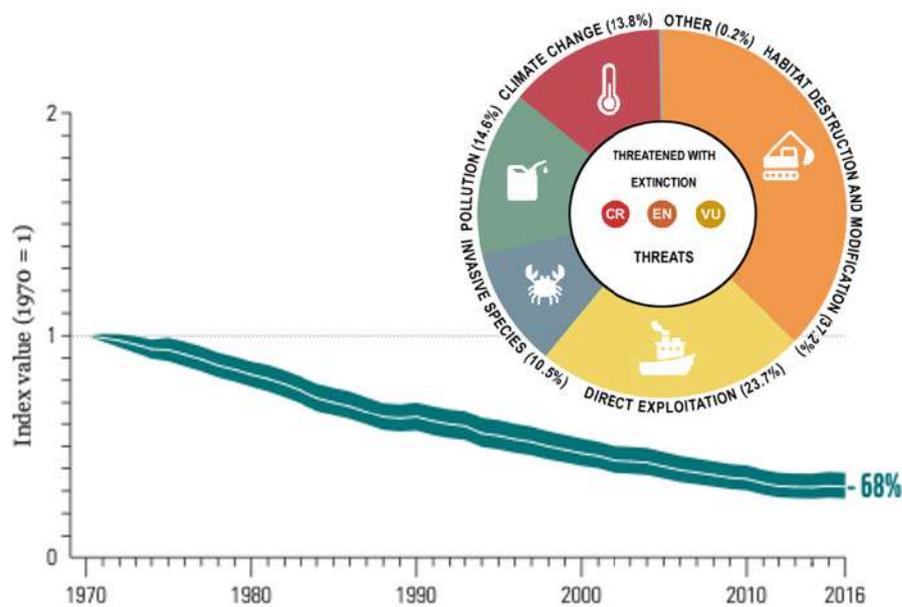


Figure I.1 : Courbe de tendance de l'état de santé de la biodiversité globale (20 811 populations représentant 4 392 espèces suivies) depuis 1970 (index value = 1) jusqu'à 2016, ainsi que les causes de cette perte de biodiversité (modifiée à partir de WWF (2020)).

Les contextes sont différents suivant les zones du globe concernées, avec une occupation et une utilisation différente du territoire, dépendant bien souvent du niveau d'industrialisation des pays mais aussi de la sensibilité des écosystèmes. Toutes les branches du vivant et toutes les classes du règne animal sont touchées (Figure I.2). Pour cela, cinq zones continentales (Amérique Latine et Caraïbes, Europe et Asie Centrale, Amérique du Nord, Afrique et enfin, Asie Pacifique) ont été dessinées. Aucune de ces zones n'échappe au déclin de la biodiversité. Cependant des pertes variables sont observées : de -24% pour l'Europe et l'Asie Centrale, la zone la plus « préservée », à -94% pour la zone Amérique Latine et Caraïbes (WWF, 2020). Pour cette dernière zone, cette perte impressionnante de biodiversité s'explique notamment par les impacts négatifs subis par les forêts, les reptiles et les espèces aquatiques d'eau douce. En effet, la cause majeure est la destruction et la fragmentation des habitats, notamment dans la forêt amazonienne au Brésil, refuge d'un très grand nombre d'espèces animales, qui a perdu jusqu'à 88% de sa végétation naturelle. Cette destruction massive a entraîné au minimum la disparition de deux espèces d'amphibiens et, menacé d'extinction 46 autres espèces (ICMBio-MMA, 2018). Cette déforestation est bien connue pour polluer les cours d'eau environnants, changeant

leurs paramètres physico-chimiques. A cela s'ajoute la modification des milieux aquatiques d'eau douce, leur fragmentation voire leur destruction, impactant un grand nombre d'espèces de reptiles et de poissons. Plus de 2 000 espèces dans la zone Amérique Latine et Caraïbes se retrouvent alors menacées (IUCN, 2020).

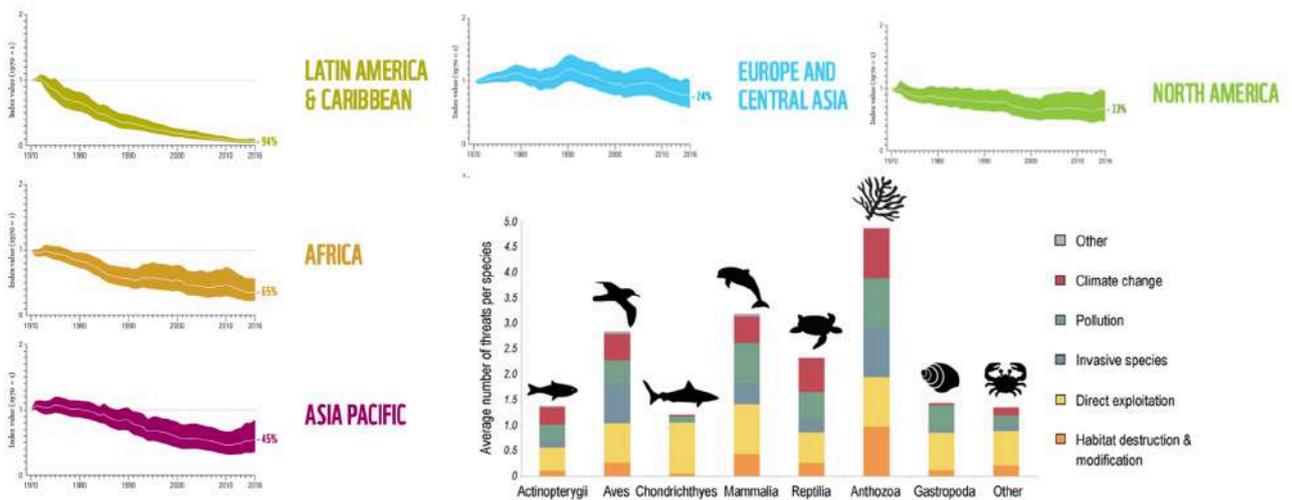


Figure I.2 : Graphiques illustrant l'évolution de la biodiversité totale au sein de chaque zone continentale, de 1970 à 2016, ainsi que le nombre moyen de menaces par espèce et leurs causes, selon les différentes familles d'animaux.

Les taux d'extinction actuels d'espèces sont tels qu'ils sont estimés 100 fois plus élevés que le taux moyen d'extinction lors des crises majeures précédentes (Lawton and May, 1996), au point que notre période soit considérée comme la 6^{ème} crise d'extinction des espèces. Cette perte de biodiversité va impacter la structure des écosystèmes et modifier les équilibres fonctionnels de ceux-ci, fruits de millions d'années d'évolution, affectant ainsi leur résilience vis-à-vis des perturbations. Ces écosystèmes deviennent alors fragilisés et moins résistants, par exemple, aux invasions biologiques, un des principaux facteurs actuels de perte de biodiversité, lié à l'augmentation des échanges à l'échelle du globe.

II. Les invasions biologiques

a. Définitions

Une invasion biologique, par définition, est « un phénomène qui correspond à l'introduction volontaire ou non par l'Homme d'espèces animales ou végétales en des lieux où elles ne sont pas naturellement présentes ». Avec l'essor des transports et l'accentuation des échanges internationaux, ce phénomène s'est largement accru et est maintenant très étudié, formant un champ disciplinaire à part entière (Liebhold et al., 1995; Mcquaid and Arenas, 2009). Ce domaine, retenant de plus en plus l'attention des scientifiques, a eu comme conséquence la création récente de journaux scientifiques, spécialisés dans le domaine des invasions biologiques, tels que *Biological Invasions*, *Management of Biological Invasions*, *NeoBiota* ou *Aquatic Invasions*. Blackburn et al. (2011) ont proposé un schéma synthétique de l'évolution, étape par étape, du processus d'invasion biologique, applicable à tous les taxons et à tous les milieux (Figure I.3). Il résulte de la rupture, par l'homme, des barrières géographiques, naturellement présentes et responsables de l'isolement des espèces entre elles. En effet, avec l'augmentation des échanges à l'échelle mondiale et grâce au développement de moyens de locomotion tels que les avions ou les bateaux, l'Homme a facilité le déplacement d'espèces, qui n'étaient pas capable de franchir ces barrières naturelles par leurs propres moyens. On parle alors d'**introduction d'espèces exotiques**. Une espèce introduite est alors directement confrontée à son nouvel environnement, et donc les espèces natives qui le peuplent. Ces dernières ont une grande importance dans le succès d'invasion : un grand nombre d'espèces natives et une forte variété fonctionnelle (prédateurs et concurrents) augmentent la résilience de l'écosystème, entraînant une plus grande résistance du milieu vis-à-vis des espèces introduites (Elton, 1958; Crawley et al., 1999). L'**établissement** d'une espèce introduite intervient lorsque celle-ci est en mesure d'effectuer son cycle de vie dans ce nouvel environnement et de s'y reproduire. Cette étape déterminante dans le processus d'invasion peut être facilitée par divers facteurs intrinsèques à l'espèce (plasticité écologique, croissance et reproduction), mais aussi à l'écosystème envahi (Chabrierie et al., 2019). Lorsque l'espèce exotique est en mesure de se reproduire, les densités de population peuvent rapidement augmenter, engendrant ainsi une forte compétition intra-spécifique et poussant donc certains individus à migrer, afin de coloniser de

nouvelles niches écologiques (Renault et al., 2018). On parle de **dispersion**. Lorsque cette phase est observée, il devient très compliqué de contenir l'invasion et l'espèce exotique envahissante va entraîner des **modifications sur l'environnement**, plus ou moins brusques et persistantes (voir III. *Impacts des espèces exotiques envahissantes d'eau douce*) (Figure I.3) (Blackburn et al., 2011; Mascaro et al., 2013; Chabrerie et al., 2019).

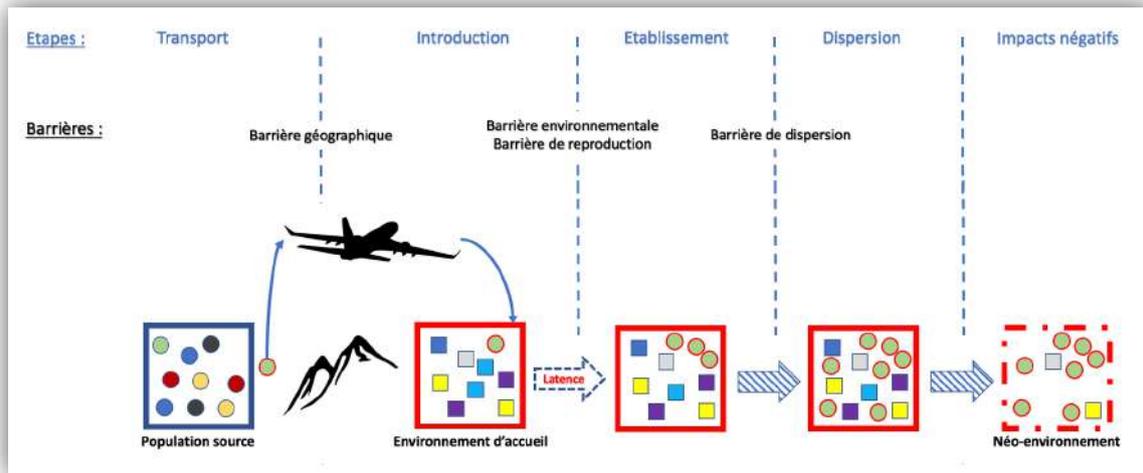


Figure I.3 : Schéma du processus d'invasion biologique, étape par étape, avec les différentes barrières qu'une espèce exotique doit franchir pour réussir à s'établir et se disperser dans son nouvel environnement d'accueil. Adapté de Blackburn et al. (2011).

Toutes les espèces transloquées ne deviennent pas automatiquement envahissantes dans le nouvel écosystème où elles ont été introduites. Le succès d'une invasion est dépendant des caractéristiques intrinsèques de l'espèce en question, mais également de celles de l'écosystème d'accueil (Chabrerie et al., 2019). Une introduction peut s'avérer être un échec si l'espèce exotique n'est pas en mesure de s'adapter aux conditions abiotiques (température, salinité, variations saisonnières) ou aux conditions biotiques (compétition pour la ressource trop forte ou présence de prédateurs) du milieu d'accueil. On parle alors de résistance du milieu vis-à-vis des invasions biologiques et de sa stabilité. Ce concept a d'abord été étudié par Elton (1958) avant d'être repris et approfondi : plus la richesse taxonomique d'un écosystème est grande, plus celui-ci est stable et donc résilient, limitant l'établissement des espèces exotiques. Ces écosystèmes stables présentent des niches écologiques saturées et donc des ressources alimentaires difficilement disponibles (Tilman, 1997; Stachowicz and

Byrnes, 2006). On y retrouve par exemple, un plus grand nombre et une plus grande variété de prédateurs et/ou de concurrents, rendant ainsi difficile l'établissement d'une espèce nouvellement introduite (Crawley et al., 1999). Cette présence de prédateurs dans le milieu d'accueil est indispensable pour le bon équilibre de l'écosystème et, est le rempart principal face aux invasions biologiques. Cette stabilité des milieux est cependant fortement mise à mal par les activités anthropiques via une artificialisation, une fragmentation ou, pire encore, une destruction des milieux naturels. Ces modifications agissent comme un catalyseur lors de l'introduction d'une espèce exotique dans ces milieux fragilisés (Bishop et al., 2017). Une érosion du milieu peut potentiellement entraîner l'extinction d'espèces natives compétitrices voire prédatrices, ce qui a pour effet de relâcher la compétition interspécifique et donc de libérer des niches écologiques, rendant le milieu plus perméable aux invasions biologiques (Davis et al., 2000; Shea and Chesson, 2002). Certains milieux, comme les écosystèmes insulaires ou les milieux aquatiques d'eau douce, du fait de leurs caractéristiques bien particulières, sont bien plus sensibles aux perturbations anthropiques que d'autres.

b. Les prérequis d'une espèce exotique envahissante

Certains traits, comme les performances (i.e. croissance, reproduction), l'originalité et la plasticité écologique semblent déterminants pour le succès d'invasion d'une espèce (Chabrierie et al., 2019). En effet, une espèce à stratégie de reproduction rapide (dite « r »), produisant une progéniture nombreuse mais avec une allocation des ressources moindre en termes de soins maternels, aura bien plus de chance de s'établir qu'une espèce à stratégie de reproduction dite « K », produisant peu de descendants, avec un fort investissement dans leur survie. En effet, cette stratégie « r », basée sur une fécondité précoce et élevée, permet d'atteindre des densités de populations suffisantes pour entrer en compétition avec les espèces locales (McMahon, 2002; Phillips, 2009). De plus, une espèce introduite présentant des différences en termes de traits vis-à-vis des espèces natives, comme pour le régime alimentaire, augmente ses chances d'établissement dans son nouvel environnement. Cette originalité lui permet de ne pas entrer en compétition directe avec les espèces

autochtones et donc de ne pas subir de chevauchement de niche écologique, dû à une redondance des traits fonctionnels (Mack, 2003). Özdilek et al. (2019) montrent l'importance de la plasticité du régime alimentaire dans l'établissement du carassin (*Carassius gibelio*, poisson envahissant en Turquie) : celui-ci est à la fois capable d'entrer en compétition avec certaines espèces locales (comme le mulot *Mugil cephalus*), mais également d'exploiter des ressources laissées libres. Enfin, un régime alimentaire omnivore, généraliste, est également un atout considérable pour une espèce introduite, qui peut ainsi se nourrir d'une plus large gamme de proies, aussi bien végétales qu'animales, évitant ainsi une pression de compétition trop forte (Romanuk et al., 2009).

c. La nature et les causes de ces introductions

Les espèces transloquées volontairement par l'homme sont en général liées à des activités ayant une valeur marchande comme l'aquaculture, la lutte biologique, l'ornementation, ou encore l'aquariophilie (Mcquaid and Arenas, 2009). Une fois transloquées sur de nouveaux territoires, ces espèces peuvent se retrouver dans le milieu naturel de manière volontaire ou accidentelle. Comme par exemple, en Inde, où le Tilapia (*Oreochromis niloticus*) a été introduit et est élevé dans le but de nourrir certaines espèces carnivores de poissons ou de crabes, comme le crabe de mangroves (*Scylla serrata*) (Prabu et al., 2019). Les introductions volontaires peuvent également avoir des buts récréatifs comme la pêche sportive (Haury and Pattee, 1997). La perche du Nil (*Lates niloticus*) ou encore le sanglier (*Sus scrofa*) font également partie de cette liste et ont été introduits dans de nombreuses régions du monde, pour des besoins récréatifs. La perche, espèce carnassière, est très appréciée en pêche sportive pour ses mensurations impressionnantes, pouvant atteindre 180 centimètres pour 250 kilogrammes. Originnaire du Nil, elle fut introduite dans d'autres lacs tropicaux, où elle engendra de gros dommages sur la biodiversité locale, par prédation (Lowe et al., 2000). Pour le sanglier, originaire d'Afrique du Nord, d'Asie et d'Europe, les circonstances sont similaires, avec une introduction sur presque tous les continents du monde à des fins de chasse sportive (Lowe et al., 2000). De telles introductions ont également été réalisées dans le cadre de lutte biologique. Ainsi, les gambusies, aussi appelées « guppy sauvage » (*Gambusia affinis*), ont été introduites à travers le monde,

afin de réguler les populations de moustiques, vecteurs de nombreuses maladies (Simberloff and Stiling, 1996). Cependant, ces guppy furent responsables du déclin (voire de l'extinction) de nombreuses espèces natives, par compétition et prédation (Simberloff and Stiling, 1996). Le crapaud buffle *Rhinella marina* a également été introduit dans de nombreuses régions du monde, notamment les Caraïbes et l'Australie, en tant qu'agent de lutte biologique contre les ravageurs de la canne à sucre. Le crapaud a proliféré sur les territoires envahis, concurrençant et prédatant les espèces locales, sans pour autant avoir l'effet escompté sur le nuisible, entraînant une forte baisse de biodiversité (Tyler, 1976, 1989). La jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*), native d'Amérique du Sud, et l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*), originaire d'Eurasie, ont été, pour leurs parts, introduits plutôt à des fins ornementales, avant de proliférer dans les environnements envahis et de provoquer des dégâts considérables (Lowe et al., 2000; Patel, 2012). En ce qui concerne les espèces aquatiques, l'aquariophilie est probablement l'une des activités responsables d'un nombre important d'introduction, car de nombreux propriétaires d'animaux les rejettent dans le milieu naturel lorsqu'ils veulent s'en séparer (Kraus, 2009). L'un des exemples les plus iconique est celui de la tortue de Floride (*Trachemys scripta elegans*) : cette espèce, très appréciée en aquariophilie, a été massivement élevée et transloquée à travers le monde, à la fin du 20^{ème} siècle (Cadi and Joly, 2003). Elle se retrouve maintenant établie sur tous les continents (excepté l'Antarctique), entrant en compétition avec les espèces locales (Banha et al., 2017).

Les introductions accidentelles peuvent être causées par de la négligence dans des élevages, engendrant la fuite de certains individus (exemple du vison d'Amérique *Neovison vison* en Europe), ou lors de transport à but commercial ou non (exemple du frelon Asiatique *Vespa velutina*). Par exemple, le trafic commercial maritime, via les coques des bateaux, les eaux de ballastes (favorisant la dispersion d'organismes fixés tels que les mollusques) ou les soutes (dans lesquelles peuvent s'introduire des insectes et des rongeurs), a largement favorisé la dispersion d'espèces à travers tous les continents (Hauray and Pattee, 1997). Zenetos et al. (2012) ont tenté de quantifier la part de chaque activité pour l'introduction d'espèces envahissantes marines dans la mer Méditerranée. Ainsi, ils ont estimé que les corridors, et notamment ici le Canal de Suez,

étaient responsables de 54% des introductions d'espèces envahissantes, en permettant le passage, et donc la migration des espèces aquatiques, entre la Mer Rouge et la Mer Méditerranée. Venaient ensuite le transport maritime, via les cargos (fret), responsable de 44.9% des introductions biologiques, l'aquaculture à hauteur de 12% (notamment les macrophytes et les bivalves associés), l'aquariophilie 2% et d'autres raisons pour 0.4% (commerce d'aliments vivants par exemple) (Zenetos et al., 2012).

Tous ces phénomènes sont plutôt récents et se traduisent par une explosion des détections de nouvelles espèces envahissantes. Seebens et al. (2017), grâce à l'analyse de plus de 45 000 signalements de 16 000 espèces différentes tous taxons confondus jusqu'aux années 2000, ont montré une augmentation significative de ces invasions depuis le début du 20^{ème} siècle et encore plus depuis les années 1970, période représentant 37% des hausses à elle seule (Figure I.4). Des exemples existent dans toutes les branches du vivant et sur tous les continents du globe. Cependant, de très fortes variations sont observées, en termes de nombres de signalement d'espèces envahissantes selon les continents, mais aussi les groupes taxonomiques considérés : l'Océanie et plus précisément l'Australie semblent particulièrement impactée par les invasions de plantes vasculaires (plus de 1000 espèces recensées) et de mammifères (plus de 50 espèces recensées), ce qui n'est pas le cas de l'Amérique du Sud, pourtant située sur le même hémisphère, avec des conditions climatiques proches. Au contraire, l'Océanie recense une présence moindre, comparé à d'autres zones du globe, des espèces exotiques de poissons (moins de 20 espèces recensées) (Seebens et al., 2017). Ces variations inter-continentales peuvent s'expliquer simplement par l'Histoire coloniale qui les concerne. En effet, durant le 19^{ème} siècle, l'Océanie et l'Amérique du Nord ont été des territoires très convoités par les colons qui ont introduit des espèces exotiques, à des fins ornementales (comme l'étourneau sansonnet *Sturnus vulgaris*) (Patel, 2012) ou pour l'alimentation (comme le lapin européen *Oryctolagus cuniculus* en Australie) (Fenner, 2010), entraînant une explosion des taux de premiers enregistrements d'espèces exotiques (Figure I.4). En ce qui concerne les variations entre taxons, plusieurs tendances se dégagent. Malgré quelques exceptions, comme les écrevisses exotiques, en Europe, pour lesquelles les nouvelles détections ne cessent d'augmenter (Kouba et al., 2014; Grandjean et al., 2021), les premiers chiffres d'après

l'année 2000 semblent montrer une baisse globale, tous taxons confondus, du nombre de nouvelles détections (Seebens et al., 2017). Ceci est très certainement dû à une prise de conscience générale sur la gravité de la situation et l'importance des invasions biologiques dans le dérèglement climatique, mis en lumière dans un grand nombre d'études depuis la fin du 20^{ème} siècle. C'est surtout le cas pour les mammifères et les poissons (Figure I.4) : le nombre de constations, avec respectivement 19 et 104 signalements, sont en forte baisse pour la période 1996-2000. Ce chiffre relativement haut pour les poissons peut s'expliquer majoritairement par les mouvements d'espèces d'un écosystème à l'autre via les corridors ou les canaux, ce qui rend leurs mouvements quasiment incontrôlables (Zenetos et al., 2012; Seebens et al., 2017). Ce déclin résulterait notamment d'une part d'une réduction du nombre d'introduction délibérées, comme les gibiers ou les poissons pour les activités de chasse et de pêche sportives. En effet, les réglementations en termes d'introductions et d'élevages d'animaux ont été durcies, freinant inévitablement le nombre d'évasions (Pears, 1982; di Castri, 1989; Seebens et al., 2017). Par exemple, au niveau européen, de nombreuses mesures législatives ont été adoptées et sont mises à jour régulièrement, afin de prévenir le risque d'introductions délibérées (Regulation EU 1143/2014).

Concernant les plantes vasculaires, après une forte augmentation durant le 19^{ème} siècle, le nombre de signalements d'espèces exotiques envahissantes est resté stable et très élevé, jusqu'aux années 2000, avec plus de 600 signalements dans le monde pour la période 1996-2000. Cette tendance est contraire à celle observée pour les autres groupes taxonomiques et s'explique par une intensification du commerce mondial (Seebens, 2015), et une demande toujours plus élevée de plantes exotiques dans l'agriculture, les jardins botaniques et les jardins privés (Hulme, 2015). Ceci est d'autant plus inquiétant, que les plantes vasculaires composent le groupe taxonomique avec le plus d'espèces exotiques envahissantes recensées (37%), devant les invertébrés terrestres (17%), les mammifères (14%) et les invertébrés aquatiques (9%) (Figure I.4 et I.5) (WWF, 2020).

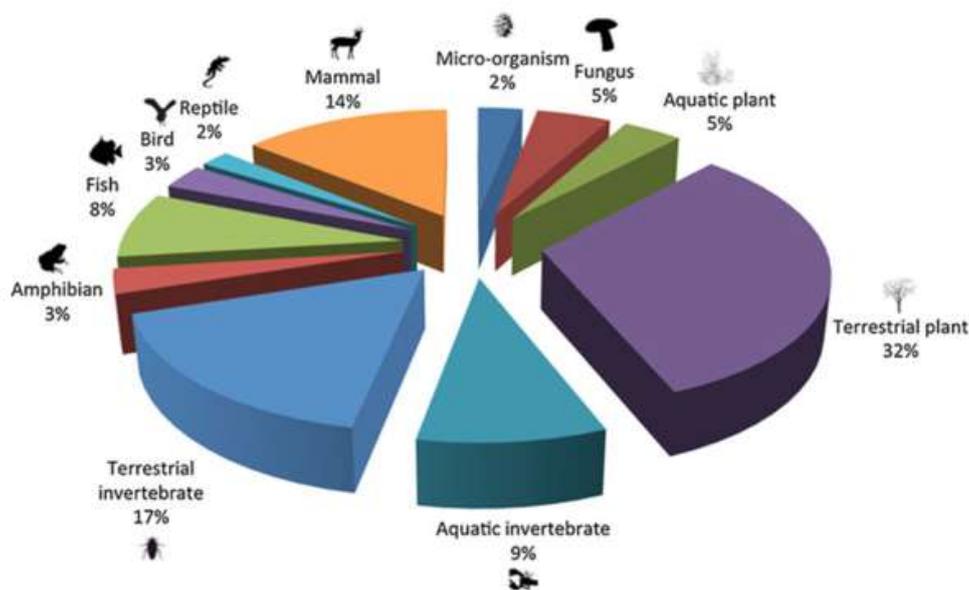


Figure I.5 : Proportion du nombre d'espèces exotiques envahissantes recensées parmi les groupes taxonomiques majoritaires (WWF, 2020).

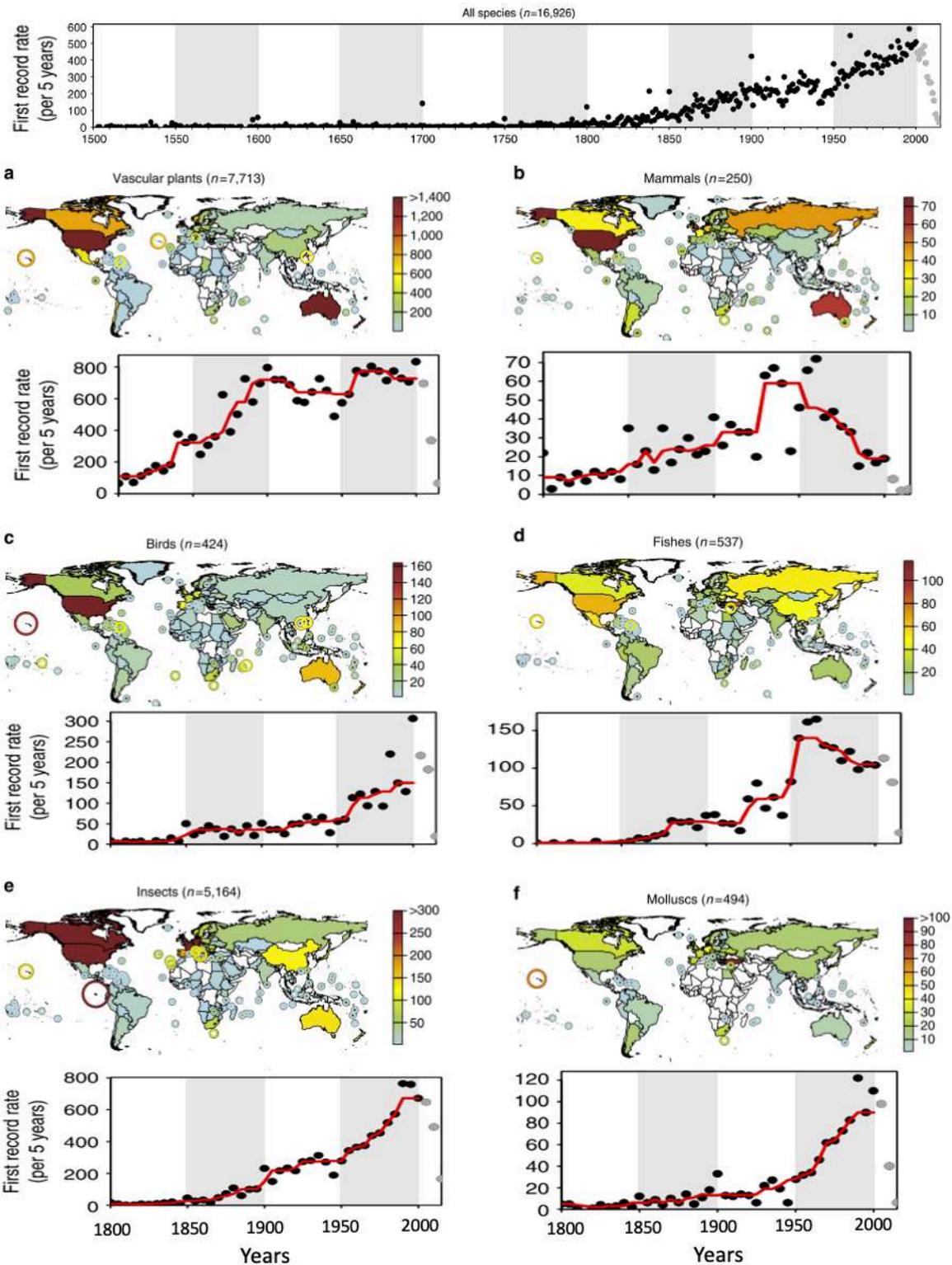


Figure 1.4 : Nombre d'espèces exotiques envahissantes enregistrées par région (cartes géographiques) et par groupes taxonomiques : a) Plantes vasculaires, b) Mammifères, c) Oiseaux, d) Poissons, e) Insectes et f) Mollusques. Les graphiques correspondent à l'évolution du nombre de détections d'espèces envahissantes du groupe considéré, au fil du temps, de 1800 à 2000 (les données après 2000 étant incomplètes à cause des délais de traitement et de publications). Le graphique supérieur traduit l'évolution du nombre total d'enregistrement d'espèces envahissantes, tous groupes confondus. Modifié à partir de Seebens et al. (2017).

d. Les milieux aquatiques d'eau douce et les écosystèmes insulaires

Les milieux aquatiques d'eau douce et les écosystèmes insulaires présentent des caractéristiques bien particulières et sont parmi les plus sensibles sur Terre, nécessitant d'importants efforts en termes de conservation (Vitousek et al., 1996; Myers et al., 2000; Flitcroft et al., 2019; Chabrierie et al., 2019). Ils représentent moins de 0.8% de la surface totale du globe mais constituent l'habitat d'au moins 6% des espèces connues (et de nombreuses autres encore probablement à découvrir)

(Michelet, 2017). Les activités anthropiques non durables ont eu un impact considérable, ces dernières années, sur les écosystèmes d'eau douce du monde entier, avec une perte estimée de 84% de la biodiversité depuis 1970 et près d'une espèce sur trois menacées d'extinction, tous taxons confondus (Magurran, 2009; WWF, 2020) (Figure I.6). Ceux-ci sont confrontés à une large variété de menaces (Magurran, 2009) : les changements hydromorphologiques, tels que les curages, les barrages ou les prélèvements, la détérioration de la qualité de l'eau (par exemple, l'utilisation de produits polluants pour les cultures, entraînant une eutrophisation du milieu). La dégradation et la fragmentation de l'habitat avec l'installation de canalisations, pour contrôler les épisodes d'inondations, ou le changement d'affectation des terres sur le bassin versant font également partie de ces menaces. Tout ceci fragilise le milieu en affectant la distribution et la composition des communautés autochtones, en perturbant parfois les schémas migratoires et les cycles de vie associés (Magurran, 2009; Engman and Ramirez, 2012). Ces perturbations peuvent libérer des ressources et rendre la niche écologique concernée bien plus perméable aux envahisseurs, introduits dans ces milieux majoritairement via les activités aquariophiles (21% des introductions mondiales de poissons d'eau douce) et l'aquaculture (Gherardi et al., 2008; Nunes et al., 2015; Rodríguez-Barreras et al., 2020).

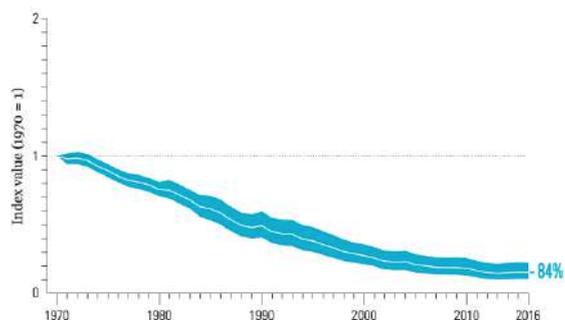


Figure I.6 : Évolution de la biodiversité en eau douce dans le monde entre 1970 et 2016. 3741 populations d'eau douce, représentant 944 espèces différentes ont été suivies avec une perte estimée à 84% (WWF, 2020).

L'équilibre des écosystèmes insulaires, et notamment d'eau douce, est d'autant plus fragile. On y retrouve, en général, une faible diversité spécifique avec souvent une absence de prédateurs et des réseaux trophiques peu complexes (Nivet et al., 2010). Ils présentent également de plus faibles superficies que les écosystèmes continentaux, abritant ainsi des populations moins importantes en termes d'individus, avec une diversité génétique moins prononcée, des exigences écologiques très strictes et donc une plus forte sensibilité à la moindre perturbation (Vitousek et al., 1996; Myers et al., 2000). Cette haute sensibilité est également expliquée par un éloignement des écosystèmes continentaux, responsable de l'isolement des populations (Myers et al., 2000; Hughes, 2006; Raposeiro et al., 2012). Ces écosystèmes insulaires sont soumis, depuis l'époque de la colonisation, à des pressions, provenant de l'exploitation de leurs ressources et l'importation d'espèces exotiques à des fins ornementales ou commerciales (Connor et al., 2012). Ces activités se sont accrues de manière exponentielle jusqu'à notre époque, contribuant donc à un accroissement du nombre d'invasion (Raposeiro et al., 2009, 2017; Costa et al., 2021). Ceci peut conduire à une prépondérance des espèces exotiques envahissantes à des échelles spatiales importantes. Par exemple, à Puerto Rico, Rodríguez-Barreras et al. (2020) ont caractérisé près de 50 espèces de poissons d'eau douce, avec seulement 20% d'espèces indigènes. Une fois introduites, ces espèces exotiques envahissantes profitent de leur avantage concurrentiel et de leurs capacités de prédation pour s'installer de manière pérennes, entraînant des impacts négatifs sur le milieu d'accueil.

III. Impacts des espèces aquatiques envahissantes

Ces espèces exotiques envahissantes ont des impacts multiples sur les écosystèmes et leurs communautés, de manière plus ou moins directe, suivant l'espèce considérée et ses caractéristiques en termes d'alimentation et de comportement.

a. La modification de l'habitat

Certaines espèces dites « ingénieur de l'environnement » peuvent avoir des impacts sur **l'hydromorphologie et les propriétés physico-chimiques** du milieu aquatique. Jones et al. (1994) attribuent ce terme à des organismes qui « modulent directement ou indirectement la biodisponibilité des ressources pour d'autres espèces, en provoquant des changements d'état physique des matériaux biotiques ou abiotiques ». Ces espèces ingénieurs interagissent donc avec les autres espèces par d'autres moyens que la chaîne trophique, en « générant leur propre habitat, qui n'existerait pas sans elles » (Jones et al., 1997). Ces modifications de l'habitat peuvent avoir, suivant les espèces considérées, des effets significatifs, positifs ou négatifs, sur le fonctionnement de l'écosystème (Jones et al., 1997). Rong et al. (2021) montrent l'effet positif du corbicule envahissant (*Corbicula fluminea*), une espèce filtreuse de bivalve, sur la qualité de l'eau : en seulement 70 jours, la présence de cette espèce dans le milieu induit une baisse de l'abondance des rotifères et des communautés de planctons, provoquant une augmentation significative de la qualité de l'eau et notamment de sa transparence.

A l'inverse, les Loricariidae, communément appelés poisson-chat, de la famille de Siluriformes, ont un effet négatif sur l'écosystème. Ces poissons creusent les berges pour y établir leurs nids (Hoover et al., 2014; Orfinger and Goodding, 2018). Cette activité de creusement engendre une fragilisation des berges, menant à un effondrement. La largeur des cours d'eau s'en retrouve alors augmentée, diminuant ainsi la hauteur de la lame d'eau et ralentissant sa vitesse d'écoulement. Ces effondrements de berges provoquent des pertes de ripisylves (d'une importance écologique majeure) et une augmentation des matières en suspension dans l'eau.

Cette augmentation de la présence de matières en suspension peut également être provoquée par l'activité fousseuse importante de certaines espèces de poissons, telles

que le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (Zhang et al., 2017) ou la carpe commune (*Cyprinus carpio*) (Weber and Brown, 2011). Dans les deux cas, une **augmentation de la turbidité** est constatée, ainsi qu'une augmentation de l'azote et du phosphore, favorisant la prolifération des algues (Weber and Brown, 2011; Zhang et al., 2017). La présence de la carpe induit également une réduction de la concentration en oxygène dissous et un changement des valeurs de pH (Weber and Brown, 2011). Certaines espèces, comme les Loricariidae, sont capables de fixer le phosphore (élément nécessaire au renforcement de leur squelette cartilagineux) et leur présence en grandes densités d'individus entraînent une chute des taux de phosphore dans l'environnement, ce qui a pour effet de booster le développement d'algues (Capps and Flecker, 2013a, 2013b; Rubio et al., 2016). Ceci va entraîner la transformation d'écosystèmes aquatiques limpides, à dominance macrophytique, en des néo-écosystèmes turbides, à dominance phyto-planctonique, auxquels certaines espèces natives ne sont pas adaptées.

b. Des espèces vectrices de pathogènes

Certaines espèces exotiques envahissantes bénéficient de leur capacité à véhiculer des agents pathogènes ou parasites, qui sont inoffensifs pour l'hôte envahissant, mais qui peuvent avoir des conséquences dramatiques pour les espèces indigènes (Chabrierie et al., 2019). On parle ici de « *biological weapon* » dans le cadre des invasions biologiques, qui vont alors conférer un avantage à l'envahisseur, même si l'espèce indigène est initialement mieux adaptée à l'environnement (Vilcinskas, 2015; Chabrierie et al., 2019). Ces agents pathogènes peuvent appartenir à différents taxons comme des nématodes, des champignons ou des virus. Par exemple, l'introduction de l'anguille asiatique (*Anguilla japonica*) et de son nématode parasite *Anguillicola crassus* a entraîné un fort déclin des populations d'anguilles européennes (*Anguilla anguilla*) (Poulin et al., 2011). *Anguillicola crassus* est naturellement présent chez l'anguille japonaise (*A. japonica*) et a été introduit conjointement à son hôte par des aquaculteurs européens au début des années 1980 (Nagasawa et al., 1994). Le nématode, une fois présent dans l'hôte, va pondre ses œufs dans la vessie natatoire et affecter ainsi sa survie, sa fertilité et sa croissance (Nagasawa et al., 1994).

La chytridiomycose est une maladie provoquée par le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis*, qui a contribué au déclin important des populations d'amphibiens dans le monde (Stuart et al., 2004; Fisher et al., 2009). Les symptômes se traduisent par une phase de léthargie, dès la métamorphose chez les adultes, et une desquamation de la peau, qui sera fatale aux individus touchés (Fisher et al., 2009; Schloegel et al., 2012). L'origine de ce pathogène est peu connue mais il semblerait qu'elle soit disséminée par la grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*) et le xenope lisse (*Xenopus laevis*), qui y sont moins vulnérables (Kilpatrick et al., 2010; Secondi et al., 2016). Avec le développement des échanges internationaux, le champignon a pu être dispersé partout dans le monde, entraînant en moins de 30 ans, la disparition de 120 espèces et la régression de 435 autres (Stuart et al., 2004; Fisher et al., 2009). Sa persistance dans l'environnement, en dehors de l'hôte, rend la lutte compliquée (Kilpatrick et al., 2010).

c. La compétition pour les ressources

Les espèces exotiques envahissantes, lorsqu'elles entrent en contact avec leur environnement d'accueil, vont rapidement se retrouver en **compétition** avec les espèces natives pour la nourriture mais aussi les caches. van Kessel et al. (2011) ont étudié les effets d'une invasion de plusieurs espèces de Gobiidae, le gobie demi-lune (*Proterorhinus semilunaris*), le gobie à taches noires (*Neogobius melanostomus*), le gobie de Kessler (*N. kessleri*) et le gobie fluviatile (*N. fluviatilis*) sur **l'occupation des caches** disponibles dans les fleuves Rhin et Meuse en Europe occidentale. Ces espèces de poissons, tout comme les espèces natives, le chabot (*Cottus perifretum*) et la loche (*Barbatula barbatula*), affectionnent particulièrement ces zones calmes pendant une période de leur vie, et leur disponibilité limitée doit nécessairement entraîner une compétition pour cette ressource. Grâce à des expériences de compétition, ils ont pu mettre en évidence une plus grande efficacité dans l'acquisition des caches par les espèces exotiques, ainsi qu'un déplacement des espèces autochtones vers des zones moins favorables (van Kessel et al., 2011). Ces relations de compétition sont également observées lors des prises alimentaires : Martin et al. (2010) ont mis en évidence un déplacement de populations de poisson-lune à taches rouges (*Lepomis miniatus*) dans le Golfe du Mexique, à la suite de l'introduction du tilapia du Nil (*O. niloticus*), en

compétition pour les mêmes **ressources alimentaires**. Polo-Cavia et al. (2011) ont démontré une acquisition des ressources alimentaires plus efficace chez la tortue de Floride envahissante (*Trachemys scripta elegans*), en compétition avec l'émyde lépreuse, tortue endémique d'Espagne (*Mauremys leprosa*).

Enfin, ces relations de compétition peuvent également intervenir dans la **recherche de partenaires**. Certaines espèces, très proches génétiquement, peuvent s'hybrider lorsqu'elles se retrouvent dans le même environnement. Par exemple, l'espèce de vairon d'eau douce *Pseudorasbora parva*, originaire de l'ouest du Japon, a été introduite accidentellement dans la partie est du Japon, accueillant naturellement une autre espèce de vairon (*P. pumila*). En 30 ans, l'espèce introduite, *P. parva*, a largement remplacé l'espèce autochtone, notamment à cause de phénomène d'hybridation unidirectionnelle (Konishi and Takata, 2004). Dans la zone de contact des deux espèces, seuls des hybrides de première génération (F1), présentant exclusivement des haplotypes d'ADN mitochondrial de *P. pumila*, ont été détectés. Les données indiquent que les hybrides F1 sont stériles et résultent de l'accouplement uniquement entre des femelles *P. pumila* (native) et des mâles *P. parva* (invasif) (Konishi and Takata, 2004).

d. Les relations de prédation

Les espèces exotiques envahissantes ont également des effets directs sur les communautés autochtones, par un comportement de **prédation**. La perche du Nil en est un bon exemple : elle a été introduite dans de nombreuses régions d'Afrique pour la pêche, dès les années 1950 (Goudswaard et al., 2008). Les populations se sont établies et ont commencé à croître, avec une recrudescence observée à partir du début des années 1970, accompagnée d'un fort déclin des populations de cichlidés autochtones (Goudswaard et al., 2008). Malgré un arrêt définitif de la pêche de ces cichlidés natifs, ils ont disparu définitivement à la fin des années 1980 et la perche du Nil est devenue la principale biomasse des grands lacs d'Afrique, où elle avait été introduite (Victoria, Kyoga, Nabugabo notamment) (Ogutu-Ohwayo, 1993; Goudswaard et al., 2008).

L'introduction dans la mer Caspienne du cténophore *Mnemiopsis leidy*, originaire des Etats-Unis, a provoqué une perte dramatique de populations de poissons, y compris l'anchois (*Engraulis encrasicolus*), d'une valeur commerciale importante (Finenko et

al., 2006). Cette espèce de cténophore omnivore à tendance prédatrice a pu s'acclimater rapidement à son nouvel environnement, très dégradé par la surpêche, où elle ne trouvait aucun prédateur. Il a pu ainsi atteindre des densités de population impressionnantes, se nourrissant jusqu'à épuisement des ressources, de zooplancton et de petits poissons, entraînant jusqu'à 75% de pertes de ressources localement (Finenko et al., 2006). A cause de ces relations de prédation, toute la chaîne trophique peut se retrouver déstabilisée, par des effets en cascade (Weis, 2011). Ce même cténophore (*Mnemiopsis leidyi*), en entrant en compétition avec les espèces locales pour certaines ressources et en réduisant leur disponibilité (comme le zooplancton), a provoqué l'effondrement de certaines populations de poissons, de dauphins et de phoques de la mer Caspienne (Finenko et al., 2006; Weis, 2011). A l'inverse, les populations de phytoplancton, libérée de la pression de broutage de certaines espèces de poissons, ont augmenté (Finenko et al., 2006; Weis, 2011). Ceci a eu comme effet de provoquer une homogénéisation de la biodiversité, avec une explosion des populations de zooflagellés (Finenko et al., 2006; Weis, 2011).

IV. Le coût des espèces exotiques envahissantes

Les espèces exotiques envahissantes sont responsables d'une perte économique mondiale colossale (Diagne et al., 2020; 2021; Cuthbert et al., 2021; Moodley et al., 2022). Afin de mettre en lumière l'importance d'empêcher toute introduction d'espèce exotique, de nombreuses études, depuis le début du 21^{ème} siècle, ont cherché à compiler les coûts engendrés par ces espèces exotiques envahissantes, à large échelle (Pimentel et al., 2000, 2005; Kettunen et al., 2009; Hoffmann and Broadhurst, 2016). Cependant, les coûts sont difficilement quantifiables, tant les impacts des espèces exotiques envahissantes peuvent être plus ou moins visibles (Moodley et al., 2022). Ils sont majoritairement engendrés par des financements pour la recherche scientifique, nécessaire à la compréhension de l'espèce ciblée, mais aussi la régulation et la lutte contre l'invasion. La gestion des zones non-envahies et l'isolement des zones envahies entraînent également des coûts importants. Toutes ces dépenses associées à la gestion et l'éradication d'une espèce envahissante sont à additionner aux coûts qu'elles

engendrent sur les infrastructures agricoles notamment, comme l'assèchement des bassins ou des canaux d'irrigations.

Grâce à la base de données InvaCost (Diagne et al., 2020) et l'analyse prudente d'environ 850 études, couvrant près de 2500 entrées chiffrées, une étude a pu estimer le coût total des invasions biologiques mondiales à 1288 milliards de \$US entre 1970 et 2017 (Diagne et al., 2021). Ces coûts ne sont pas répartis de manière équitable au cours du temps et se sont accrus au fur et à mesure des décennies, affichant une multiplication par trois des coûts, tous les 10 ans, pour atteindre près de 163 milliards de \$US en 2017 seulement (Figure I.7) (Diagne et al., 2021). Il apparaît que le coût lié aux dommages provoqués par les invasions biologiques sont 13 fois supérieurs à ceux engendrés par les frais de gestion des espèces exotiques envahissantes (coûts cumulés de 892.2 milliards de \$US contre 66.3 milliards de \$US sur la période 1970-2017).

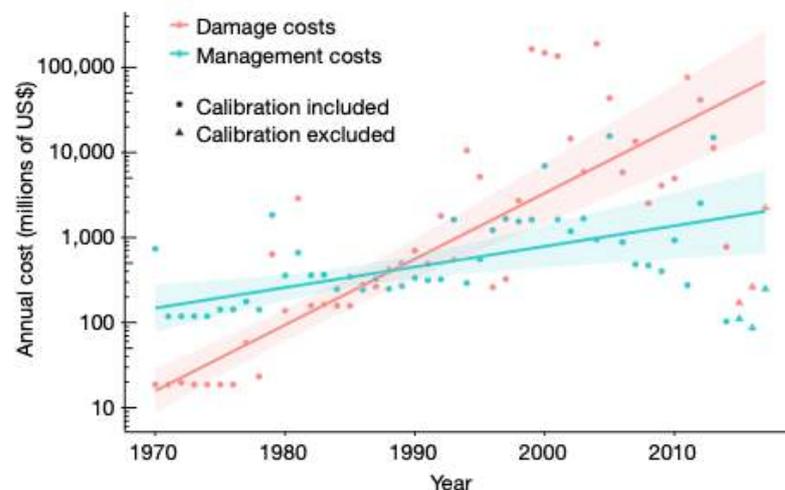


Figure I.7 : Tendances temporelles des coûts mondiaux des dommages et de la gestion (en millions de dollars US 2017) des invasions biologiques sur la base des coûts annuels moyens pour chaque décennie et des prévisions du modèle entre 1970 et 2017 (Diagne et al., 2021).

Il est important de noter que ces coûts sont malheureusement largement sous-estimés. Premièrement, l'étude des espèces exotiques envahissantes est une science plutôt récente, or celles-ci sont détectées depuis maintenant plusieurs siècles, avec des impacts enclenchés il y a bien longtemps et alors non évalués. Deuxièmement, les données disponibles sont géographiquement et taxonomiquement inégales (79% des données sont issues des régions d'Amérique du Nord, d'Océanie et d'Europe ; et 76%

sont liées à des taxons animaux). Pour l'inégalité géographique, ceci s'explique majoritairement par le développement et la coordination de la recherche, qui peuvent être plus ou moins organisés/financés selon le niveau de développement (et de priorité du domaine de la recherche) de la zone concernée. Il existe également des contraintes logistiques et linguistiques, avec des rapports non-identifiés ou inaccessibles dans la littérature grise (Diagne et al., 2021). Pour les inégalités taxonomiques, les espèces animales exotiques envahissantes semblent plus étudiées, d'où le grand nombre de références en termes de coûts des invasions. Cependant, certains coûts non reportés précisément (comme en zone Africaine par exemple ou en Asie), d'espèces d'insectes (comme le moustique *Aedes spp*), gonfleraient inévitablement les coûts globaux des invasions biologiques (Diagne et al., 2021).

Parmi ces 1288 milliards de \$US, les espèces exotiques envahissantes aquatiques représentent à elles seules 345 milliards de \$US de coûts globaux (Cuthbert et al., 2021). Ceux-ci sont certainement sous-évalués, du fait que ces écosystèmes aquatiques sont moins étudiés que les écosystèmes terrestres et que là encore, les données pour l'Amérique du Sud, l'Afrique ou l'Océanie ne sont pas disponibles. Ils représentent malgré cela plus d'un quart des coûts engendrés par les invasions biologiques (Cuthbert et al., 2021). Les crustacés invasifs sont parmi les taxons les plus importants de ces milieux, avec des impacts prouvés sur les communautés autochtones (Kouba et al., 2022). Parmi eux, les écrevisses sont celles avec l'espérance de vie la plus longue et la plus grande taille (Souty-Grosset et al., 2006). Grâce à cette taille imposante et en atteignant de larges densités de populations dans le milieu naturel, elles peuvent induire une forte pression sur leur environnement d'accueil via la prédation ou la compétition pour la ressource (Reynolds et al., 2013; Twardochleb et al., 2013), avoir un impact négatif sur les services écosystémiques (Lodge et al., 2012) ou encore transmettre des pathogènes et des maladies (Longshaw, 2011). Entre 2000 et 2020, les écrevisses exotiques envahissantes ont engendré 120.5 millions de \$US de dépenses et de pertes (Kouba et al., 2022). Ces coûts sont principalement attribués aux Astacidae et aux Cambaridae (99%), dont les espèces *P. leniusculus*, *P. clarkii* et *O. rusticus* font partie. Il existe cependant un fort biais dans ces données : les principales entrées chiffrées proviennent d'Europe (116.4 millions de \$US ; 96.6% des coûts attribués aux

invasions d'écrevisses) et notamment des pertes issues de l'invasion des écrevisses américaines et de leur pathogène associé *A. astaci* (Diagne et al., 2020; Kouba et al., 2022), malgré l'augmentation des invasions d'écrevisses partout dans le monde (Lodge et al., 2012). Par exemple, aucun coût n'a été enregistré en Afrique, alors que le continent recense neuf espèces d'écrevisses exotiques envahissantes. Celles-ci entraînent jusqu'à 30% de pertes sur les captures aux filets dans les plaines de Zambie, en raison de la présence de *C. quadricarinatus*, affectant le recrutement des poissons et obligeant les pêcheurs à accroître leur effort de pêche (Madzivanzira et al., 2020). Les données sur le coût de la famille des Parastacidae sont également sous-estimées aux vues de leur omniprésence dans les voies d'introduction telles que l'aquaculture ou l'aquariophilie (avec *C. destructor* ou *C. quadricarinatus*) et les preuves de leur établissement dans de nouveaux écosystèmes partout dans le monde (Haubrock et al., 2021; Madzivanzira et al., 2020).

La majorité des coûts associés aux écrevisses exotiques envahissantes sont alloués à la perte de ressources ou bien la réparation des dommages (« damage-costs » ; 79.9%), et la surveillance, la prévention, le contrôle et l'éradication de ces mêmes espèces (« management-costs » ; 15.3%) (Figure I.8) (Kouba et al., 2022). La majorité des coûts impacte donc des secteurs dits « mixtes », à hauteur de 91.6 millions de \$US (76.1%) ; les autorités locales (\$16.9 millions de \$US; 11.7%) responsables de la réparation des dommages sur les infrastructures et de la surveillance des invasions ; l'aquaculture (8.5 millions de \$US; 7.1%) avec les pertes associées à l'assèchement de bassins d'élevage ou la destruction des productions par les pathogènes ; et enfin l'agriculture (1.2 millions de \$US; <1%) avec la destruction des cultures de riz par l'assèchement des bassins (Figure I.8) (Kouba et al., 2022).

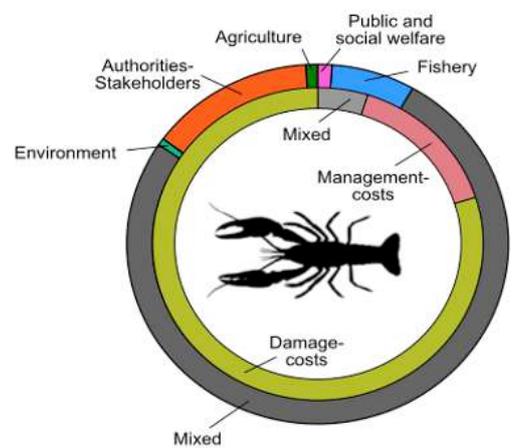


Figure I.8 : Répartition des coûts totaux des écrevisses exotiques envahissantes et les différents secteurs impactés (Kouba et al., 2022).

Ces impacts sont bien souvent sous-estimés et l'adoption d'approches de précaution et de régulation semble indispensable, tant les coûts engendrés par ces espèces envahissantes sont importants (Manchester and Bullock, 2000). Ainsi, des efforts sur les contrôles aux frontières et sur la communication autour de ces impacts permettraient de limiter ces introductions. Le développement d'outil de veille écologique (méthode ADN environnemental) permettrait d'agir précocement en mettant en place des opérations de contrôle voire d'éradication, afin de limiter les coûts liés à ces pratiques.

V. Les écrevisses exotiques envahissantes

Parmi les introductions en milieu d'eau douce, le groupe des écrevisses revêt une importance considérable, tant par le nombre d'espèces, que par l'échelle géographique impliquée (Kouba et al., 2014). Initialement introduites pour des raisons d'aquaculture, elles ont vu le nombre de leurs introductions considérablement augmenter, au travers des activités aquariophiles, depuis la fin du 20^{ème} siècle (Lodge et al., 2012). Une recherche bibliographique effectuée sur une dizaine d'année montre une explosion des articles scientifiques concernant les écrevisses exotiques, avec une croissance exponentielle (Figure I.9). Ceci montre à quel point le sujet est devenu préoccupant et à prendre au sérieux.

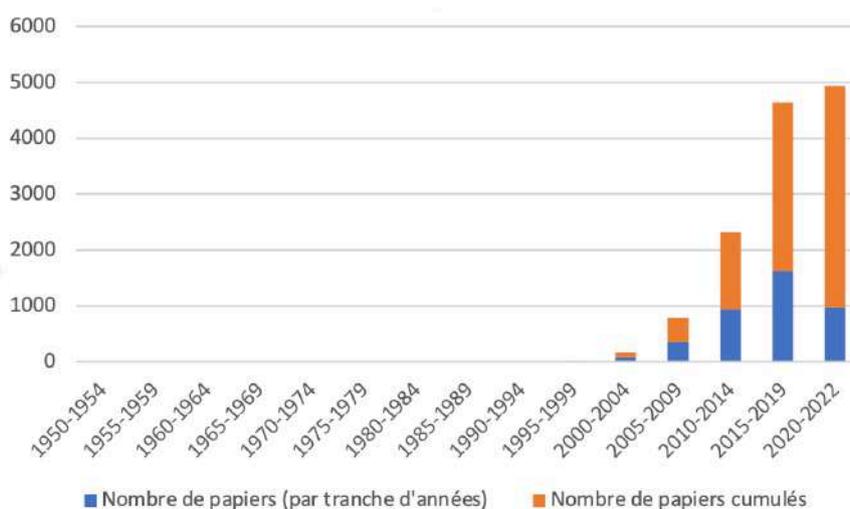


Figure I.9 : Évolution du nombre d'articles scientifiques, traitant des invasions biologiques des écrevisses, publiés dans Google Scholar, par tranche d'années (en bleu), et en cumulé (en orange).

zones du globe, avec cependant une forte disparité en termes de biodiversité (Figure I.10B) (Crandall and Buhay, 2008).

Les exigences écologiques diffèrent entre espèces, au sein d'une même famille. Ainsi, en fonction des espèces présentes, on peut retrouver des écrevisses sur tout le linéaire d'un réseau hydrographique, de la zone de source (espèce oligotrophe) à la zone estuarienne (espèce eutrophe et tolérante aux eaux chaudes et aux concentrations en sels dissous). Chez les Astacidae, famille présente en Europe, certaines espèces du genre *Astacus* et *Austropotamobius* sont inféodées à des milieux d'eau froide et, au contraire, le genre *Pontastacus* affectionne principalement des eaux plus chaudes (Souty-Grosset et al., 2006). Les écrevisses ont un rôle de régulateur des réseaux trophiques : elles sont souvent considérées comme des omnivores/détritivores, avec des changements de comportement possibles au cours du cycle de vie, mais aussi suivant les saisons (Reynolds et al., 2013). Grâce à leur activité de broutage, elles permettent de limiter la prolifération des macrophytes et des algues (Nyström and Strand, 1996), tout en régulant les populations d'invertébrés dépendant des plantes, tels que les mollusques ou les larves d'insectes (Reynolds et al., 2013). Leur activité détritivore, en consommant la litière, augmente également la quantité de matière en suspension, bénéficiant aux espèces filtreuses (Reynolds et al., 2013). Les écrevisses sont donc capables de moduler leur environnement, en régulant localement les communautés et en influant sur la qualité de l'habitat et la disponibilité de certaines ressources (Reynolds et al., 2013). Elles sont donc, à ce titre, qualifiée d' « ingénieur de l'écosystème ».

b. Les écrevisses et l'Homme

De tout temps, les écrevisses ont eu une valeur importante aux yeux de l'Homme (Swahn, 2004), présentées souvent dans des écrits et des peintures, témoignant de leur importance en tant que source d'alimentation. Dès le 15^{ème} siècle, une illustration issue d'un manuscrit dépeint, probablement en Lombardie, une « fête des écrevisses », avec les décapodes disposés sur une table, au milieu de ce qui semble être une cour de château (Figure I.11A). La tradition de la « fête des écrevisses » persiste aujourd'hui

encore en Suède notamment, au point d’être devenu un temps fort de rassemblement festif pour la population locale et un évènement incontournable pour les touristes : « the ‘kräftskiva’ (crayfish party) – an annual sea food fest with lots of side dishes, drinks and joyous songs – is a summertime celebration dear to Swedes of all ages. Its history stretches back to as early as the 16th century, when it started to become popular with the royals. In the 17th century, Swedes started eating crayfish on a wider scale. » (<https://visitsweden.com>) (Figure I.11B). Elle s’est déroulée cette année le 8 Août 2022. L’écrevisse semble être un met de choix pour l’Homme, mais également une marque de noblesse et un argument politique : on la retrouve sur les armoiries et le blason de certaines villes d’Europe et familles notables, de Bourgogne par exemple (Figure I.11C). Elle est également mise en scène, au début du 20^{ème} siècle, par Albert Engström, écrivain et artiste suédois, sur l’affiche pour le référendum sur la prohibition en 1922 (Figure I.11D).



Figure I.11 : A) Illustration, tirée d’un manuscrit du 15^{ème} siècle, d’une « fête des écrevisses » ayant probablement eu lieu en Lombardie ; B) Photo de la kräftskiva, prise en Suède, à l’occasion de la traditionnelle fête des écrevisses ; C) Armoiries, de gauche à droite et de haut en bas, des villes Dolna Trnávka (Slovaquie), Lieboch (Autriche), Wohyn (Pologne), Rudoltice (République Tchèque), Stren (République Tchèque) et de la famille Boucher de la Rupelle (Champagne, Bourgogne) ; D) Affiche d’Albert Engström pour le référendum suédois sur la prohibition de 1922 : « Non ! Les écrevisses ont besoin de ces boissons ! ».

L'écrevisse est un produit de consommation apprécié qui fait l'objet d'une pêche commerciale, ludique et/ou récréative, qui perdure jusqu'à nos jours. En Europe, cette source de nourriture a conduit l'Homme à l'introduire, notamment au Moyen-Âge, dans des lieux où elle n'était initialement pas présente, probablement via des échanges entre monastères. Par exemple, des études de génétiques des populations ont montré que l'origine du stock irlandais d'écrevisse à pattes blanches (*A. pallipes*), provenait probablement d'une introduction à partir d'écrevisse originaire du Poitou-Charentes, durant le Moyen-Âge (Gouin et al., 2001).

De la même manière, les premières introductions d'écrevisses américaines en Europe ont eu lieu, afin de diversifier les activités de production aquacole. L'écrevisse américaine (*Faxonius limosus*), originaire de la côte Est des Etats-Unis, fût la première à avoir été introduite en Pologne, en 1890 (Souty-Grosset et al., 2006). Elle s'est très vite accommodée à son nouvel environnement, et fut introduite (de façon accidentelle ou volontaire), dans de nombreux pays en Europe. Elle est maintenant l'une des espèces d'écrevisses exotiques la plus commune en Europe, recensée dans plus de 20 pays en 2014 (Kouba et al., 2014). Cette espèce héberge, de façon asymptotique, un agent pathogène (*Aphanomyces astaci*) très virulent pour les écrevisses européennes, responsable de la peste de l'écrevisse. Cette maladie a provoqué une chute importante des populations d'écrevisse à pattes rouges (*Astacus astacus*), dans les pays scandinaves. Afin de redynamiser l'astaciculture, l'écrevisse signal (*Pacifastacus leniusculus*), originaire du Nord-Ouest de l'Amérique, a été introduite dans les années 1960 en Suède (Souty-Grosset et al., 2006), à la suite de disparitions massives de populations d'écrevisses à pattes rouges (*A. astacus*). Cette écrevisse signal ou de Californie, très intéressante pour l'aquaculture, notamment en raison de sa grande taille (jusqu'à 18 cm), a ensuite été introduite dans de nombreux autres pays européens (Nylund and Westman, 2000), dont la France en 1974. Petrusek et al. (2017), en analysant 348 écrevisses signal (*P. leniusculus*), provenant de 68 populations à travers l'Europe, ont mis en évidence de multiples événements d'introduction indépendants, avec 27 haplotypes retrouvés, dont 4 majoritaires. Dans le même temps, l'écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*) a été introduite, pour l'astaciculture, en Espagne (en 1973, dans la province de Badajoz et en 1974, dans la province de Séville) et en France (en 1976) (Oficialdegui et al., 2020). Cette espèce a de grandes capacités de

reproduction (jusqu'à 700 œufs par femelle) et de faibles exigences écologiques en termes de qualité d'eau et de température. Elle s'est ainsi rapidement propagées au sein des hydrosystèmes européens et est présente dans au moins 10 pays (Kouba et al., 2014). La présence de ces trois espèces sur le territoire Européen depuis maintenant plus de 50 ans leur a valu le qualificatif d' « espèces d'écrevisses exotiques envahissantes anciennes » (Old Non-Indigenous Crayfish Species) (Kouba et al., 2014). Plus récemment, au début des années 1980, l'écrevisse australienne *C. destructor* a également été introduite en Espagne, puis en Italie (au début des années 1990), pour son intérêt aquacole (Kouba et al., 2014). Depuis, elle a été détectée dans le milieu naturel dans ces pays, mais également en France (Kouba et al., 2014). Elle est cependant beaucoup moins préoccupante, en raison de sa susceptibilité à la peste de l'écrevisse (Kouba et al., 2014).

Depuis les années 1980, l'aquariophilie s'est largement développée, avec notamment l'essor des échanges internationaux et Internet, représentant une source importante d'introduction d'espèces d'écrevisses exotiques (Chucholl, 2013). L'activité est telle que certaines personnes peuvent être qualifiées de collectionneurs, à la recherche d'espèces aux formes et aux couleurs extravagantes, via l'achat sur le Web ou l'échange avec d'autres aquariophiles. Par exemple, Chucholl (2013a) a recensé en 2013 plus de 120 espèces disponibles en ligne à la vente. Ainsi, à la suite d'échappées ou de relâchers intentionnels, ces espèces peuvent potentiellement se retrouver dans le milieu naturel. De cette manière, quatre nouvelles espèces originaires d'Amérique du Nord ont été caractérisées en Europe (*F. immunis*, *F. juvenilis*, *F. virilis* et *P. virginialis*) (Kouba et al., 2014). La première détection de *F. immunis* dans le milieu naturel date du milieu des années 1995, en Allemagne, sur deux stations du Rhin (Kouba et al., 2014). Depuis, elle a rapidement colonisé la majorité du linéaire, vers l'aval, ainsi que ses affluents, jusqu'en France, où sa première caractérisation date de 2010 (Kouba et al., 2014). Elle entre en compétition avec les autres écrevisses américaine (notamment, *F. limosus* et *P. leniusculus*), jusqu'à les supplanter à certains endroits (Chucholl and Chucholl, 2021). L'écrevisse juvénile (*F. juvenilis*) a été découverte dans l'Est de la France en 2005, dans le bassin d'un restaurant, et a longtemps été confondue avec *F. rusticus* (Kouba et al., 2014). Quelques années après, Filipová et al. (2011) ont confirmé l'espèce comme étant

F. juvenilis, qui semble avoir maintenant colonisé la totalité du bassin versant (Kouba et al., 2014). L'écrevisse virile (*F. virilis*) a été découverte pour la première fois dans le milieu naturel en 2004, aux Pays-Bas (Kouba et al., 2014). L'origine exacte de cette espèce n'est pas connue, mais il semblerait que les vendeurs en animalerie de la région, la vendait comme espèce ornementale (Kouba et al., 2014). La présence de *F. virilis* a été confirmée depuis dans de nombreuses stations, jusqu'en Angleterre, colonisant la totalité des bassins versants et déplaçant des populations de *F. limosus* (Kouba et al., 2014). Enfin, la plus récente est l'écrevisse marbrée (*P. virginalis*), espèce anormalement parthénogénétique (Lukhaup, 2001). Elle représente le seul décapode connu au monde capable de se reproduire de cette manière, à partir d'œufs non-fécondés (Martin et al., 2007). Découverte en Allemagne dans une animalerie dans les années 1990, elle s'est échappée dans la nature et est devenue invasive dans de nombreux pays d'Europe, dont la France, et d'Afrique (Andriantsoa et al., 2020; Madzivanzira et al., 2020; Grandjean et al., 2021). Sa triploïdie lui procure une croissance et une fécondité impressionnantes qui, combinés à sa plasticité vis-à-vis des conditions environnementales, en font une espèce préoccupante pour les écosystèmes naturels : à Madagascar, l'espèce est hors de contrôle, colonisant près de 100 000 km² en 10 ans. Les dégâts sont considérables sur cet écosystème insulaire fragile, abritant une flore diversifiée unique, ainsi que 7 espèces endémiques d'écrevisses du genre *Astacoides* (Andriantsoa et al., 2019).

Tableau I.1 : Comparaison des caractéristiques générales (Reproduction, maturité sexuelle et exigences écologique) de 8 espèces d'écrevisses : *Astacus astacus* et *Austropotamobius pallipes* (naturellement présentes en Europe), *Faxonius limosus*, *Pacifastacus leniusculus*, *Procambarus clarkii*, *Cherax destructor*, *Faxonius virilis*, *Procambarus virginalis* (introduites en Europe).

Nom latin	<i>Astacus astacus</i>	<i>Austropotamobius pallipes</i>	<i>Faxonius limosus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Procambarus clarkii</i>	<i>Cherax destructor</i>	<i>Faxonius virilis</i>	<i>Procambarus virginalis</i>	
Nom vernaculaire	Ecrevisse à pattes rouges	Ecrevisse à pattes blanches	Ecrevisse américaine	Ecrevisse de Californie	Ecrevisse de Louisiane	Yabbie	Ecrevisse virile	Ecrevisse marbrée	
Origine	Europe	Europe	Amérique du Nord	Amérique du Nord	Amérique du Nord	Australie	Amérique du Nord		
Statut	Menacée ; Vulnérable	Menacée : En Danger	Invasive	Invasive	Invasive	Invasive	Invasive	Invasion	
Ponte	50-200 1 fois par an	40-200 œufs 1 fois par an	Jusqu'à 450 œufs	200 à 300 œufs	200 à 700 œufs 2 fois par an	Jusqu'à 1000 œufs 3 à 5 fois par an	Jusqu'à 300 œufs	Jusqu'à 150 œufs Jusqu'à 10 fois par an	
Maturité sexuelle	Environ 2 à 3 ans	Environ 2 à 3 ans	Environ 6 mois	Environ 1 an	Environ 3 mois	Moins d'un an	Moins d'un an		
Exigences	Espèce bio-indicatrice ; Très exigeante	Espèce bio-indicatrice ; Très exigeante	Peu exigeante au niveau de la température et de la pollution	Peu exigeante sur la qualité et la température de l'eau ; Peu survivre à des conditions d'oxygène dissous très basses	Peu exigeante sur la qualité et la température de l'eau ; Peu survivre à des périodes de sécheresse	Peu exigeante sur la qualité et la température de l'eau ; Peu survivre à des périodes de sécheresse ; peut survivre à plusieurs mois de sécheresse en s'enfouissant dans la boue	Très tolérante vis-à-vis des conditions environnementales ; peut survivre à des pH acides.	Peu exigeante vis-à-vis de la qualité de l'eau, peut survivre à des pH acides.	Peu exigeante vis-à-vis de la qualité de l'eau
Références	Holdich (2002)	Trouilhé (2006) Holdich (2002)	Lang (2020)	Harlioglu (1996)	Lang (2020)	Withnall (2000) Beatty et al. (2005)	Corey (1987) Momot (1967)	Lyko (2017) Kaldre et al. (2016)	

c. Les impacts des écrevisses exotiques envahissantes

Les impacts des écrevisses exotiques envahissantes sur leur environnement d'accueil ont largement été étudiés depuis plusieurs années, montrant des similitudes entre les différentes espèces (de Moor, 2002; Lodge et al., 2012; Twardochleb et al., 2013; Souty-Grosset et al., 2016; Haubrock et al., 2021). Souty-Grosset et al. (2016) ont fait une synthèse des différentes catégories d'impacts de l'écrevisse de Louisiane (*P. clarkii*) sur l'écosystème.

Modifications physiques et chimiques de l'habitat

En tant qu'ingénieur de l'environnement, les écrevisses sont capables de modifier les paramètres physico-chimiques de leur environnement d'accueil. Par leur activité fouisseuse, certaines espèces sont capables de creuser de profondes galeries (de quelques centimètres à plusieurs mètres), comme *P. clarkii*. Ceci occasionne une fragilisation des berges, voire un effondrement de celles-ci, ainsi qu'une augmentation des matières en suspension dans l'eau (Souty-Grosset et al., 2016; Madzivanzira et al., 2020). Dans certaines conditions, ces tunnels vont entraîner des fuites dans les réservoirs/canaux provoquant une perte de la ressource en eau et un assèchement des cultures (de rizières par exemple) (Souty-Grosset et al., 2016; Madzivanzira et al., 2020). Andriantsoa et al. (2020) ont relevé des conséquences similaires pour l'écrevisse marbrée, à Madagascar.

L'activité benthique des écrevisses, qui se déplacent sur le substrat en le remuant, à la recherche de nourriture, est également responsable de l'augmentation de la matière en suspension dans l'eau. Cette activité sera d'autant plus intense que les densités de populations sont fortes, comme cela peut être le cas dans les contextes d'invasion d'écrevisses. Cette augmentation de la matière en suspension va induire une augmentation de la turbidité et donc un changement des caractéristiques du milieu (notamment au niveau des échanges gazeux avec l'atmosphère). Ces changements physico-chimiques sont favorables au développement des algues et des bactéries, qui vont proliférer et rendre le milieu inadapté à certaines espèces autochtones, exigeantes de la qualité du milieu (Yamamoto, 2010; Twardochleb et al., 2013).

La dissémination de pathogènes

Le succès d'invasion des écrevisses exotiques envahissantes peut être facilité par la dissémination de pathogènes. Parmi ces agents pathogènes, l'oomycète *Aphanomyces astaci*, responsable de la peste de l'écrevisse, est certainement le plus connu et le plus étudié (Becking et al., 2021). Cet oomycète, spécialiste des écrevisses, est porté de manière asymptomatique par les espèces américaines (*P. leniusculus*, *P. clarkii* et *F. limosus*, *F. virilis*, *F. immunis*, *F. virginalis*, *F. juvenilis*) (Svoboda et al., 2014; Becking et al., 2021; Martín-Torrijos et al., 2021). Il a ainsi été introduit, conjointement à ses hôtes, dans de nombreuses régions du monde, provoquant des dommages considérables (Becking et al., 2021). En effet, cet agent pathogène provoque la mort des écrevisses sensibles dans les sept jours suivant l'infection et décime des populations entières en quelques semaines, voire des mois (Collas et al., 2016). Ceci facilite la propagation des écrevisses exotiques, en l'absence de concurrence. *Aphanomyces astaci* est ainsi considéré comme la principale cause du déclin populationnel des écrevisses européennes (Souty-Grosset et al., 2016; Grandjean et al., 2017).

Les impacts sur les communautés végétales

Les écrevisses sont connues pour avoir une activité de broutage (« grazing »), qui peut être très intensive chez certaines espèces exotiques envahissantes (Souty-Grosset et al., 2016; Madzivanzira et al., 2020), représentant parfois plus de la moitié du régime alimentaire (Marufu et al., 2018b). Au Portugal, Anastacio and Marques (1997) ont démontré qu'une densité de cinq écrevisses (*P. clarkii*) par mètre carré suffisait à détruire la totalité de la récolte de riz. Dans une autre étude, cette même espèce a provoqué une baisse de biomasse importante des hydrophytes, comme le nénuphar frangé (*Nymphoides peltata*) ou les potamots (*Potamogeton spp.*) en raison de son activité de broutage, mais également de son activité de tonte et d'arrachage, sans consommation (Gherardi and Acquistapace, 2007). Il a été montré par ailleurs que cette perte de macrophytes était bénéfique au développement d'autres espèces floristiques envahissantes, telle que la grande utriculaire (*Utricularia australis*) (Gherardi and Acquistapace, 2007) ou l'élodée de Nuttall (*Elodea nuttallii*). Cette perte de macrophytes aquatiques est un catalyseur de l'altération des milieux aquatiques (Zhang et al., 2018),

car elle impacte également de manière négative les autres taxons de la niche trophique. En effet, ces macrophytes servent bien souvent de zone de ponte, de refuge ou d'alimentation pour les poissons (Figueiredo et al., 2015), les mollusques (Medeiros and Henry-Silva, 2017), les amphibiens (Landi et al., 2014) et les insectes (Stansfield et al., 1997; Diehl and Kornijow, 1998). Leur disparition entraîne donc nécessairement une baisse de biodiversité au sein de ces communautés autochtones, de manière indirecte.

[Les impacts sur les invertébrés benthiques](#)

L'impact des écrevisses sur les communautés d'invertébrés benthiques est également important. Twardochleb et al. (2013) ont synthétisé les impacts de quatre écrevisses exotiques envahissantes (*F. rusticus*, *F. virilis*, *P. clarkii* et *P. leniusculus*) sur les invertébrés benthiques, à partir de l'analyse minutieuse de 284 études scientifiques, sur plus de 30 ans. Les résultats ont montré que les écrevisses exotiques avaient un impact négatif sur la biomasse et l'abondance des amphipodes, des diptères, des éphéméroptères et des mollusques. Ercoli et al. (2015) ont comparé les différences en termes d'abondance, de composition et de richesse taxonomique en macroinvertébrés benthiques dans des lacs en Finlande, en zone non-envahie et en présence de *P. leniusculus*. En présence de l'écrevisse envahissante, ils mettent en évidence une réduction de 50% de la densité en macroinvertébrés, qui passe de 400 individus par m² en condition contrôle à 200, et une réduction de deux tiers de la richesse taxonomique (entre 10 et 12 taxons dans les lacs non-envahis, contre seulement 4 taxons après invasion) (Ercoli et al., 2015).

Dès le début des années 1970, avec le déclin des populations de mollusques en Europe (Cuttelod et al., 2011), de nombreuses études ont suspecté les écrevisses envahissantes d'avoir un impact négatif sur ces communautés d'invertébrés. Par exemple, Montes et al. (1993) ont constaté la disparition de deux espèces autochtones de mollusques *Lymnaea peregra* et *L. stagnalis*, à la suite de l'introduction de l'écrevisse de Louisiane (*P. clarkii*) en Espagne. Des exemples similaires ont également été reportés en Allemagne par Herrmann et al. (2022), dans des étangs (sites Natura 2000), créés dans le cadre du

programme EU-Life « Rheinauen bei Rastatt », qui ont été suivis de 2014 à 2019. Ces auteurs ont constaté un effondrement des communautés de macroinvertébrés benthiques sur cette période, après l'invasion par l'écrevisse *F. immunis*, avec une perte de 85% d'abondance de mollusques. Certaines espèces comme le vertigo étroit (*Vertigo angustior*), le vertigo des moulins (*V. moulinsiana*) (deux espèces de gastéropodes pulmonés, en voie de régression) et la planorbe naine (*Anisus vorticulus*) (en danger critique d'extinction dans de nombreux pays d'Europe) ont même totalement disparu de ces étangs.

Des expériences de préférence alimentaire en milieu contrôlé ont également montré un impact par prédation, des écrevisses de Louisiane et celles de Californie sur trois espèces natives de bivalves en Espagne (*Anodonta anatina*, *Potomida littoralis* and *Unio delphinu*), avec une préférence pour *A. anatina* (Meira et al., 2019). Ce résultat était en accord avec les données récoltées sur le terrain, montrant des marques d'attaque sur 1% à 40% des spécimens des trois espèces. Ils ont constaté que les bivalves présentant des traces sur plus de 15% de la surface de leur coquille sont généralement retrouvés morts. Ces impacts des écrevisses sur les communautés de mollusques ont fait l'objet de nombreuses études (Vermeij, 1978; Alexander and Covich, 1991; Nyström and Pérez, 1998; Krist, 2002). Dorn (2013) décrit même cela comme « One of the best studied freshwater predator-prey interactions ... » et a mis en avant la capacité des mollusques à changer de traits, notamment au niveau de la forme de la coquille et de l'ouverture operculaire, pour échapper aux prédateurs. Cette plasticité phénotypique a été mise en évidence très tôt, chez plusieurs espèces, comme effet dissuasif, en réponse à une pression de prédation (Vermeij, 1978).

[Les impacts sur les vertébrés](#)

Les écrevisses exotiques envahissantes jouent un rôle dans la baisse de biodiversité des espèces ovipares, telles que les poissons et les amphibiens. En s'attaquant aux sites de pontes et en consommant les œufs, elles ont un impact direct sur le recrutement des juvéniles (Souty-Grosset et al., 2016). Au début des années 2000 en Angleterre, après l'invasion de l'écrevisse exotique *P. leniusculus*, les populations de salmonidés (*Salmo trutta* et *S. salar*), très appréciées par les pêcheurs locaux, ont

chuté (Peay et al., 2009) : sur les sites non-envahis, les pêches recensaient plus de 47 juvéniles par 100 m², alors que les sites où l'écrevisse signal (*P. leniusculus*) était présente accueillait de 0 à 18 juvéniles par 100 m² (Peay et al., 2009). Au fur et à mesure de l'expansion de l'invasion dans les rivières affluentes, les mêmes résultats étaient retrouvés, avec une baisse du recrutement des juvéniles (Peay et al., 2009). En Finlande, grâce à l'analyse du régime alimentaire de *P. leniusculus*, Karjalainen et al. (2015) ont estimé la contribution des œufs de salmonidés (*Coregonus albula* et *C. lavaretus*) au régime alimentaire de l'écrevisse à environ 6%. En se basant sur des expérimentations en milieu contrôlé et de la modélisation, l'écrevisse signal (*P. leniusculus*) pourrait être responsable d'une perte de densité d'œufs d'environ 51% dans les lacs finlandais (Karjalainen et al., 2015). De la même manière, *P. clarkii* est connue pour attaquer les pontes de salamandres (*Pleurodeles waltl*, *Salamandra salamandra* en Espagne) (Cruz et al., 2006), de tritons (*Triturus boscai*, *T. marmoratus* en Espagne, *Lissotriton vulgaris* en Italie) (Cruz et al., 2006; Ficetola et al., 2011; 2012), d'anoures (*Pelobates cultripes*, *Bufo bufo* en Espagne, *Hyla intermedia* en Italie) (Cruz et al., 2006; Ficetola et al., 2011) mais aussi de top-prédateurs, tel que le brochet (*Esox lucius*) (Reynolds, 2011).

Objectifs

Cette thèse a pour but d'étudier l'invasion de l'écrevisse exotique australienne *Cherax quadricarinatus* au sein des hydrosystèmes de Martinique, et ses conséquences sur les communautés aquatiques et humaines. Ainsi, elle a pour objectifs :

(1) d'actualiser la répartition de *C. quadricarinatus* en Martinique, en développant un outil de détection basé sur l'ADN environnemental, une méthode d'inventaire efficace et peu chronophage, permettant d'obtenir une carte de distribution de cette espèce à l'échelle de la Martinique. Cette méthode permettra également de mettre en place une veille écologique sur les rivières de Martinique n'étant pas encore colonisée et proposer une extension de la méthode aux cours d'eau de Guadeloupe, où l'écrevisse australienne ne semble pas encore se retrouver dans le milieu naturel.

(2) de caractériser ses impacts sur les communautés autochtones grâce à l'utilisation de l'analyse des isotopes stables de carbone et d'azote, en comparant les réseaux trophiques de sites envahis et non envahis par l'écrevisse. En complément, des expérimentations en conditions contrôlées ont été menées.

(3) de comprendre la cinétique de bioaccumulation et de décontamination *in-vitro*, de la chlordécone au sein des tissus abdominaux de l'écrevisse (partie consommée par la population locale), largement présente au sein de sites pollués. En effet, la pêche en rivière est une activité récréative ancestrale, en plus d'être lucrative pour les pêcheurs locaux. Malgré son interdiction, à cause d'un contexte écotoxicologique tendu, cette pratique reste très courante et l'écrevisse est devenu un met de choix sur le territoire, avec de possibles risques pour la santé humaine.

Le premier chapitre présente une revue du contexte de ce travail de doctorat et fait suite à l'introduction générale. Il permet d'exposer le cadre global de mes travaux en décrivant le contexte hydrologique et toxicologique particulier de la Martinique, ainsi que mon modèle d'étude et la faune dulçaquicole locale.

Le second chapitre concerne l'évolution de la répartition de *C. quadricarinatus* dans les hydrosystèmes d'eau douce de Martinique, grâce au développement d'outil permettant une détection précoce de cette espèce par la méthode ADN

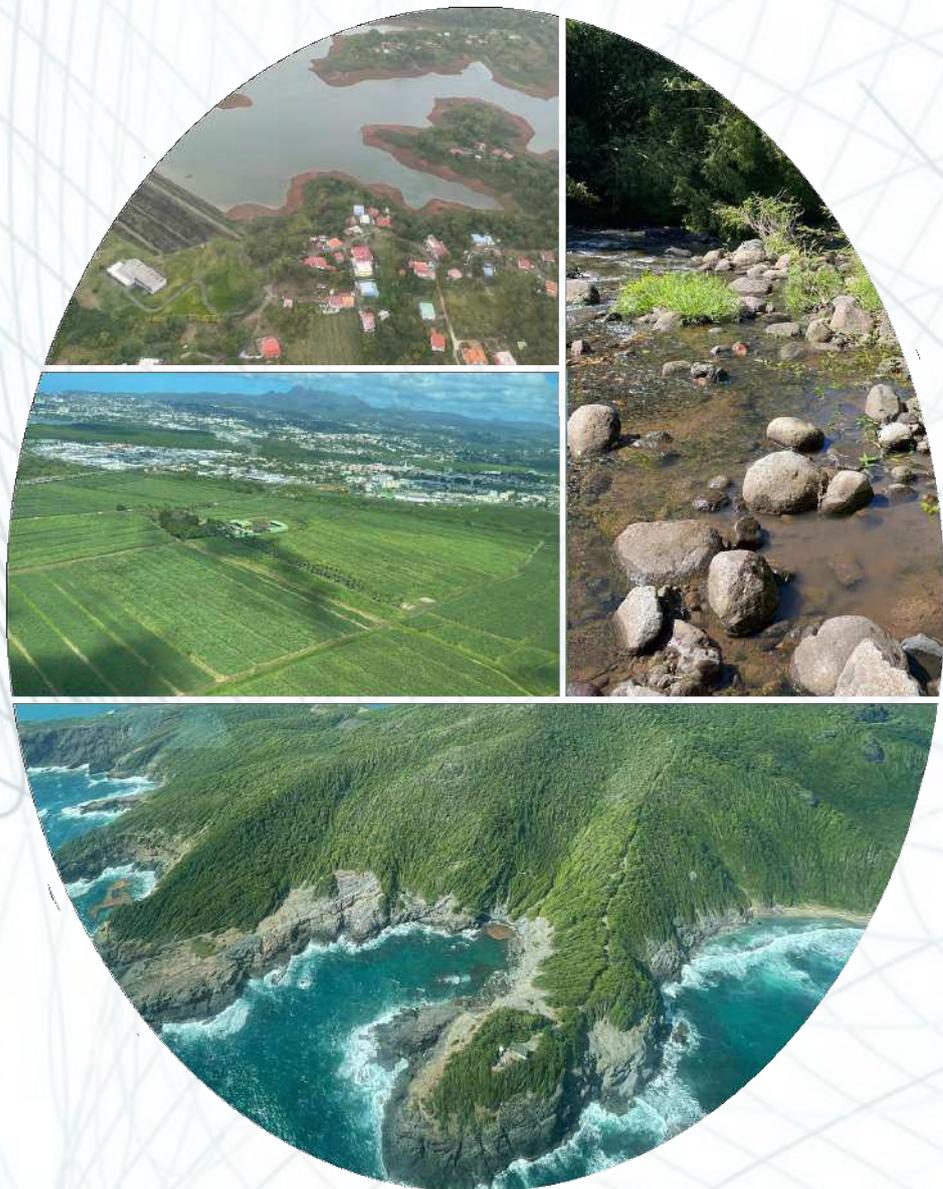
environnemental, afin d'établir une carte de répartition précise de cette espèce sur l'ensemble du territoire martiniquais et de fournir un outil de veille écologique pour détecter rapidement une introduction dans un nouveau site. La caractérisation génétique des populations d'écrevisses en milieu naturel a également permis d'obtenir des réponses quant à l'histoire de l'introduction de *C. quadricarinatus* sur le territoire.

Le troisième chapitre porte sur l'étude des impacts cette écrevisse sur les communautés locales et permet d'appréhender de façon indirecte le régime alimentaire de l'écrevisse, ainsi que de ses impacts sur la niche trophique, à court et à moyen termes par l'utilisation des marqueurs isotopes stables et d'expérimentation proie-prédateur.

Le quatrième chapitre, est consacré à l'étude écotoxicologique et la contamination au chlordécone des écrevisses. Ce polluant est fortement rémanent et, malgré son interdiction d'utilisation depuis 1993, il est toujours retrouvé dans la chaîne alimentaire, à des doses largement supérieures au seuil autorisé pour la consommation humaine.

Enfin, une discussion générale présentant les perspectives liées à ce travail vient compléter ce document.

Chapitre 1 – Contexte de l'étude : la Martinique et la faune sauvage



I. La Martinique

a. Géographie et climat

La Martinique, territoire d'Outre-Mer français, est une île volcanique de 1128 km², appartenant à l'archipel des Petites Antilles, par 61° de longitude Ouest et 14° de latitude Nord. Elle est bordée par la Mer des Caraïbes à l'Ouest et l'Océan Atlantique à l'Est (Figure II.1). La Martinique possède un climat tropical insulaire humide avec une variabilité annuelle des précipitations, permettant de définir deux saisons principales : le « Carême », saison sèche s'étendant de décembre à mai, et l'« Hivernage », saison humide allant de juin à novembre. Une variabilité géographique de ces précipitations peut également être observée à l'échelle de l'île. En effet, malgré cette superficie plutôt réduite, une diversité de relief est observable sur l'ensemble du territoire, avec des sommets arrêtant les masses d'air chargées d'humidité, qui vont arroser principalement ces zones. L'axe Fort de France - Le Robert (d'Ouest en Est) sert bien souvent de délimitation afin d'expliquer ces variations, notamment entre le Nord et le Sud (Figure II.1). On retrouve au Nord la partie la plus montagneuse de l'île, avec la Montagne Pelée (1397 m) comme point culminant, avec une végétation de type « forêt tropicale », sous l'impulsion d'une forte pluviométrie. Au Sud, le paysage est moins accidenté, avec des « mornes » s'élevant au maximum à 504 m d'altitude (Montagne du Vauclin) (Figure II.1), avec un climat plus sec et une insolation allant jusqu'à 3000 heures par an à certains endroits. Ces fortes irrégularités des pluies et du relief entraînent un réseau hydrographique au contraste marqué entre les rivières du Nord et celles du Sud.

b. Le réseau hydrographique

Le réseau hydrographique martiniquais compte environ 70 rivières principales permanentes et au moins autant de ruisseaux non-permanents, appelés ravines. Ces rivières sont principalement réparties sur 7 bassins versants : la Lézarde, la Capot, le Lorrain, le Galion, la Rivière Salée, la Rivière Pilote et la Roxelane. La majorité de la ressource en eau est retrouvée au Nord de l'île et ces rivières sont caractérisées par une faible longueur, la plus longue étant la Lézarde (33 km) (Figure II.1). Le contraste en termes de typologie de ces rivières est très marqué entre les rivières du Nord et celles

du Sud. Les premières, dites « de montagne », sont caractérisées par un régime hydrologique torrentiel, avec des vallées encaissées. Celles du Sud, dites « de plaine ou de mangrove », parcourent des vallées très larges, peu pentues, avec des débits réduits et un étiage plus rapide, dû au climat plus sec régnant dans cette région (Lim et al., 2002). La variabilité saisonnière, en termes de pluviométries, entraîne également un changement des débits marqué, en particulier pour les rivières du Nord (Figure II.2).

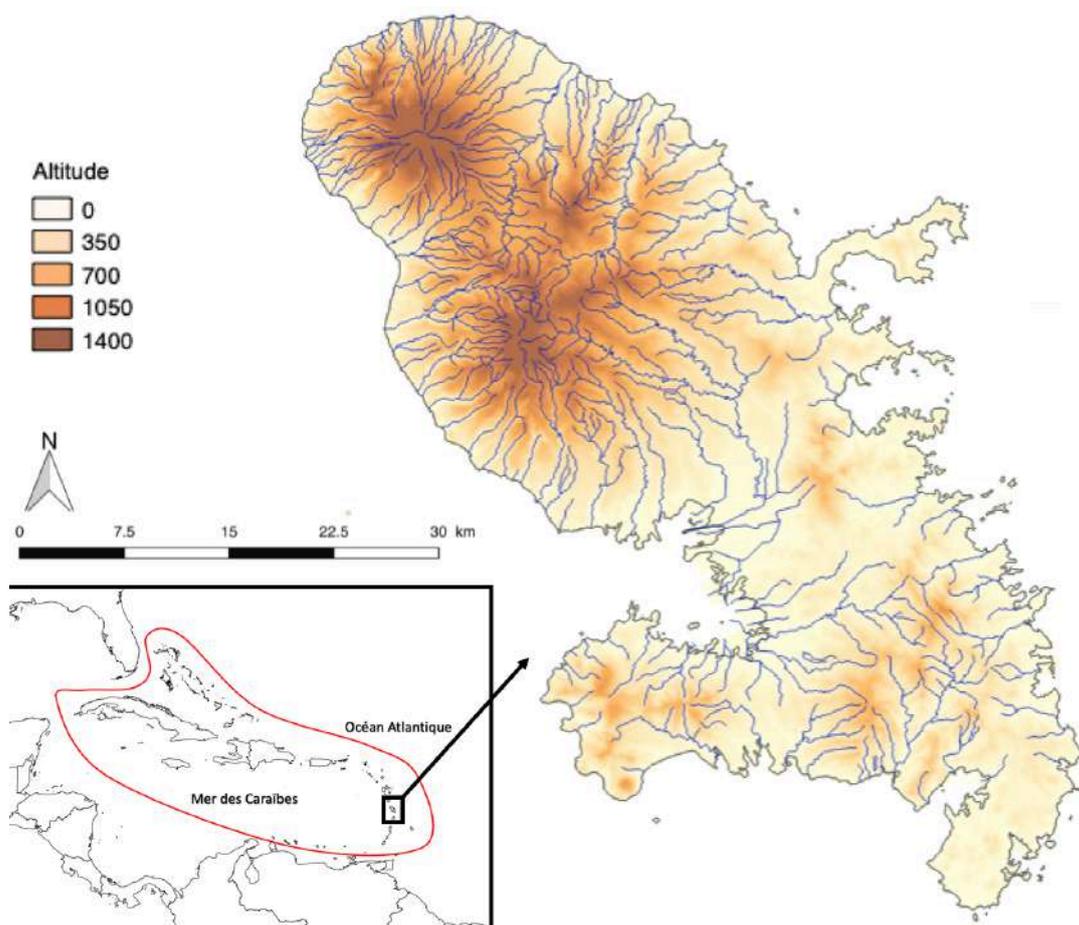


Figure II.1 : L'île de la Martinique est située dans l'archipel des petites Antilles, au Sud de l'arc antillais, dans le bassin caribéen, au cœur du hotspot de biodiversité des « îles de la Caraïbes » (Brown et al., 2019). La cartographie illustre la complexité du réseau hydrographique martiniquais, ainsi que les variations de relief sur le territoire.

Il est également possible de retrouver en Martinique des écosystèmes d'eaux closes, de plus ou moins grandes surfaces, allant de 82 ha pour 8.1 millions de m³ d'eau pour la retenue d'eau de la Manzo (commune du François et de Ducos) à quelques mètres carrés pour les mares (Major and Claude, 2021). Sur le territoire, ces milieux aquatiques particuliers sont tous d'origine anthropique et datent de moins de 50 ans (Major and Claude, 2021). Elles ont été créées pour diverses raisons, allant de l'irrigation agricole à l'abreuvement des animaux, en passant par l'extraction de matériaux, et sont beaucoup plus nombreuses dans la partie Sud de l'île (Major and Claude, 2021). Ainsi, le territoire compterait plus de 1000 mares et étangs, pour une superficie totale de 189.6 ha. Ces écosystèmes particuliers sont maintenant intégrés dans le paysage martiniquais et revêtent une importance écologique majeure : ces milieux sont soumis à des variations saisonnières importantes, pouvant aller jusqu'à l'eutrophisation ou l'assèchement suivant la pluviométrie et l'évaporation, et accueillent une diversité spécifique très riche (Major and Claude, 2021). Cette variété d'écosystèmes et de paysages retrouvée en Martinique en font une zone très riche, abritant un grand nombre d'espèces endémiques, justifiant ainsi sa présence dans l'un des hotspot de biodiversité le plus riche du monde (Brown et al., 2019) (Figure II.1).



Figure II.2 : Photographies de la rivière Case Navire (en zone avale et en zone amont), à Schoelcher, en Novembre 2020 (saison des pluies) et en Février 2021 (saison sèche).

c. L'occupation des sols

En Martinique, d'après les archives cadastrales tenues à jour par les mairies (à jour le mercredi 27 avril 2022), 45.8% du territoire est occupé par des forêts et des milieux semi-naturels, tels que des forêts de feuillus, de la végétation arbustive en mutation, sclérophylle ou encore des landes et broussailles, 40.8% par des territoires agricoles (prairies, bananeraies, champs de canne à sucre et vergers), 12.9% par des territoires artificialisés (tissu urbain, zones industrielles et commerciales et infrastructures de communication), 0.3% par des surfaces en eau et 0.3% par des zones humides (Figure II.3). L'importante superficie des territoires agricoles (40.8%) en Martinique est due à un climat très favorable permettant notamment la culture de la canne à sucre (produit de base pour le sucre de canne et le rhum) ou de la banane et, dans une moindre mesure, des fruits et légumes. Cette activité agricole s'est intensifiée au cours du 20^{ème}, avec l'essor des nouvelles technologies et l'accroissement de la demande en ressource alimentaire, en réponse à l'accroissement de la population mondiale. La culture de canne à sucre occupait alors près de 6000 ha au début des années 1980, devant les cultures vivrières, les vergers et le maraîchage (occupant 3101 ha en 1980) et les cultures d'ananas (687 ha en 1980) (Bernoux et al., 2004).

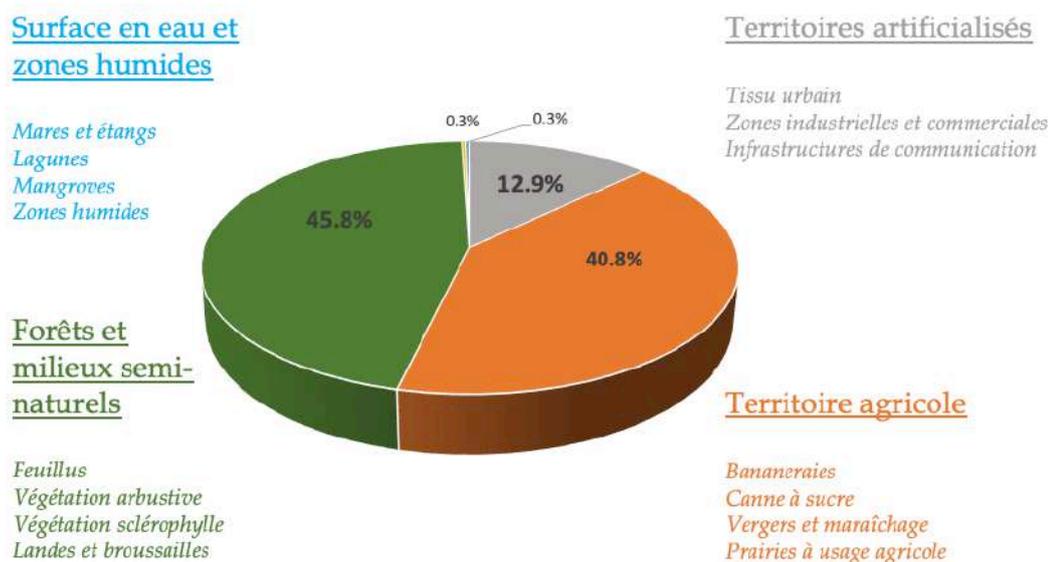


Figure II.3 : Occupation des sols de la Martinique, dominée par les forêts et milieux semi-naturels (45.8%), puis les territoires agricoles (40.8%), les territoires artificialisés (12.9%) et les surfaces en eau douce (0.6%). Ces données ont été actualisées par les archives cadastrales le mercredi 27 avril 2022.

La banane, quant à elle, est devenue, dans les années 1980, la culture majeure en Martinique (12 582 ha de culture) (Bernoux et al., 2004), représentant jusqu'à 50% du PIB des Antilles Française à l'exportation vers la métropole (Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). Cette intensification de l'exploitation, comme partout à travers le monde, en monoculture et sans rotation, a augmenté la pression parasitaire en provoquant une vulnérabilité de ces bananeraies vis-à-vis des maladies et des ravageurs (Bocquené and Franco, 2005). Ce fut le cas notamment du charançon du bananier *Cosmopolites sordidus*, considéré comme le pire insecte ravageur des bananiers (Serge, 1994). Ce coléoptère, originaire d'Asie du Sud-Est, a été transloqué dans la majorité des pays producteurs de bananes via des plants infestés, provoquant son expansion dans la totalité des zones tropicales, dont la Martinique. La femelle pond ses œufs dans les feuilles de la plante et, à leur éclosion, les larves vont s'en nourrir, affaiblissant ainsi le pied entier (Figure II.4). Ceci provoque un retard dans la floraison et la vigueur de la plante s'en retrouve réduite, à tel point que les pertes engendrées sont énormes et la production en pâtit très lourdement. L'importance économique des bananeraies a amené les producteurs à trouver des solutions pour pallier ces pertes insupportables et incontrôlables, en faisant appel à la chimie organique. Ils ont ainsi utilisé des produits phytosanitaires afin de lutter contre le charançon, dès le milieu du 20^{ème} siècle (Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). Le seul pesticide connu pour éliminer efficacement *C. sordidus* est le chlordécone (CLD ; C₁₀Cl₁₀O ; CAS number 143-50-0), produit à partir du milieu du 20^{ème} siècle aux Etats-Unis (Lafontaine, 2017). Malgré tous les méfaits sur la santé humaine qui lui sont attribués et plusieurs refus d'homologation de la part de diverses instances, le chlordécone est largement utilisé dans les Antilles Françaises, jusqu'en 1993 (voir Chapitre 4).



Figure II.4 : Photographie d'un plant de banane entier, affaibli par le charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*) (à gauche) et d'un pied arraché (à droite), consommé par les larves de charançon (Okolle et al., 2009).

Considéré comme l'un des pires polluants organiques persistants (POP), le chlordécone est un pesticide organochloré, à la fois très stable et peu soluble dans l'eau, bien connu pour sa capacité à s'accumuler dans les chaînes trophiques et à avoir des effets délétères sur les organismes (dérégulation endocrinienne, trouble de la reproduction et impacts sur le développement embryonnaire notamment). La mise en évidence de ces effets néfastes du chlordécone a déclenché la mise en place de différents plans de surveillance aux Antilles Françaises, qui ont permis de financer des projets d'amélioration des connaissances (Plans Chlordécone I à IV). Les écosystèmes aquatiques sont bien connus pour être le réceptacle final de ces molécules polluantes, par des processus d'infiltration (lixiviation) et/ou d'érosion des sols (Coat *et al.*, 2006 ; Snegaroff, 1977 ; Cabidoche et Lesueur-Jannoyer, 2012). A cause de cela et de sa très forte rémanence dans l'environnement, le chlordécone reste détectable dans les rivières de Martinique, plus de 20 ans après l'arrêt de son utilisation, de manière majoritaire par rapport aux autres polluants (responsable de plus de 80% de la pollution à certains endroits) (Sources : Office de l'Eau de Martinique) (Figure II.5). Par arrêté préfectoral reconduit chaque année (n°R02-2017-12-28-003), la pêche (ainsi que la consommation et la commercialisation de ces produits de pêches) a été interdite depuis 2009 dans les cours d'eau de Martinique et certaines fermes aquacoles, dont les bassins étaient contaminés, ont dû être fermées. Cependant, malgré ces interdictions,

la population martiniquaise continue de pratiquer cette pêche récréative en rivière et les crustacés (crabes ou crevettes locales) restent très appréciés dans les plats locaux.

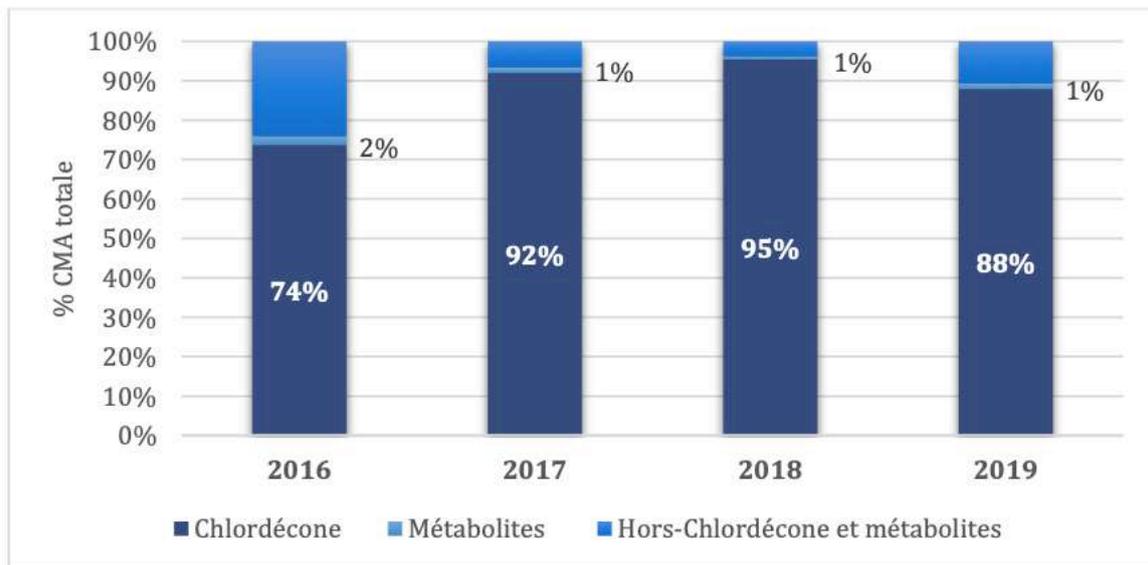


Figure II.5 : Données de contamination aux pesticides du bassin versant du Galion de 2016 à 2019 (Source Office de l'Eau de Martinique)

d. La pêche récréative et l'aquaculture

Les crevettes locales, appelées « ouassous » ou « z'habitant » (*Macrobrachium carcinus*), ont de tout temps fait l'objet d'une pêche ancestrale dans les rivières de Martinique (Figure II.6B). Les pêcheurs locaux utilisent pour cela plusieurs moyens, plus ou moins artisanaux (Figure II.6). Une pêche active est possible, avec deux bâtons auxquels sont attachés un filet : le pêcheur va alors remonter le courant, en plongeant son filet déployé dans l'eau et en retournant les roches. Les poissons et les crustacés, débusqués et cherchant alors à s'échapper, se retrouvent piégés dans le filet (Figure II.6A). Une méthode plus « passive » utilisée est la pêche à la nasse : ces engins de pêche sont appâtés et placés dans les rivières pendant plusieurs jours, avant de les relever et de collecter les produits de pêche. Ces nasses peuvent être construites de manière plus ou moins artisanales, parfois exclusivement en bambous, en bois et en grillage ou encore en métal et en plastique (Figure II.6C-D-E). Aucune efficacité supérieure en termes de capture ne semble être attribuée à une sorte de nasse en particulier, mais plutôt suivant l'appât utilisé. Il peut être constitué de produits locaux,

tels que la pulpe de coco, le manioc ou un nid de termites, de boîtes de pâtés pour chat ou des croquettes pour chien. Malgré l'interdiction de pêche et de commercialisation/consommation des produits de pêche, à cause de la contamination au chlordécone, ces crustacés sont revendus de manière illégale sur les marchés ou sur le bord des routes et se retrouvent dans les assiettes des consommateurs locaux.

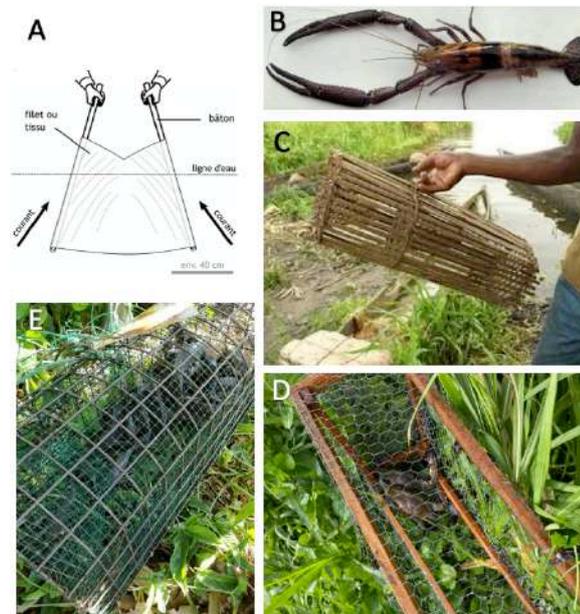


Figure II.6 : Planche photo illustrant la méthode de pêche active, grâce au filet et deux bâtons (A), la crevette localement appelée « z'habitant » (*Macrobrachium carcinus*) (B). Trois modèles différents de nasses sont également exposés : la nasse en bambou (C), la nasse en bois, à mailles grillagées (D) et la nasse en acier galvanisé, à mailles en plastique (E).

Afin de satisfaire la demande importante en crustacés consommés par la population martiniquaise, l'aquaculture a pris une place importante dans les Antilles Françaises, représentant ainsi une activité économique importante. L'espèce historiquement cultivée était la crevette géante d'eau douce, *Macrobrachium rosenbergii*, originaire d'Asie, qui a été introduite dans ce seul but d'élevage. Plusieurs espèces indigènes du genre *Macrobrachium* sont présentes dans les Antilles (Lim et al., 2002), ce qui donnait quelques assurances sur son succès d'adaptation au climat. La production a donc commencé à partir des années 1970. Cette activité nécessitait de grandes installations (avec notamment une éclosérie), en termes de superficie et de nombre de bassins d'élevage, pour être rentable. Ce produit était très apprécié de la population locale et, jusqu'à la fin des années 1990, les rendements étaient plutôt bons avec des productions allant jusqu'à 40-45 tonnes par an en Guadeloupe, pour 13

exploitants (Falguière and Buchet, 2002) (aucune donnée chiffrée en Martinique n'est, à ma connaissance, disponible). Cependant, au début des années 2000, la filière aquacole Martiniquaise (tout comme celle de Guadeloupe) a connu un coup d'arrêt : un grand nombre d'exploitations a dû fermer, à cause de la contamination au chlordécone. Leurs bassins, se trouvant bien souvent en fond de vallée, en aval des cours d'eau, se sont retrouvés être le réceptacle final de ces produits polluants, contaminant ainsi tout le stock de crevettes et le rendant impropre à la consommation. Certains d'entre eux ont tenté de maintenir leur exploitation, en exportant leur activité dans des zones non polluées, comme au Carbet (Commune du Nord de la Martinique), par exemple. Ceci a été un échec à cause des superficies de bassins qui étaient drastiquement réduites, faisant chuter les rendements de production.

Un consortium d'aquaculteurs, s'accrochant encore à l'idée de faire perdurer le secteur aquacole, s'est penché sur le sujet et a choisi d'introduire une nouvelle espèce de crustacé. C'est ainsi qu'a été introduite l'écrevisse bleue *Cherax quadricarinatus*, en provenance de Cuba, où elle était déjà présente. Le contexte d'introduction de cette espèce en Martinique reste très flou, sans réel détail officiel sur le nombre exact d'individus introduits à l'origine, ni sur les autorisations signées par les autorités compétentes. Au-delà de ce contexte administratif, l'espèce trouve en Martinique un climat tropical optimal pour son développement, dans lequel elle croît de manière efficace tout au long de l'année et où elle peut également se reproduire toute l'année. Plusieurs aquaculteurs ont alors décidé de se lancer dans l'exploitation de *C. quadricarinatus*, avec plus ou moins de succès. Certains, bien accompagnés ou mieux informés sur les façons d'élever cette écrevisse, ont pu continuer leur exploitation mais plusieurs, à cause d'une mauvaise gestion ou d'une nouvelle contamination au chlordécone de leurs bassins, ont dû fermer. Maintenant, un seul aquaculteur connu reste en activité en Martinique, basé sur le site du Carbet. L'exploitation a très vite été un succès, avec des rendements dépassant les espérances (officiellement jusqu'à 10 tonnes par an pour un exploitant), à tel point que ce crustacé est devenu très prisé sur l'île, les restaurateurs en faisant même un plat de luxe. Cependant, même si cette activité aquacole représente une grosse manne financière, elle s'appuie sur l'introduction d'une espèce exotique envahissante, vendue vivante aux particuliers ou sur les marchés, favorisant son introduction illégale dans le milieu.

II. Matériel biologique

a. *Cherax quadricarinatus*

Origine et distribution

Cherax quadricarinatus (von Martens 1868), communément appelée « écrevisse bleue » ou « écrevisse à pinces rouges » à cause de ses couleurs caractéristiques, est un crustacé décapode de la famille des Parastacidae (Figure I.10A). Originnaire du Nord de l’Australie et du Sud de la Papouasie Nouvelle-Guinée (Haubrock et al., 2021), cette espèce est très prisée en aquariophilie et en aquaculture grâce à sa facilité d’élevage, sa croissance rapide et sa couleur particulière (Azofeifa-Solano et al., 2017). C’est pour ces raisons qu’elle fut introduite dans de nombreux pays du monde, sur tous les continents, principalement en zones tropicales et subtropicales (Haubrock et al., 2021) (Figure II.7). A la suite de relâchers intentionnels, elle s’est alors retrouvée dans le milieu naturel. Étant peu exigeante vis-à-vis de la qualité de l’eau et possédant des capacités de dispersion importantes (Nunes et al., 2017) (voir Chapitre 2), elle a pu coloniser ces milieux et devenir invasive dans certains pays, ce qui en fait donc une espèce de plus en plus étudiée en recherche scientifique.

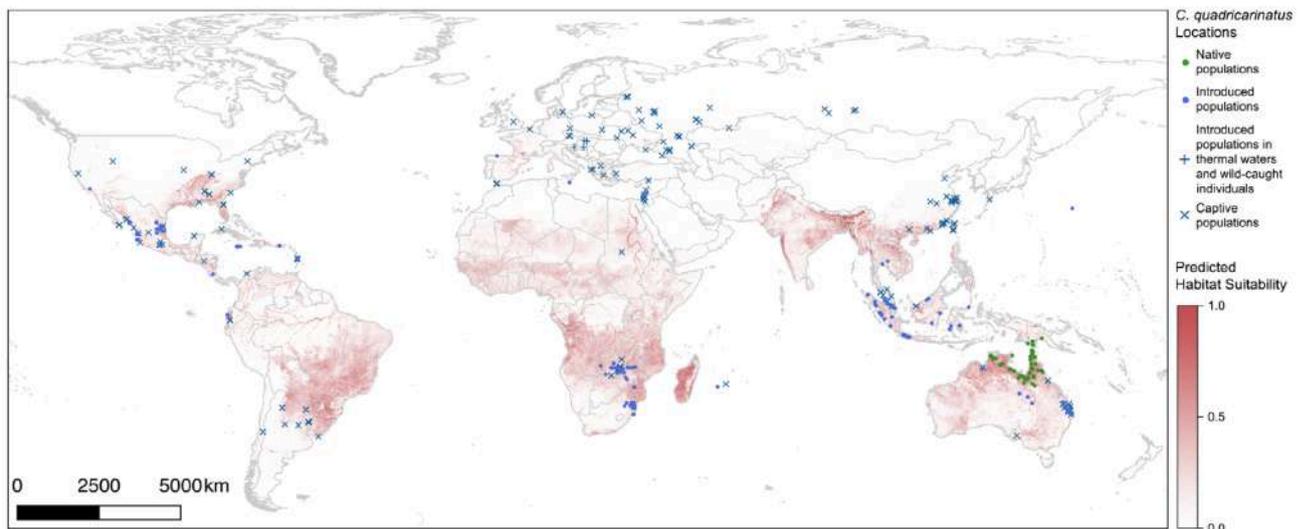


Figure II.7 : Carte de distribution mondiale de l'espèce *Cherax quadricarinatus*. Les populations natives sont représentées par les croix vertes et les populations introduites par les symboles bleus pour lesquelles, les élevages (captive populations) et les échappées (wild-caught populations) sont différenciés. La préférence en termes d'habitats (et notamment de conditions climatiques) est également mise en évidence (Haubrock et al., 2021).

Morphologie spécifique et dimorphisme sexuel

Cherax quadricarinatus possède une carapace lisse avec quatre lignes longues et distinctes, formant des crêtes, en position dorsale de la partie céphalique (Figure II.8). Trois épines sont observables, positionnées latéralement le long de la rainure cervicale (Belle and Yeo, 2010). Tous les individus ont une couleur caractéristique allant du bleu au bleu-vert (selon les caractéristiques du milieu dans lequel elle évolue), tachée de rouge ou marron au niveau des articulations et des segments abdominaux. Le seul dimorphisme sexuel réellement observé chez cette espèce est la tâche rouge présente sur la surface externe des chélicèdes chez les mâles (Figure II.8).

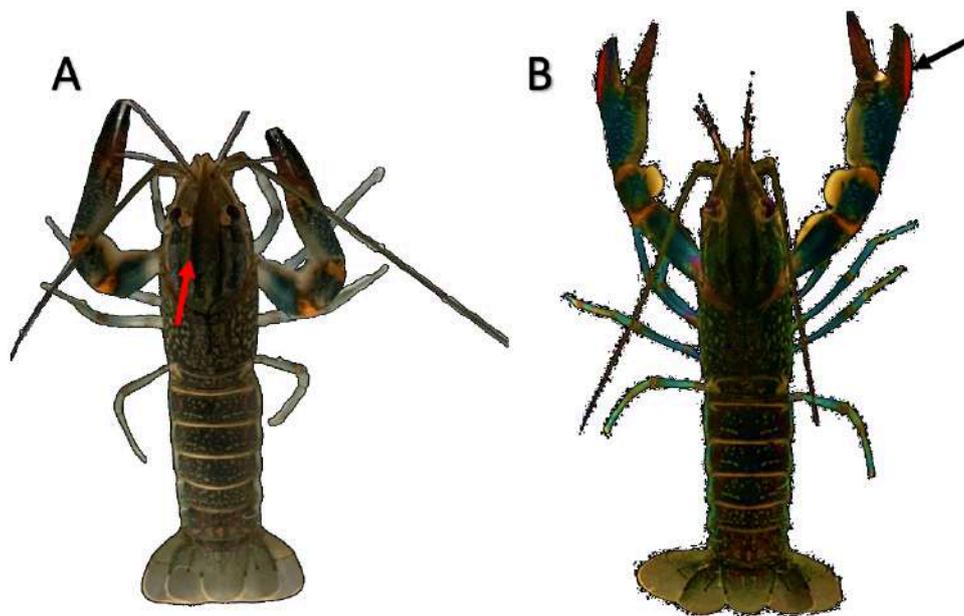


Figure II.8 : Illustration du dimorphisme sexuel entre la femelle (A) et le mâle (B) *Cherax quadricarinatus*. La flèche rouge pointe l'une des quatre crêtes cervicales et la flèche noire montre la tâche rouge caractéristique des mâles.

Croissance et reproduction

Les conditions de croissance de *C. quadricarinatus* en milieu naturel n'ont été que très peu étudiées mais elles sont bien connues en eau close, où cette espèce est largement cultivée (Bortolini et al., 2007). Sa croissance très rapide, estimée en moyenne à 2 grammes par semaine (Arzola-Gonzalez et al., 2012), peut donner des individus commercialisables (environ 30 grammes) dès 4 mois, ou encore de 100 grammes au

bout d'un an en moyenne (Wingfield, 2002), avec une espérance de vie qui peut atteindre 5 ans (Jones, 1990). Ainsi, des individus de tailles impressionnantes ont été référencés dans la littérature, atteignant jusqu'à 600 grammes et 25 cm (De Moor, 2002; Ahyong and Yeo, 2007). Cependant, ces mensurations ne semblent pas atteignables en milieu naturel et les poids constatés semblent être aux alentours de 100 grammes, pouvant parfois atteindre 200 grammes, pour des individus plus exceptionnels (Haubrock et al., 2021). En moyenne, deux épisodes de mue sont observés dans leur milieu d'origine (Australie) après la saison de reproduction, à l'été et au printemps. Cependant, une différence en termes de croissance est observable entre les mâles et les femelles : les premiers pouvant atteindre des tailles plus importantes que les femelles et plus rapidement (Cortes-Jacinto et al., 2005). En effet, les mâles ont une fréquence de mue plus importante, en raison de leur plus faible investissement dans la reproduction comparée aux femelles. En plus de leurs taches rouges, les mâles vont également développer des chélipèdes plus larges et plus grands que ceux des femelles, alors que ces dernières auront un abdomen plus large, utilisé pour l'incubation des œufs, comme chez l'ensemble des espèces d'écrevisses (Stein, 1976; Grandjean et al., 1998).

La maturité sexuelle est atteinte à environ 4 ou 5 mois pour les femelles (De Moor, 2002) et la période de reproduction s'étend de Septembre à Avril en Australie, dans son aire de répartition naturelle (Bortolini *et al.*, 2007). Cependant, la reproduction peut être possible tout au long de l'année si la température de l'eau dépasse les 20°C (King, 1993; de Moor, 2002; Bortolini et al., 2007) avec un nombre d'évènements de reproduction pouvant aller jusqu'à 3 voire, plus rarement, jusqu'à 5 par femelle avec des pontes comprenant de 200 à 500 œufs (de Moor, 2002; Tropea et al., 2010; Arzola-Gonzalez et al., 2012). Le nombre d'œufs pondus va être corrélé positivement avec la taille de la femelle et la température ambiante (Jones, 1990; King, 1993).

Lors de l'accouplement, le mâle *C. quadricarinatus* va déposer un spermatophore sur la partie inférieure de la femelle portant les œufs qui seront alors fertilisés dans les 24 heures qui suivront (Curtis and Jones, 1995). Les œufs sont ensuite incubés au niveau de l'abdomen de la femelle, maintenus par les pléopodes jusqu'à l'éclosion, environ 4 à 6 semaines après (Jones, 1990). Le développement se fait à l'intérieur des œufs, en

passant par 10 stades de pré-éclosion et 3 stades de post-éclosion, pour une durée totale de 30 à 40 jours suivant la température d'incubation (García-Guerrero *et al.*, 2003). Le développement des petits est direct avec une absence de stade larvaire (Tropea *et al.*, 2010). Lorsque les œufs ont éclos, les individus juvéniles, d'environ 1 cm de long, sont des adultes miniatures. Dans un premier temps, ils resteront accrochés à l'abdomen de la femelle, pendant 1 ou 2 jours avant de prendre leur indépendance (Lawrence and Jones, 2002).

Exigences écologiques

Cherax quadricarinatus préfère les zones lenticules des ruisseaux permanents, telles que les fosses profondes et turbides, ou encore les lacs (de Moor, 2002; Tropea *et al.*, 2010; Marufu *et al.*, 2018), tant qu'elle peut trouver des crevasses et des roches qui lui serviront de caches et de zones de chasse (Belle and Yeo, 2010). Cependant, elle peut rapidement coloniser le linéaire entier d'un cours d'eau (Nunes *et al.*, 2017). Ses fortes capacités de dispersion, estimées à plus de 10 km par an vers l'amont (Madzivanzira *et al.*, 2020), lui permettent de remonter les zones plus turbulentes afin de s'établir dans ses zones préférentielles.

L'écrevisse bleue se révèle être très plastique en termes d'exigences vis-à-vis des caractéristiques physico-chimiques du milieu où elle évolue. Ses tolérances en termes de température sont très larges : les températures létales sont celles supérieures à 35°C et celles inférieures à 3°C, même si certains adultes sont capables de tenir une courte durée au-delà de ces limites (King, 1994). La température minimale nécessaire pour observer une croissance chez cette espèce est de 20°C avec des optimums en termes de croissance et de reproduction compris entre 23°C et 31°C (de Moor, 2002; Tropea *et al.*, 2010).

Cherax quadricarinatus est une espèce d'eau douce mais elle est capable d'osmoréguler à des concentrations en sel comprises entre 15 et 25 mg.L⁻¹ et peut même supporter une courte exposition à l'eau de mer. Le taux de survie maximal a été observé à une salinité de 12 mg.L⁻¹ (de Moor, 2002; Tropea *et al.*, 2010), cependant elle joue un rôle important au moment de l'éclosion. Anson and Rouse (1994) mettent en évidence une décroissance du succès d'éclosion avec l'augmentation de la salinité (de 1 à 20 mg.L⁻¹),

ainsi qu'une sensibilité plus grande des juvéniles, sûrement due à de moins bonnes capacités d'osmorégulation.

L'écrevisse bleue est aussi bien capable d'évoluer en condition de déficit en oxygène dissous qu'en excès, avec un optimum situé à des valeurs supérieures à 5 mg.L⁻¹ (de Moor, 2002; Tropea et al., 2010). Ses capacités de survie en condition anoxique lui permettent même de sortir de l'eau et de pratiquer la respiration aérienne, si elle a la possibilité d'humidifier ses branchies ou si l'humidité ambiante est suffisante (McMahon, 2002; Guo et al., 2019). Cette sortie de l'eau peut lui permettre d'échapper à des situations de stress induites par son environnement aquatique, auxquelles elle veut échapper, ou bien même de migrer afin de coloniser de nouvelles zones aquatiques.

En Australie, *Cherax quadricarinatus* évolue dans des eaux à pH neutre, légèrement supérieur à 7 (Belle and Yeo, 2010), mais de plus larges variations peuvent être observées, avec une bonne adaptation de l'écrevisse. Par exemple, certaines zones du Nord du Queensland, en Australie, ont des eaux avec des pH approchant 6 alors que dans les territoires du Nord, certaines eaux ont été mesurées à 8 (Haubrock et al., 2021).

b. La faune dulçaquicole locale

Généralités

Les inventaires de la faune dulçaquicole de Martinique sont très rares et le dernier en date est celui réalisé par Lim et al. (2002). Établir un inventaire précis dans une zone insulaire telles que la Martinique n'est pas chose aisée, à cause des conditions de terrain parfois difficiles, et ces auteurs retiennent donc une liste de 21 espèces de poissons, appartenant à 6 ordres et 11 familles différentes, et 13 espèces de macro-crustacés décapodes, appartenant à 4 familles différentes (Lim et al., 2002). Tous ces genres ne sont pas tous fréquemment rencontrés dans les rivières de Martinique. Certaines espèces, très rarement retrouvées en eau douce (comme les crevettes *Palaemon pandaliformis* ou *Potimirim potimirim*) ou alors n'occupant ces écosystèmes que de manière temporaire (tels que les brochets *Centropomus undecimalis* et *Centropomus ensiferus*), ne seront pas décrites dans la présentation suivante. La planche photo en

annexe (Annexe 1) de la thèse reprend de manière résumée et illustrée les informations ci-dessous.

La faune de petite taille, telle que les vers et les larves aquatiques d'insectes, ne représente qu'une biomasse mineure dans les rivières de Martinique.

Les décapodes

Les quatre familles de décapodes sont les *Atyidae* (2 genres et 4 espèces), les *Xiphocarididae* (une seule espèce), les *Palaemonidae* (2 genres et 7 espèces) et les *Pseudothelphusidae* (une espèce). Les *Palaemonidae* sont les plus représentées en rivière avec notamment 5 espèces majoritaires : *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758), *Macrobrachium faustinum* (de Saussure, 1857), *Macrobrachium heterochirus* (Wiegmann, 1836), *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) et *Macrobrachium crenulatum* (Holthius, 1950). Ces crevettes possèdent des grandes pinces, plus ou moins larges suivant les espèces, et sont localement appelées « ouassous » ou « z'habitant ». Les *Atyidae* sont dominées par *Atya innocous* (Herbst, 1792), *Atya scabra* (Leach, 1815) et *Micratya poeyi* (Guérin-Méneville, 1855) et sont localement appelées « boucs ». Le seul représentant de la famille des *Xiphocarididae* est la « pissette », *Xiphocaris elongata* alors que les *Pseudothelphusidae* représentent la seule famille de crabe inféodée aux eaux douces, uniquement représentée par *Guinotia dentata* (Latreille 1825), le cirrique des rivières.

Les poissons

Les principales espèces de poissons d'eau douce de Martinique appartiennent à 5 familles : les *Anguillidae*, les *Mugilidae*, les *Rivulidae*, les *Eleotridae* et les *Gobiidae*. L'anguille américaine *Anguilla rostrata* est l'unique représentante de la famille des *Anguillidae*, à l'instar de *Anablepsoides cryptocallus*, le seul représentant de la famille des *Rivulidae*. Les *Mugilidae* comprennent localement 2 espèces appelées « mulot » : *Agonostomus monticola* et *Mugil curema*. Les *Eleotridae* sont principalement représentées par *Dormitator maculatus*, *Guavina guavina* et *Gobiomorus dormitor*, tous appelés « dormeur ». Enfin, les *Gobiidae* rassemblent 2 espèces principalement retrouvées dans

les cours d'eau de Martinique, toutes deux appelées « colle-roche » : *Sicydium punctatum* et *Sicydium plumieri*.

Les espèces introduites

Cependant, il faut également ajouter plusieurs espèces exotiques introduites, depuis plus ou moins longtemps, qui sont maintenant largement rencontrées dans le milieu naturel. En ce qui concerne les poissons, il en existe 6 espèces :

- Le tilapia *Oreochromis mossambicus* : importé en Martinique en 1950 pour l'aquaculture et la consommation, il a été relâché délibérément dans le milieu naturel et est maintenant fréquemment retrouvé dans les parties aval des cours d'eau.
- Le pléco *Hypostomus robinii* : très récemment découvert en Martinique, en 2018, il a rapidement colonisé la totalité des bassins versants où il a été relâché volontairement par des aquariophiles (voir Annexe 2).
- Trois espèces de *Poeciliidae* : le guppy *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) et la golomine *Poecilia vivipara* (Bloch et Schneider, 1801) ont été introduits aux alentours des années 1940-1950 dans le cadre d'une lutte contre les moustiques, dont ils sont très friands (notamment des larves). Le Xipho porte-épée *Xiphophorus hellerii* a été introduit via des relâchers d'aquariophiles, probablement aux alentours des années 1970. Ces trois espèces sont maintenant acclimatées en Martinique, dans des densités plus ou moins importantes (le Xipho plutôt rare, le guppy très présent dans une majorité des cours d'eau et la golomine présente en zone de mangroves).
- Enfin, le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Hamilton, 1822) est un *Cyprinidae* très apprécié en aquariophilie, qui est d'ailleurs certainement responsable de son introduction en Martinique, sans pour autant qu'il soit possible de donner une date précise.

En ce qui concerne les crustacés, 3 espèces ont pu faire l'objet d'introduction en Martinique et se retrouvent maintenant dans le milieu naturel :

- L'écrevisse bleue *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1848), qui fait l'objet de cette thèse, introduite au début des années 2000 pour redynamiser l'aquaculture

en Martinique et qui se retrouve, à la suite de relâchers intentionnels, dans le milieu naturel (voir Chapitre 2).

- La chevrette d'élevage *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), importée au début des années 1970 pour l'aquaculture et qui a pu coloniser le milieu naturel, à partir des bassins d'élevage. Très peu compétitive, elle semble être de moins en moins présente dans les écosystèmes d'eau douce de Martinique.
- La « red cherry » *Neocaridina davidi* (Bouvier 1904) est originaire d'une vaste zone en Asie et est très appréciée en aquariophilie, où des sélections sont faites pour obtenir des individus très colorés, allant du rouge au noir, en passant par le jaune. Ces crevettes de la famille des *Atyidae* ne semble pas créer de déséquilibre particulier sur le milieu naturel et ne sont présentes que dans certaines zones très localisées en Martinique, certainement dû à des relâchers ponctuels d'aquariums.

Les gastéropodes

Les rivières de Martinique accueillent également une faune malacologique relativement complexe. Suite au dernier recensement de 2015, 11 taxons peuvent être considérés comme natifs : *Aplexa marmorata*, *Galba cubensis*, *Depanotrema cimex*, *D. surinamense*, *Pomacea glauca*, *Neritina virginea*, *N. punctulata*, *Neritilia succinea*, *Pyrgophorus parvulus*, *Pisidium punctiferum* et *Eupera viridans* (Delannoye et al., 2015). Cependant, pour la plupart de ces espèces, elles sont plutôt rarement retrouvées lors des prospections en rivières (hormis les *Neritidae* en zone torrentielle), et ont été supplantées par des espèces exotiques, introduites majoritairement via le commerce de plantes d'aquarium : *Marisa cornuarietis*, *Helisoma duryi*, *Biomphalaria kuhniana*, *Gyraulus chinensis*, *Amerianna carinata*, *Physa acuta*, *Tarebia granifera* et *Melanoides tuberculata* (Delannoye et al., 2015). Ces deux dernières espèces (*T. granifera* et *M. tuberculata*) sont les deux espèces le plus fréquemment rencontrées en milieu dulçaquicole et sont divisées chacune en plusieurs morphes : ACH, RPL et RTM pour *T. granifera* et FAL, PAP, MAD, PDC, CPF, AMA, VEL et JOS pour *M. tuberculata* (Delannoye et al., 2015).

Une faune dulçaquicole sensible

Toute cette faune très spécifique aux écosystèmes insulaires tropicaux est fragile et il semblerait que les peuplements de crustacés et de poissons de rivières soient en nette régression, que ce soit en termes de richesse spécifique ou de biomasse (Lim et al., 2002). Ceci pourrait s'expliquer par une activité anthropique grandissante, avec des rejets industriels et/ou agricole, une surpêche (parfois par empoisonnement à une époque ?), l'introduction d'espèces exotiques envahissantes ou encore la modification de l'habitat avec la construction d'ouvrage qui rompt la continuité écologique et interrompt le processus de reproduction de ces espèces. En effet, comme pour la plupart des espèces d'eau douce (aussi bien crustacés que poissons) insulaires, les espèces dulçaquicoles de Martinique ont une tolérance à la salinité, héritée d'ancêtres marins et qui a perduré au cours de l'évolution (Lim et al., 2002). La quasi-totalité des espèces de crevettes et poissons indigènes de Martinique sont dites « diadromes », « ayant un cycle de vie entre mer et eau douce » (Lim et al., 2002). Certaines espèces, comme les crevettes et les *Gobiidae*, sont diadromes amphidromes : les adultes se reproduisent et pondent en eau douce. Les œufs vont alors être transportés par le courant vers l'embouchure, où, au contact de l'eau salée, ils vont éclore. Les larves vont vivre quelques temps (durée variable suivant l'espèce) en embouchure, avant de se métamorphoser et de remonter le cours d'eau pour accomplir son cycle de vie en eau douce (Lim et al., 2002). D'autres espèces comme les *Eleotridae*, les *Anguillidae* ou les *Mugilidae*, sont dites diadromes catadromes : les individus passent la majorité de leur vie en eau douce mais vont migrer en milieu marin pour se reproduire (Lim et al., 2002).

Chapitre 2 - Diversité génétique et distribution spatiale de *Cherax quadricarinatus* au sein des hydrosystèmes de Martinique



Introduction du Chapitre 2

Depuis plusieurs années, les invasions biologiques font l'objet de nombreuses études scientifiques, à cause de leur caractère paradoxal : comment un petit groupe d'individus, initialement inadapté au nouvel environnement d'accueil, peut-il s'établir, au point de remplacer des populations natives ? (Estoup et al., 2016). Une invasion se caractérise souvent par l'introduction d'un groupe d'individus réduit, appelé propagule, imposant donc un goulot d'étranglement démographique et donc une réduction de la variation génétique dans la population initiale (Simberloff, 2009). Ces petites populations fondatrices, issues bien souvent d'une même population source, sont soumises à des forces évolutives comme la dérive génétique, entraînant une réduction de variation génétique. Cette baisse de variabilité se retrouve donc amplifiée au fil des générations, puisque la reproduction se fait entre individus apparentés. Ceci a été mis en évidence par Kaňuch et al. (2021) qui ont démontré une baisse significative de la richesse allélique et de l'hétérozygotie, par rapport à la population source grâce à des expériences d'introductions volontaires de denticelle bariolée (*Metrioptera roeselii*). Cette baisse de variabilité génétique peut conduire à une baisse de la valeur sélective des individus (Estoup et al., 2016; Marques and Renesto, 2017). Cependant, dans le cadre des invasions biologiques, de nombreux exemples d'espèces introduites existent montrant malgré tout leur capacité à étendre leur présence en dehors de leur aire de répartition naturelle (Uller and Leimu, 2011).

C'est le cas notamment de l'écrevisse nord-américaine *F. limosus*, dont l'origine en Europe résulte d'un seul événement d'introduction de 90 individus, à la fin du 19^{ème} siècle en Pologne, probablement à partir d'une seule population d'origine (Delaware River, USA) (Lenka Filipová et al., 2011). Filipová et al. (2011) ont mené une étude sur la comparaison de la diversité génétique de populations échantillonnées, au sein de l'aire native de l'espèce (206 individus provenant de 44 populations) et en Europe (91 individus provenant de 25 populations). Ils ont caractérisé 18 haplotypes en Amérique du Nord, contre seulement deux en Europe (un majoritaire et un second, divergeant par une mutation et retrouvé uniquement au sein d'une population). Malgré cela, l'espèce a pu coloniser efficacement de nombreux écosystèmes aquatiques à travers l'Europe. En France par exemple, elle est présente dans tous les bassins

hydrographiques (Lenka Filipová et al., 2011; Kouba et al., 2014). Un exemple encore plus extrême est celui de l'écrevisse marbrée *P. virginalis* (Lyko, 2017), dont le régime de reproduction est la parthénogénèse. Il n'existe donc dans les populations naturelles que des femelles. Ce système de reproduction permet une augmentation rapide de la taille de la population. Ainsi, un individu introduit dans un nouvel écosystème peut engendrer rapidement une taille de population importante, permettant ainsi la colonisation de l'écosystème entier. En effet, chaque femelle peut se reproduire plusieurs fois par an, avec une moyenne de 90 œufs par événement de ponte (Hossain et al., 2019). A Madagascar, cette espèce a rapidement colonisé une bonne partie du réseau hydrographique, devenant l'espèce dominante : les densités de population sont variables, mais restent malgré tout élevées, avec un minimum de 192 individus capturés dans une rivière (Anjingilo) et un maximum de 817 pour la plus densément peuplée (Ihosy) (Andriantsoa et al., 2019). Malgré ce mode de reproduction clonal (induisant une signature génétique identique entre tous les individus), une forte variabilité phénotypique, ainsi qu'un fort potentiel adaptatif aux nouveaux environnements colonisés, ont été relevés (Andriantsoa et al., 2019; Gatzmann, 2019). Après un séquençage du génome de 11 écrevisses marbrées *P. virginalis*, provenant de plusieurs populations de différentes origines, Gatzmann (2019) met en évidence une variation génétique dans les régions codantes, due à des modifications épigénétiques (des méthylations de l'ADN ou l'apparition d'éléments transposables) (Estoup et al., 2016; Gatzmann, 2019). Ceci a pour effet d'augmenter la variabilité et la plasticité des gènes de manière bénéfique, permettant une adaptation rapide aux nouveaux environnements envahis (Estoup et al., 2016).

Cette perte de variabilité génétique, lors des processus d'invasions biologiques, peut être contrebalancée par des événements d'introduction multiples, qui vont apporter un brassage génétique important. Les deux espèces d'écrevisses américaines *P. leniusculus* et *P. clarkii*, introduites en Europe à plusieurs reprises, en sont de parfaits exemples (Petrušek et al., 2017; Oficialdegui et al., 2019). Ces deux espèces présentent un fort intérêt économique, notamment pour l'élevage, et ont donc été introduites dans de nombreuses régions du monde, pour cette raison (voir Introduction générale). Plus de 60 000 écrevisses signal (*P. leniusculus*) ont été introduites, de manière répétées, depuis 1959, se traduisant par une présence de cette espèce dans plus de 26 pays européens (Petrušek et al., 2017). Une étude phylogéographique, basée sur le séquençage d'une portion du gène mitochondrial COI, et portant sur l'analyse de 68 populations européennes, a révélé un polymorphisme très important. Au total, 27 nouveaux haplotypes (4 majoritaires), dont seulement deux étaient partagés avec les populations américaines (Petrušek et al., 2017), ont été mis en évidence (Figure III.1). De la même façon, l'écrevisse de Louisiane (*P. clarkii*) a été transloquée à travers le monde de manière assez complexe. Grâce à une récente étude phylogéographique à grande échelle, Oficialdegui et al. (2019) ont mis en évidence les itinéraires d'invasion. Pour cela, ils ont comparé une portion de l'ADN mitochondrial (COI) de 1062 écrevisses avec plus de 354 séquences de référence retrouvées dans un site de bancarisation des données génétiques « GenBank ».

L'échantillonnage provenait de 122 populations, représentant 22 populations indigènes et 100 introduites. Le schéma complexe d'introduction de l'écrevisse de Louisiane était déjà connu, avec des translocations croisées entre différentes régions du

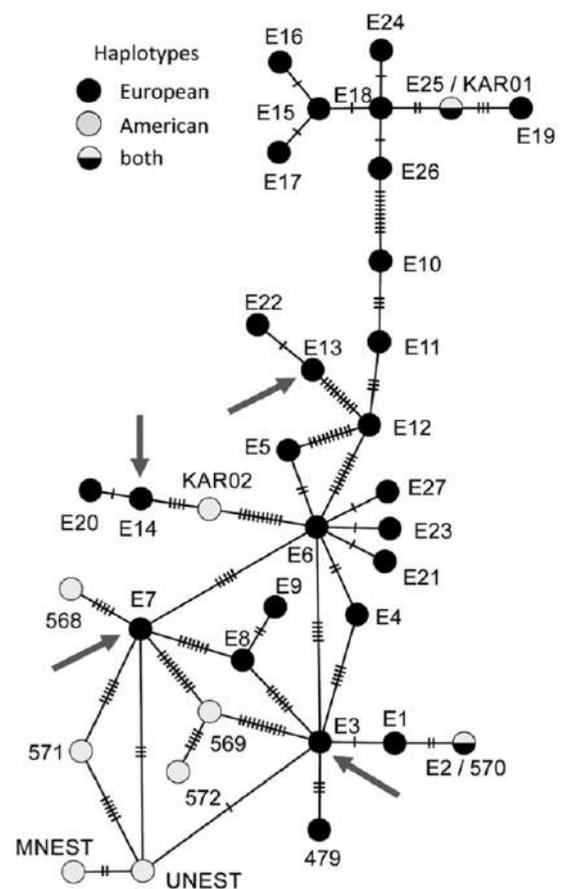


Figure III.1 : Analyse de la variabilité génétique des populations sauvages de l'écrevisse signal *Pacifastacus leniusculus*, invasive en Europe. Les cercles pleins correspondent aux haplotypes européens et les cercles blancs aux haplotypes retrouvés dans les populations américaines. Les haplotypes majoritaires sont mis en évidence par les flèches et les traits sur les lignes reliant les haplotypes représentent le nombre de mutations entre haplotypes.

monde et donc de multiples évènements introductions. L'analyse en réseau d'haplotypes a permis de mettre en évidence une forte diversité haplotypique, aussi bien dans les zones de répartition naturelle, que dans les zones envahies (Oficialdegui et al., 2019). Il semblerait qu'il existe deux voies d'introduction indépendantes (vers l'Ouest et vers l'Est), avec des introductions dites « d'étape », et donc de nombreux haplotypes partagés par au moins deux localités. Quelques individus ont ainsi été introduits au Japon, en provenance des Etats-Unis, eux-mêmes transloqués ensuite vers la Chine. Vers l'Est, l'écrevisse de Louisiane aurait été introduite d'abord en Espagne, avant d'être disséminée dans la quasi-totalité des pays d'Europe, avec de possibles introductions secondaires en Europe Centrale (Oficialdegui et al., 2019; 2020).

L'historique d'introduction de *C. quadricarinatus* semble comparable à celui de l'écrevisse de Louisiane (*P. Clarkii*). Comme cette dernière, *C. quadricarinatus* est une espèce phare en astaciculture, notamment dans les régions tropicales et subtropicales où les niveaux de production peuvent être très élevés (Haubrock et al., 2021). C'est pour cette raison qu'elle a été introduite dans de nombreux pays à travers le monde, où elle s'est ensuite retrouvée dans le milieu naturel, à la suite d'échappées d'élevage ou de relâchers intentionnels (Haubrock et al., 2021). En Martinique, l'introduction de *C. quadricarinatus* aurait eu lieu au début des années 2000, à partir d'un lot d'une 20aine d'individu, dont le sex-ratio reste inconnu, en provenance de Cuba (Baudry et al., 2020). Ce faible nombre d'individus fondateurs (issus eux-mêmes d'une introduction d'étape) devrait être à l'origine d'un fort effet de fondation, appauvrissant la diversité génétique au sein des populations sur le territoire martiniquais. Cependant, le risque d'introduction secondaire n'est pas à négliger : *C. quadricarinatus* est une espèce d'écrevisse très appréciée en aquariophilie, grâce à sa couleur bleu électrique et sa facilité d'élevage (Haubrock et al., 2021). Plusieurs études, notamment sur les écrevisses, mettent en cause la responsabilité de l'aquariophilie dans leur introduction dans le milieu naturel : parmi les 12 espèces d'écrevisses exotiques retrouvées en Europe Centrale, Chucholl (2013) classe comme « commonly available online » une espèce (*C. destructor*) et quatre espèces comme « very commonly available online » (*C. quadricarinatus*, *P. alleni*, *P. clarkii* et *P. virginialis*). En Grèce, Papavlasopoulou et al.

(2014) ont référencé les espèces d'écrevisses vendues dans 11 animaleries de différentes villes (Athènes et Thessalonique, les deux plus importantes villes du pays, et Ioannina, la plus importante ville provinciale) : 8 espèces exotiques ont été retrouvées, dont 3 à fort risque (*P. clarkii*, *C. destructor* et *C. quadricarinatus*) (Papavlasopoulou et al., 2014), d'après l'indice FI-ISK (Tricarico et al., 2010). L'écrevisse a été placée sur la liste de rang 2 des espèces exotiques interdites sur le territoire Martiniquais (NOR: TREL1934054A) mais le risque est toujours présent. Cette espèce, *C. quadricarinatus*, est très prisée en aquariophilie et il n'est pas compliqué d'en obtenir via Internet, sur des sites spécialisés (<https://www.floraquatic.com/ecrevisses-d-eau-douce/14069-cherax-quadricarinatus-blue.html>) ou tout simplement sur LeBonCoin, célèbre site de vente entre particulier.

Le premier article scientifique présenté dans ce chapitre a été publié dans *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. Il porte sur d'une part sur l'évolution de la distribution de *C. quadricarinatus* en Martinique depuis sa découverte en milieu naturel en 2010 par les services de l'état et d'autre part sur la caractérisation de la variabilité haplotypique (séquençage de 500 paires de bases du gène codant pour le cytochrome oxydase I - COI) au sein des populations caractérisées, afin de comprendre l'histoire des introductions en Martinique.

Ce travail a permis de montrer une augmentation du nombre de populations en milieu naturel, avec 10 populations caractérisées (contre 4 populations connues en 2015). Pour cet inventaire, des nasses appâtées ont été utilisées. Ce moyen de capture est le plus efficace pour mettre en évidence la présence d'écrevisse, notamment lorsque l'on échantillonne des rivières profondes et turbides comme cela peut souvent être le cas en Martinique. Cependant, l'efficacité de cette méthode dépend de la densité de la population et de l'activité des écrevisses : plus la densité de la population est importante, plus sa détection en est facilitée. Cette méthode est cependant assez lourde à mettre en place, notamment pour une utilisation à large échelle, sur l'ensemble du réseau hydrographique martiniquais. Cette technique d'inventaire s'avère être très chronophage et parfois très difficile à mettre en place dans les endroits très accidentés.

Avec l'essor des nouvelles technologies d'amplification de l'ADN et de séquençage, de nouvelles méthodes d'inventaires biologiques se sont développées, ne nécessitant pas la capture ou l'observation des individus pour les caractériser (Hopkins and Freckleton, 2002; Wheeler et al., 2004). Elles se basent sur le principe que les espèces libèrent dans l'environnement des fragments d'ADN (ADN environnemental - ADNe), tels que du mucus, des fragments de peau/écailles/cuticule, ou encore des fèces. La technique ADN environnemental (ADNe) est maintenant largement connue, notamment dans le cadre des suivis des milieux aquatiques et la conservation des espèces aquatiques, et elle a pris de l'ampleur, avec l'étude de Ficetola et al. (2008). Ces auteurs ont mis au point cette méthode pour détecter une espèce de crapaud envahissante (*Rana catesbeiana*), en France (étangs de surface allant de 1000 à 10000 m²), sans nécessité de contacter visuellement les individus ciblés, et à tous les stades de vie, en développant des amorces PCR spécifiques (Ficetola et al., 2008). Depuis, le nombre d'études utilisant cette méthode ADNe a augmenté de manière exponentielle, que ce soit pour des inventaires de biodiversité, de la recherche d'espèces exotiques envahissantes, ou à l'inverse en danger d'extinction. Dans la base de données bibliographiques Web of Science, près de 3100 articles scientifiques traitant d'« environmental DNA » sont référencés au total, pour la période 2008-2022 (Figure III.2).

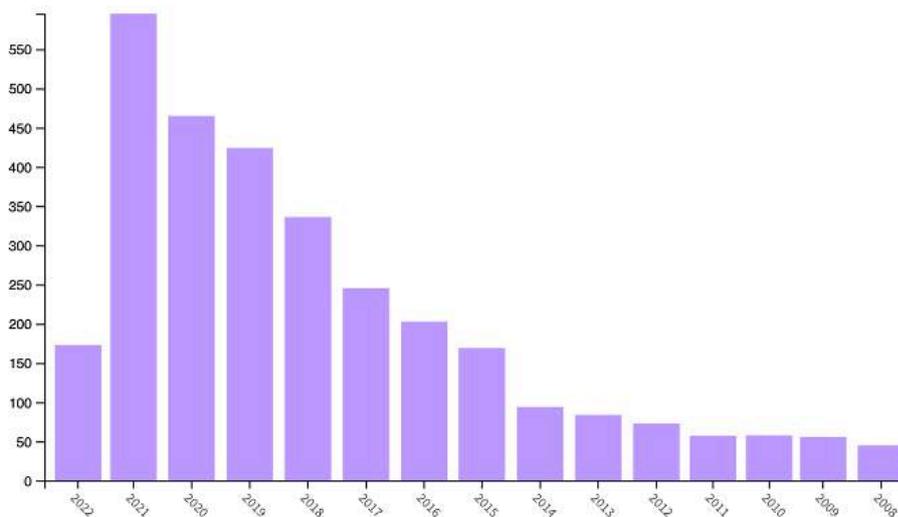


Figure III.2 : Évolution du nombre d'articles scientifiques (référencés dans la base de données Web of Science - « environmental DNA ») depuis 2008 (nombre d'articles antérieurs cumulés) et jusqu'à 2022 (en cours).

La méthode ADN environnemental a été largement utilisée dans le cadre des invasions biologiques concernant les écrevisses exotiques envahissantes (Manfrin et al., 2019). Une invasion d'écrevisse exotique envahissante est souvent difficile à détecter : leur rythme de vie nocturne et leur tendance à utiliser les roches pour se cacher, les rendent difficile à observer. Lorsque c'est le cas, la population est bien souvent déjà solidement établie et il devient presque impossible de l'éradiquer. L'ADNe permet une détection précoce de ces écrevisses exotiques envahissantes et a notamment été utilisé pour la détection des espèces exotiques américaines. Ainsi, les études utilisant la méthode ADNe et ciblant des espèces d'écrevisses se sont focalisées majoritairement sur les espèces exotiques américaines les plus répandues en Europe : *P. leniusculus*, *P. clarkii* et *F. limosus* (Figure III.3) (voir référence dans Tableau III.1). Enfin, à peine un quart des études ADNe retrouvées dans Web of Science (« environmental DNA » + « invasive crayfish ») ciblent des espèces d'écrevisses envahissantes que l'on peut qualifier d'« émergentes », comme *P. virginialis*, *F. immunis* ou encore *F. rusticus* (Figure III.3). La démocratisation de cet outil a mené à une diversité florissante de protocoles, avec des efficacités variables suivant la méthode de prélèvement sur le terrain, la méthode d'extraction de l'ADN, ou encore l'optimisation du protocole PCR (Tableau III.1). Le prélèvement de l'ADNe, à partir des échantillons d'eau, se faisait initialement par centrifugation (Ficetola et al., 2008). Mais récemment, la méthode par filtration s'est développée, démontrant des rendements bien plus efficaces (Deiner et al., 2015), avec un choix de filtres différent en termes de composition (PolyVynilidene DiFluoride, PolyEtherSulfone, Nitrocellulose, PolyCarbonate Track Etch, Microfibre de verre) (Djurhuus et al., 2017), et de taille de pores (de 0.22 µm à 1.2 µm) (Majaneva et al., 2018; Atkinson et al., 2019; Lawson Handley et al., 2019). Ces études démontrent une efficacité supérieure des filtres en Nitrocellulose, avec des tailles de pores de 0.45 µm, pour la détection des espèces en eau douce. En laboratoire, l'ADNe est ensuite extrait à partir des filtres, avec de meilleurs rendements observés en utilisant des kits d'extraction (Qiagen DNeasy ou MoBio PowerWater par exemple) par rapport à l'extraction Phenol-Chloroform, communément utilisée (Deiner et al., 2015; Djurhuus et al., 2017).

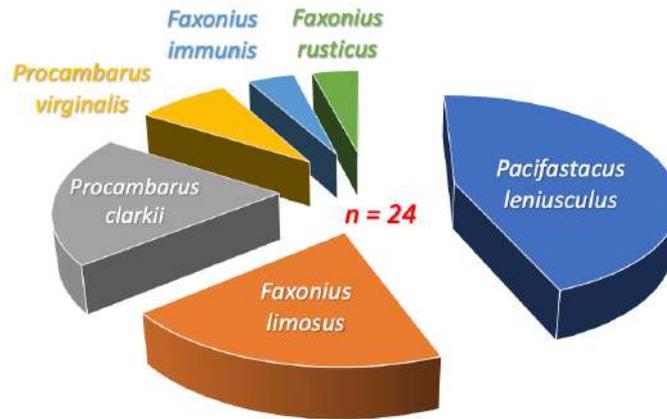


Figure III.3 : Proportion du nombre d'articles utilisant la méthode ADN environnemental pour la détection de chaque espèce d'écrevisse exotique envahissante (d'après Web of Science – « environmental DNA » « invasive crayfish »)

Toutes les études ADNe portant sur les espèces eucaryotes ciblent les gènes mitochondriaux (12S, 16S, 28S ou Cytochrome Oxydase sous-unité I) (Tableau III.1). Le génome mitochondrial a toujours été considéré comme la structure génétique privilégiée pour l'identification taxonomique, grâce à la taille réduite de la molécule, son abondance dans les tissus, son absence (ou très faible taux) de recombinaison entre congénères d'une même espèce (Gissi et al., 2008). Le nombre de mitochondries par cellule pouvant s'élever à près de 1000, ceci rend l'ADN mitochondrial bien plus abondant dans l'environnement que l'ADN nucléaire, et donc plus facilement détectable par la méthode ADNe (Jo et al., 2022). Ces études ADNe ciblent des fragments d'ADN mitochondrial courts (< 150 paires de bases), moins susceptibles à la dégradation dans le milieu (Jo et al., 2022). Ainsi, le programme Barcode of Life a été créé en 2004 et compte aujourd'hui des millions d'espèces répertoriées, utilisables pour l'optimisation des protocoles.

Cette méthodologie a donc été appliquée à l'échelle du réseau hydrographique martiniquais pour compléter la carte de distribution de *C. quadricarinatus*. Elle a fait l'objet du second article de ce chapitre, intitulé « Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot : an eDNA-based success story », publié dans *Ecological Indicators* en 2021. Nous avons choisi d'utiliser la technique par filtration sur le terrain, avec des filtres en Nitrocellulose de 0,45 µm de taille de pores. L'ADN total a été extrait grâce au kit Qiagen DNeasy blood and tissue et la présence de l'écrevisse a été mise en

évidence par PCR quantitative. Pour cela, un jeu d'amorces (forward et reverse) et une sonde fluorescente (permettant une double sécurité pour les faux-positifs) ont été dessinés grâce au logiciel Geneious, ciblant un fragment de 109 paires de bases, dans la région 16S du gène mitochondrial. Leur spécificité a été testée *in-silico*, en les appliquant sur des séquences génétiques d'espèces co-occurrentes en Martinique (disponibles dans la base de données GenBank). Enfin, elles ont été testées *in-vitro*, en laboratoire, sur de l'ADN extrait à partir d'autres espèces d'écrevisses. Grâce à cela, une carte précise de la distribution de *C. quadricarinatus*, sur près de 60 rivières de Martinique, a pu être établie, mettant en évidence l'ampleur de l'invasion, avec certains bassins versants totalement envahis.

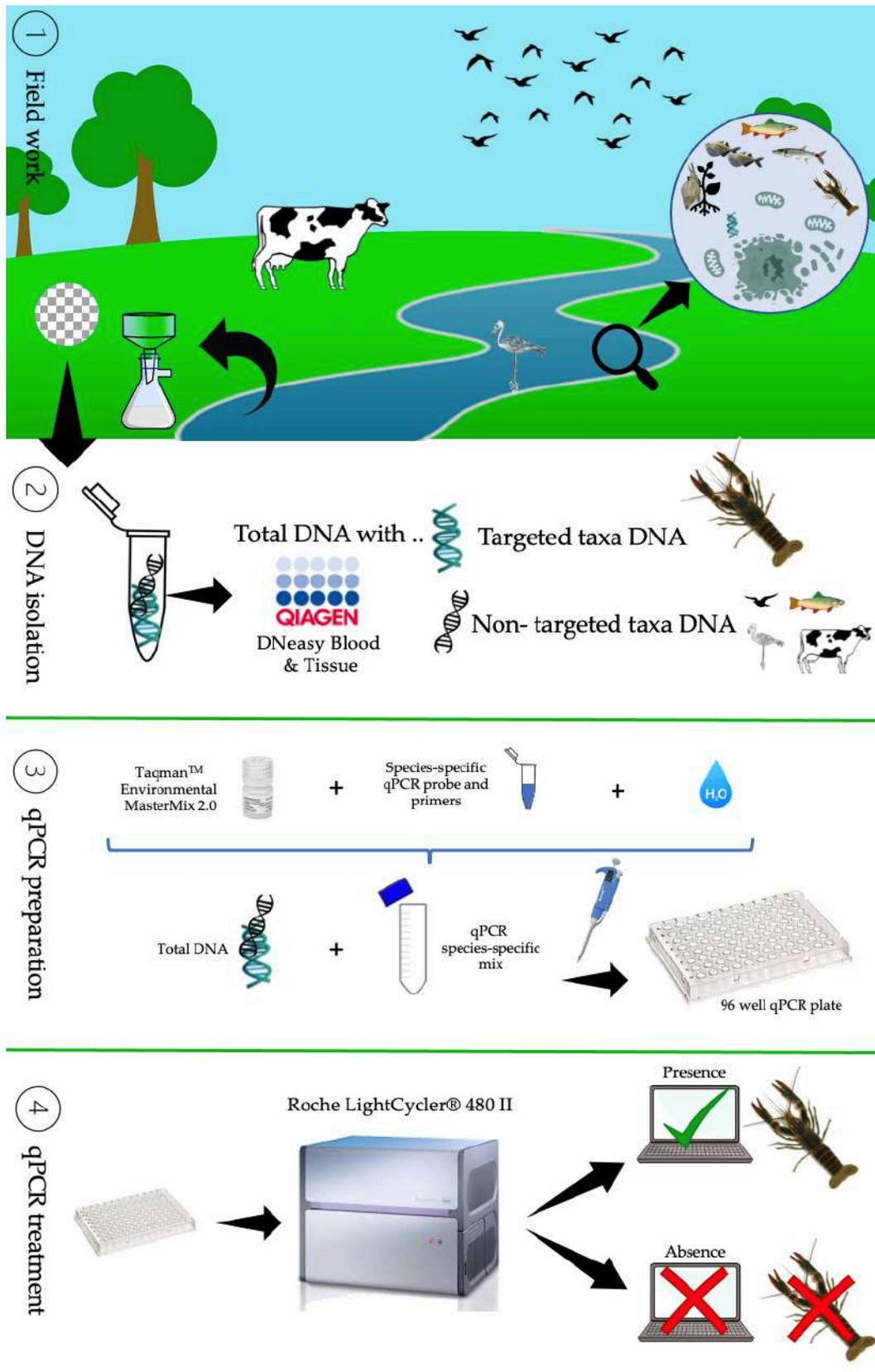


Figure III.4 : Schéma explicatif de la méthode de détection précoce par ADN environnemental, développée et optimisée pour *Cherax quadricarinatus* en Martinique, de la filtration sur le terrain (1) aux différentes étapes en laboratoire (2, 3 et 4).

Tableau III.1 : Synthèse bibliographique des études « ADN environnemental » disponibles dans la base de données Web of Science, sur les espèces d'écrevisses exotiques envahissantes (« invasive crayfish »).

Species	Year	Country	Primers	Probe	Fragment length	Gene targeted	Method	Reference
<i>Procambarus clarkii</i> <i>Pacifastacus leniusculus</i> <i>Faxonius limosus</i>	2022	Switzerland	F 5'-AGACCTTGACCTTAACTGGTTCA-3' R 5'-CAGCCCAGTATG6AA6CCTTGA-3' F 5'-GTSCGATTAGCTGCAAAATAAATTG-3' R 5'-CTTCCCTAGCATATAAAGTCTT5AA-3' F 5'-GGAGTTGGACAGCGTGAA-3' R 5'-CGCATTCGATCCATAGT5ATTCC-3'	5'-YYE-AACTACATCACCCACCATT-MGB-3' 5'-YYE-TGAATCACCGCAACAGCAGT-MGB-3' 5'-FAM-ATCCTCCTCTCGCTTGC-MGB-3'		COI ; 16S ; 28S	Filtration	Alex C. King, Raphael Krieg, Anna Weston, Armin K. Zenker (2022). Using eDNA to simultaneously detect the distribution of native and invasive crayfish within an entire country. <i>Journal of Environmental Management</i> 302. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113929
<i>Procambarus clarkii</i>	2017	China	F 5'-AACTAGGGTATAGTTGAGAG-3' R 5'-CAGAAGCTAAAGGAGGATAA-3'	5'-FAM-AGGAGTTGGAACAGGATGGACT-MBG-3'	65 bp	COI	Filtration	Cai W, Ma Z, Yang C, Wang L, Wang W, Zhao G, et al. (2017) Using eDNA to detect the distribution and density of invasive crayfish in the Honghe-Hani rice terrace World Heritage site. <i>PLoS ONE</i> 12(5): e0177724. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177724
<i>Procambarus clarkii</i>	2014	France	F 5'-AACTAGGGTATAGTTGAGAG-3' R 5'-CAGAAGCTAAAGGAGGATAA-3'	5'-FAM-AGGAGTTGGAACAGGATGGACT-MBG-3'	65 bp	COI	Centrifugation	Tréguier A, Paillisson JM, Dejean T, Valentini A, Schlaepfer, MA, Roussel JM (2014). Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish <i>Procambarus clarkii</i> in freshwater ponds. <i>Journal of Applied Ecology</i> 51: 871-879 https://doi.org/10.1111/1365-2664.12262
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	2019	Japan	F 5'-ACCTGCCCATGGGTTCTAAAAG-3' R 5'-TTGTCCAACCAATTCATTAGCCCTC-3'	5'-FAM-AAGGCTAGAATGAATGGTTGGATA MRA-3'	159 bp	16S	Filtration	Ikeda K, Doi H, Terui S, Kato A, Mitsuoka T, Kawai T, Negishi J (2019). Estimating native and invasive crayfish distributions in relation to culvert barriers with environmental DNA. <i>Freshwater science</i> 38. https://doi.org/10.1086/704998
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	2022	Luxembourg	Pacif-F3 : 5'-ACTAGAGGAATAGTTGAAAGAGG-3' Pacif-B3 : 5'-GGACTGCTGTAATAAATACAGAT-3' Pacif-FIP: 5'-TCCTAAATCAACAGAGCCCTGCAATTTTGGATGAACTGTTATCCTCCT-3' Pacif-BIP: 5'-TTCACITCAITTAGCGGGTGTTCITTTTGATCTATAGTTATWCCTRCCTTCG-3' Pacif-LF: 5'-TGAGCAATAGCCGCTGCT-3' Pacif-LB: 5'-GGGGCTGAAATTTATAACTACAGCTA-3'			COI	Filtration	Porco D, Hermant S, Purnomo CA, Horn M, Marson C, Colling G (2022). eDNA-based detection of the invasive crayfish <i>Pacifastacus leniusculus</i> in streams with a LAMP assay using dependent replicates to gain higher sensitivity. <i>Scientific Reports</i> 12: 6553 https://www.nature.com/articles/s41598-022-10545-w.pdf
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	2018	Wales, UK	ApalP1en16SF: 5'-AGTTACTTTAGGATAACAGCGT-3' ApalP1en16SR: 5'-CTTTAATTCAACATCGAGGTGCG-3'		83 bp	16S	Filtration	Robinson CV, Uren Webster TM, 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. <i>Biological Conservation</i> 222: 241-252. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.04.002
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	2018	Scotland, UK	5'-ATAGTTGAA AGAGGAGTGGTACT-3' 5'-TAA ATCAACAGAAAGCCCTGCA-3'	FAM-5'-CCTCCTCTAGCAGCGCTATTGCTCATGC-3'-BHQ1	87 bp	COI	Filtration	Harper, KJ, Anucha PN, Turnbull JF, Bean CW, Leaver MJ (2018). Searching for a signal: Environmental DNA (eDNA) for the detection of invasive signal crayfish, <i>Pacifastacus leniusculus</i> (Dana, 1852). <i>Management of Biological Invasions</i> 9: 137-148. https://doi.org/10.3391/mbi.2018.9.2.07
<i>Procambarus clarkii</i>	2018	Belgium	R 5'-AACTAGGGTATAGTTGAGAG-3' F 5'-CAGAAGCTAAAGGAGGATAA-3' F 5'-CCTGTGGTAGAGTTGGCAG-3' R 5'-CCGTAGCCCCAGAAGACAAT-3'		96 bp 109 bp	COI COIII	Filtration	Geerts AN, Boets P, Van den Heede S, Goetals P, Van der heyden C (2018). A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. <i>Ecological Indicators</i> 84: 564-572 https://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.08.068
<i>Procambarus virginalis</i>	2019	Germany	F 5'-GTATAGTTGAGGGGAGTA -3' R 5'-CCATAGTATACCAGCTGCC - 3'	6-FAM -5'- AGGTAATTTTCTTGCA-3' - BHQ-1	189 bp	COI	Filtration	Mauvisseau Q, Tônges S, Andriantsoa R, Lyko F, Sweet M (2019). Early detection of an emerging invasive species: eDNA monitoring of a parthenogenetic crayfish in freshwater systems. <i>Management of Biological Invasions</i> 10: 461-472. https://doi.org/10.3391/mbi.2019.10.3.04
<i>Pacifastacus leniusculus</i> <i>Faxonius limosus</i> <i>Procambarus virginalis</i>	2020	Central and Western Europe	F 5'-GAGTGGTACTGGTAACTG-3' R 5'-GAAGAAAACCCCGCTAAATGAAG-3' F 5'-CCTCCTCTCGCTTCTGCAAT-3' R 5'-AACCCCTGCTAAATGCAACG-3' F 5'-ACGGCAGCTGATAAATCATG-3' R 5'-TCTCCTCCACAGCAGGATC-3'	VIC-5'-CAGCGGCTATTGCT-3'-MGBFNQ FAM-5'-CTCATGCAGGGCATCAGTGG-3'-MGBFNQ FAM-5'-CCGCTATTTGTTGGTCAGTA-3'-MGBFNQ		COI	Filtration	Rusch JC, Mojžišová M, Strand DA, Svobodová J, Vrlištad T, Petrušek A (2020). Simultaneous detection of native and invasive crayfish and <i>Aphanomyces astaci</i> from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. <i>Neobiota</i> 58: 1-32. https://doi.org/10.3897/neobiota.58.49358
<i>Procambarus clarkii</i> <i>Oreonectes limosus</i> <i>Pacifastacus leniusculus</i>	2017	France	F 5'-GGAGTTGGAACAGGATGGACT-3' R 5'-AATCTACAGATGCTCCCGCA-3' F 5'-CTCCTCTCTCGCTTCTGCAAT-3' R 5'-AACCCCTGCTAAATGCAACG-3' F 5'-TGAGCTGGTATAGCTGGAACT-3' R 5'-AGCATGTGCCGTGACTACAA-3'	5'-CCTCCTTAGCTCTGCTATTGCTC-3' 5'-CTCATGCAGGGCATCAGTGG-3' 5'-CGGGTTGAATTAGTCAAACCTGGAAC-3'	73 bp 78 bp 114 bp	COI	Centrifugation	Mauvisseau Q, Coignet A, Delaunay C, Pinet F, Bouchon D, Souty-Grosset C (2017). Environmental DNA as an efficient tool for detecting invasive crayfishes in freshwater ponds. <i>Hydrobiologia</i> . https://link.springer.com/article/10.1007/s10750-017-3288-y

Invasion and distribution of the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Martinique

Thomas Baudry^{1,2,3,4,*}, Thomas Becking³, Jean-Pierre Goût¹, Alexandre Arqué², Han Ming Gan⁵, Chris M. Austin⁵, Carine Delaunay³, Juliette Smith-Ravin⁴, Jonathan A.C. Roques⁶ and Frédéric Grandjean³

¹ DEAL Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement Route de la Pointe de Jaham - BP7212, Schœlcher 97274, Martinique

² ODE Office De l'Eau, 7 Avenue Condorcet, Fort-de-France, Martinique

³ Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, 5 rue Albert Turpin, Poitiers Cedex, France

⁴ Groupe BIOSPHERES, Université des Antilles, Campus de Schoelcher, Schoelcher 97200, Martinique

⁵ Centre for Integrative Ecology, School of Life and Environmental Sciences, Deakin University, Geelong, Victoria 3220, Australia

⁶ Department of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg, PO Box 463, SE-405 31, Sweden

Received: 2 October 2020 / Accepted: 30 November 2020

Abstract – The redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, was introduced to Martinique Island for aquaculture purposes in 2004, in an attempt to revitalize the freshwater crustacean aquaculture sector. In 2015, three wild populations were discovered during an electrofishing survey on fish diversity. In 2018, a specific crayfish survey was performed at night using spotlighting and baited traps at 34 sites throughout the island. The species was mostly found in the center and northern part of the island, specifically, a total of 105 specimens were captured in eight streams and five closed water bodies. We sequenced a 491 base-pair fragment of the COI gene to understand the invasion history and pathway from the presumed source population at the Mangatal hatchery. Among the eight haplotypes found, three were dominant, of which, two occurred in the Mangatal hatchery. As crayfish are sold alive, there is a high risk of further human-mediated introductions across the island hydrographic basins. Thus, the distribution of this species could rapidly expand throughout Martinique freshwater ecosystems, with ecological impacts on native communities yet to be determined and requiring urgent investigation.

Keywords: Biodiversity hotspot / COI / freshwater / invasive species / parastacidae / wild detection

Résumé – L'écrevisse à pinces rouges, *Cherax quadricarinatus*, a été introduite en Martinique à des fins aquacoles en 2004, dans le but de revitaliser le secteur de l'aquaculture des crustacés d'eau douce. En 2015, trois populations sauvages ont été découvertes lors d'une étude sur la diversité des poissons par pêche électrique. En 2018, une étude spécifique sur les écrevisses a été réalisée de nuit à l'aide de lampes torche et de pièges appâtés sur 34 sites de l'île. L'espèce a été trouvée principalement dans le centre et le nord de l'île, plus précisément, un total de 105 spécimens a été capturés dans huit cours d'eau et cinq plans d'eau. Nous avons séquencé un fragment de 491 paires de bases du gène COI afin de comprendre l'histoire et le cheminement de l'invasion à partir de la population source présumée de l'écloserie Mangatal. Parmi les huit haplotypes trouvés, trois étaient dominants, dont deux dans l'écloserie de Mangatal. Comme les écrevisses sont vendues vivantes, il existe un risque élevé de nouvelles introductions d'origine humaine dans les bassins hydrographiques de l'île. Ainsi, la distribution de cette espèce pourrait rapidement s'étendre à l'ensemble des écosystèmes d'eau douce de la Martinique, avec des impacts écologiques sur les communautés indigènes qui restent à déterminer et qui nécessitent une investigation urgente.

Mots-clés : Hotspot de biodiversité / COI / eau douce / espèces envahissantes / parastacidae / détection sauvage

*Corresponding author: thmsbaudry@gmail.com

1 Introduction

The introduction of non-indigenous species outside of their native environmental ranges constitutes a major threat to biological diversity, with significant negative impacts on their native counterparts and their ecosystems (Seebens *et al.*, 2017). Exotic or alien species are found worldwide and among all the branches of the tree of life (Seebens *et al.*, 2017; Blackburn *et al.*, 2019). Among these species, the ones with the highest economic value are widely represented (Mcquaid and Arenas, 2009). The redclaw crayfish, also known as the tropical blue crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868), is a striking example. Native to northern Australia and southern New Guinea (Austin, 1996; Bláha *et al.*, 2016), *C. quadricarinatus* is popular for aquaculture and the aquarium trade because it readily breeds in captivity and grows fast in tropical climates (Jones, 1990; Patoka *et al.*, 2014; Azofeifa-Solano *et al.*, 2017). It has been deliberately translocated for aquaculture purposes or as an ornamental species to a number of countries, many with an equatorial or Mediterranean climate, including: Costa Rica (Azofeifa-Solano *et al.*, 2017), Czech Republic (Patoka *et al.*, 2015), Ecuador (Romero and Jimenez, 2002), Hungary (Weiperth *et al.*, 2018), Indonesia (Patoka *et al.*, 2018), Israel (Karpplus *et al.*, 1998; Snovsky and Galil, 2011), Kazakhstan (Uderbayev *et al.*, 2017), Malaysia (Naquiddin *et al.*, 2016), Mexico (Bortolini *et al.*, 2007), Russia (Vodovsky *et al.*, 2017), Singapore (Ahyong and Yeo, 2007), Slovenia (Jaklič and Vrezec, 2011), South Africa (de Moor, 2002; Nunes *et al.*, 2017), Taiwan (Hsieh *et al.*, 2016), Ukraine (Kotovska *et al.*, 2016), the United States of America (Morningstar *et al.*, 2020), Zambia (Lodge *et al.*, 2012) and Zimbabwe (Marufu *et al.*, 2018). Similar to the Louisiana red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Oficialdegui *et al.*, 2020), live importation of redclaw crayfish has allowed the species to colonize new and often natural aquatic environments either through accidental escapes from hatcheries or ponds, or through direct human-mediated introductions. Because of its broad tolerance regarding water quality, a high reproductive rate and dispersal capacity it has a high invasion potential (Karpplus *et al.*, 1998; de Moor, 2002; Tropea *et al.*, 2010), allowing the species to rapidly colonize entire river catchments.

Cherax quadricarinatus was first introduced to Martinique into aquaculture facilities in 2004 from Cuba, according to anecdotal information, in order to reinvigorate the aquaculture industry in the island, which was losing momentum as a result of ecotoxicological problems (in particular *Macrobrachium rosenbergii*). Also, according to anecdotal information, individuals were brought in one time and shared between farmers, but most of them have ceased crayfish farming because pesticide rate in their ponds exceeds limit for the sale of edible products. Because of its highly developed hydrographic networks and its tropical climate, Martinique possesses an optimal environment for this species. Since its introduction, and after escapes or intentional releases, this crayfish is now well established in three streams and one reservoir, according to observations from recent electrofishing campaigns conducted by government agencies, the Direction de l'Environnement de l'Aménagement et du Logement (DEAL Martinique) and the Office de l'Eau (ODE

Martinique), within the framework of the EU Water Framework Directive, aiming at enhancing our knowledge on freshwater biodiversity (2013/2015/2016) (DEAL Martinique and ODE Martinique, 2016). Even if fishing is prohibited by law in Martinican freshwater rivers (R02-2017-12-28-003), it is carried out illegally, but the pressure on *C. quadricarinatus*, although in high demand by local fishermen, is far too low to limit population growth and dispersal. According to fishermen, populations are now found in high densities and the presence of this invasive species may therefore be impacting on the environment and native freshwater communities.

The objectives of this study were: (1) to confirm the taxonomic status of the specimens caught during the surveys by Cytochrome c Oxidase subunit I (COI) barcoding, (2) to update the distribution map of *C. quadricarinatus* in Martinique through trapping and nocturnal surveys in rivers of the island and (3) to understand its invasion pathways through the Martinican territory.

2 Material and methods

2.1 Study area

Martinique is a French volcanic island of 1128 km² belonging to the Lesser Antilles, in the eastern Caribbean Sea (Fig. 1). The region is subject to a tropical climate with two main seasons: the “Carême” and the “Hivernage” and two inter-seasons. The “Carême” corresponds to the dry season, from February to April, with sunny and not very rainy weather with maximum temperatures around 30 °C. The “Hivernage”, lasting from July to November, is the rainy season, with the occurrence of storms or hurricanes. Temperature can reach up to 32 °C and annual precipitation range from 970 mm in the south, more gentle part of the island, to 6000 mm in the mountainous, more tropical northern part of the island (DEAL Martinique *et al.*, 2018).

The Martinican hydrographic network is well developed due to the high rainfall and includes 70 catalogued major streams, fed by numerous small tributaries, both permanent and semi-permanent (Fig. 1) (DEAL Martinique *et al.*, 2018). This provides Martinique with rich terrestrial and inland aquatic ecosystems, with a great diversity of fauna and flora, giving it a high rate of endemism within the West Indies (DEAL Martinique *et al.*, 2018).

2.2 Field surveys

A total of 34 sites were surveyed between the 2nd of March and the 20th of May 2018 (during the Carême and the inter-season), including 20 rivers or streams and five closed water bodies (non-functional hatchery, ornamental ponds or water retention pond) throughout Martinique (Fig. 1). Four sites were sampled in the Lezarde River, the largest river in Martinique. The sampled sites were targeted according to the morphology of the stream (mean depth >20 cm for traps) and on the advice from local fishermen. We also included the four sites where *C. quadricarinatus* had been previously detected: Oman, Manzo, Petit Galion, Lezarde Site 2 (Tab. 1).

Sampling was done using four large baited-traps (80 cm length × 25 cm width × 25 cm height, with mesh of 1 cm × 1 cm

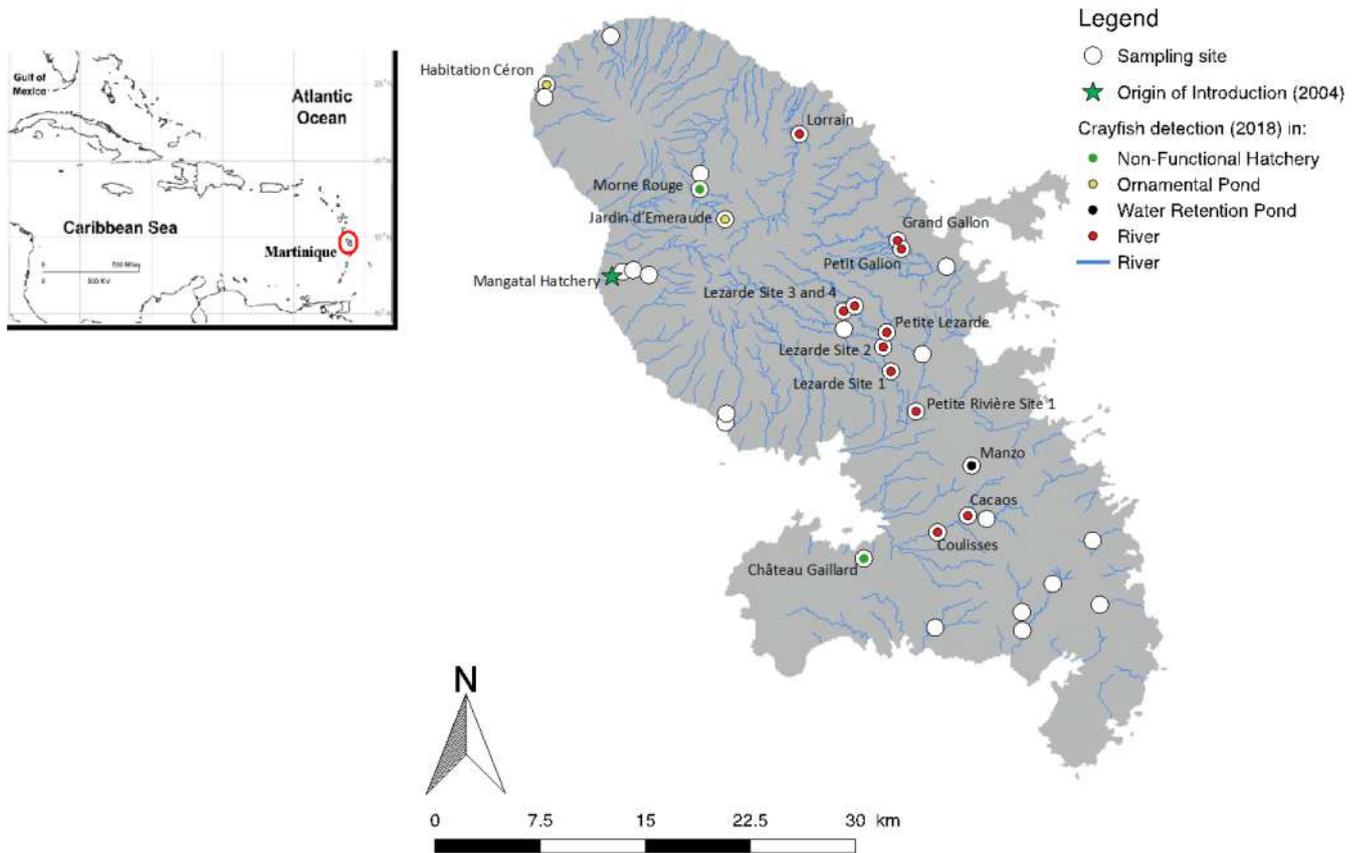


Fig. 1. Cartography of the sampling sites of *Cherax quadricarinatus* together with the presence sites of this species in Martinique Island during 2018 field campaign. Sampling was carried out on permanent streams and in closed water bodies. Cartography was prepared using QGIS 2.18 (Las Palmas) software (QGIS Development Team 2016). The shape of Martinique Island was imported from the database IGN and the streams were found in BD Carthage and BD Topo.

and a single cone-shaped inlet) baited with cassava. Each site was searched by spotlight after nightfall, for 20 min, on a transect of 100 m along the bank. After that, the traps were placed on stream beds or water holes (around 10 m from each other) and collected the next morning. Two trapping sessions were conducted at each site on two successive days. The site was considered as positive if at least one crayfish was caught during one of the two capture sessions or if crayfish were observed using spotlighting surveys at night.

Upon capture, individual crayfish were sexed, and total length was measured from the rostrum to the telson (to the closest 0.1 cm). One walking leg was collected from each captured individual and subsequently stored in 90% ethanol, in order to perform further analysis (DNA extraction, PCR and COI sequencing) to confirm the taxonomic status of crayfish in Martinique. The collected individuals were euthanised and not returned to the streams according to French law on invasive species (law n° 2016–1087 of August 8, 2016).

2.3 Samples collection and DNA extraction

A total of 105 individuals were analysed: 84 caught in the wild and 21 individuals were bought at the Mangatal Hatchery (Tab. 2). DNA extraction was performed from a fragment of

leg muscle tissue using the Qiagen DNeasy[®] Blood & Tissue Kit protocol. The tissue was first dried, put in 180 μ L ATL buffer and crushed with a sterile pestle. Twenty μ L proteinase K was added to each tube and samples were then vortexed for 15 s before incubation at 56 °C until total lysis of tissue. Each sample was filled with 200 μ L AL buffer and 200 μ L of 100% EtOH. Samples were vortexed thoroughly, pipetted into a DNeasy Mini spin column and centrifuged at 6000 g for 1 min. Two washing steps were done on the column with AW1 and AW2 buffers. Finally, DNA was eluted by adding 200 μ L Buffer AE and stored at –20 °C until further analysis. The DNA concentration was measured by Nanodrop[®] ND 100 spectrometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA).

2.4 COI mtDNA analysis

A fragment of COI gene was amplified by PCR using the “universal” primers for invertebrates (LCO1490 and HCO2198) previously designed by Folmer *et al.* (1994). For each individual, PCR was performed following the protocol in Chucholl *et al.* (2015): 2.5 min at 95 °C for the initial denaturing step, followed by 35 cycles of 45 s at 95 °C; 1 min at 48 °C and 1 min at 72 °C. The final elongation step was 10 min at 72 °C. Amplified products were purified and 1/10 diluted

Table 1. Summary of the 34 sites surveyed during the study, including 20 rivers (29 sites) and 5 closed water bodies (non-functional hatchery, ornamental ponds or water retention pond).

Site	GPS coordinates	Detection year	Type of habitat	First capture effort	Second capture effort	Sex-ratio (F:M)	Size range (cm)
Oman	14°29'9"N; 60°57'42"O	2014	Stream	0	0	–	–
Manzo	14°35'41"N; 60°56'20"O	2015, 2018	Water retention pond	9	9	10:8	4.9–18.4
Petit Galion	14°43'59"N; 60°59'43"O	2015, 2018	Stream	3	2	5:0	5.5–11.8
Lezarde Site 1	14°38'54"N; 60°59'24"O	2018		12	17	11:18	6.5–22.1
Lezarde Site 2	14°39'58"N; 60°59'45"O	2015, 2018		4	0	2:2	9.9–18.1
Lezarde Site 3	14°41'32"N; 61°0'57"O	2018	Stream	5	3	4:4	5.9–15.2
Lezarde Site 4	14°41'32"N; 61°0'55"O	2018		3	2	3:2	6.5–15.1
Lorrain	14°48'9"N; 61°3'3"O	2018	Stream	2	0	0:2	8.9–9.6
Coulisses	14°32'51"N; 60°57'36"O	2018	Stream	2	1	2:1	8.9–15.9
Petite Rivière Site 1	14°37'12"N; 60°58'28"O	2018		5	7	6:6	4.9–14.2
Petite Rivière Site 2	14°39'47"N; 60°58'8"O	–	Stream	0	0	–	–
Grand Galion	14°43'54"N; 60°59'4"O	2018	Stream	8	5	6:7	4.9–11.9
Petite Lezarde	14°40'11"N; 61°0'1"O	2018	Stream	3	0	2:1	8.3–13.1
Château Gaillard	14°31'50"N; 61°0'28"O	2018	Non-functional hatchery	0*	0	–	–
Jardin Emeraude	14°44'58"N; 61°6'7"O	2018	Ornamental pond	0*	0	–	–
Habitation Ceron	14°49'52"N; 61°13'21"O	2018	Ornamental pond	1	0	0:1	10.6
Morne Rouge	14°46'2"N; 61°7'0"O	2018	Non-functional hatchery	0*	0	–	–
Cacaos	14°33'29"N; 60°56'24"O	2018	Stream	6	2	5:3	5.6–13.9
Ceron	14°50'19"N; 61°13'29"O	–	Stream	0	0	–	–
Grand Rivière	14°52'30"N; 61°8'52"O	–	Stream	0	0	–	–
Capot	14°46'41"N; 61°7'0"O	–	Stream	0	0	–	–
Carbet Site 1	14°42'54"N; 61°10'7"O	–		0	0	–	–
Carbet Site 2	14°43'1"N; 61°9'41"O	–		0	0	–	–
Carbet Site 3	14°42'48"N; 61°9'4"O	–	Stream	0	0	–	–
Galion	14°43'7"N; 60°57'15"O	–	Stream	0	0	–	–
Blanche	14°40'42"N; 61°1'19"O	–	Stream	0	0	–	–
Case Navire Site 1	14°37'9"N; 61°6'1"O	–		0	0	–	–
Case Navire Site 2	14°37'17"N; 61°6'5"O	–	Stream	0	0	–	–
Roussane	14°33'34"N; 60°56'4"O	–	Stream	0	0	–	–
Vauclin	14°32'30"N; 50°61'12"O	–	Stream	0	0	–	–
Massel	14°30'8"N; 60°50'4"O	–	Stream	0	0	–	–
Rivière Pilote Site 1	14°29'0"N; 60°54'13"O	–		0	0	–	–
Rivière Pilote Site 2	14°29'46"N; 60°54'18"O	–	Stream	0	0	–	–
Rivière Pilote Site 3	14°31'0"N; 60°52'55"O	–		0	0	–	–

GPS coordinates and detection year were added. For each site, the number of *Cherax quadricarinatus* caught was noted after the first and second capture effort. Individuals were sexed and measured. (–) indicates no value because of no capture of red claw crayfish.

*A visual observation of crayfish with no capture.

before sequencing on an ABI PRISM 3130xl automated sequencer (PE Applied BioSystems, Foster City, USA). Both forward and reverse primers were used for sequencing, and the resulting sequenced fragments were aligned and edited using Sequencher® (version 5.4, 2016) formatted with the reference insertion of Mendeley. The taxonomic assignment was assessed with BLASTn 2.10.1 (Madden, 2002) comparing COI sequences to the non-redundant database of NCBI (Version August 2020). A multiple alignment was performed with ClustalW implemented in BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999). This was then trimmed with GBLOCKS version 0.91b (Talavera and Castresana, 2007) to remove ambiguously aligned regions, and to maximize the resulting alignment length, we used the less stringent options to obtain a 491 nucleotides alignment length. All the newly generated sequences were deposited on NCBI GenBank under the accession numbers MW300737 to MW300837. We also

added available sequences from GenBank comprising one sequence from Australia (DQ006294.1), one from Malaysia (NC_022937.1) and four from Indonesia (KX377345.1 to KX377348.1). A haplotype network was constructed based on the polymorphic sites of the trimmed COI sequences using the Median-Joining method implemented in PopART software version 1.7 (Leigh and Bryant, 2015) and genetic distance among haplotype and nucleotide diversity were also calculated with the same software.

3 Results

3.1 Taxonomic status

All crayfish sampled in Martinique belonged to the species *C. quadricarinatus* with a percentage of identity of COI

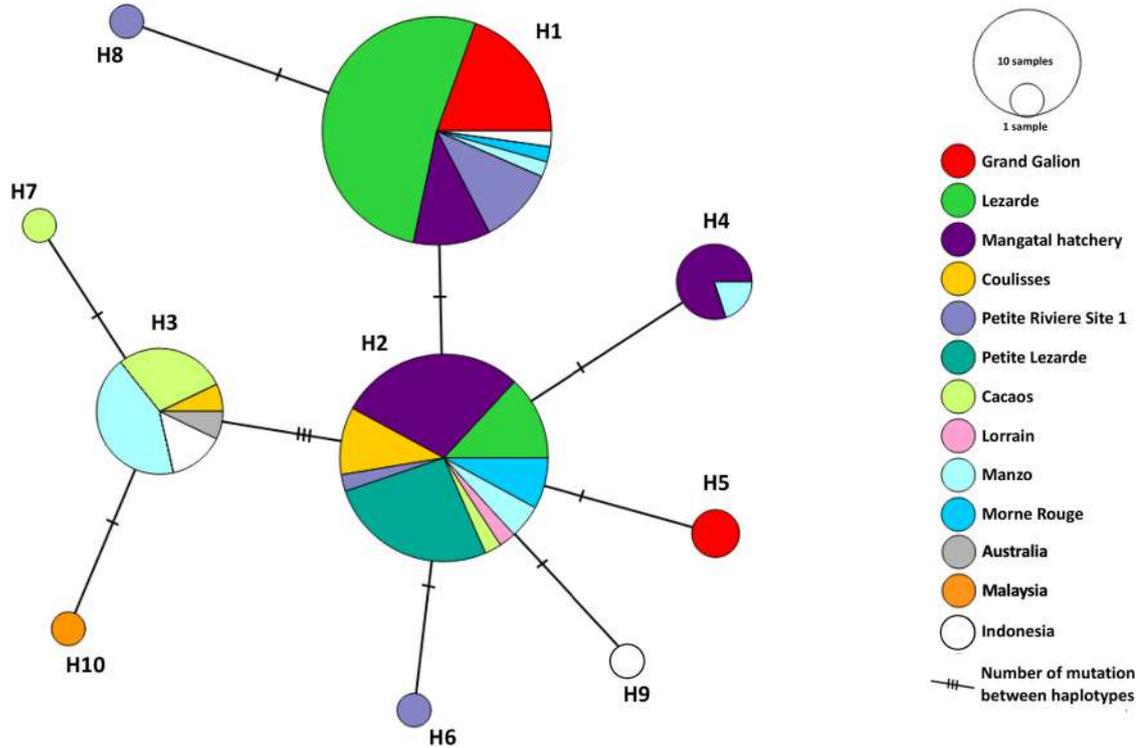


Fig. 2. A haplotype network using COI sequences (491 nucleotides length) of *Cherax quadricarinatus* collected in Martinique. A haplotype network inferred by a Median-Joining method, using 111 COI sequences of *C. quadricarinatus* populations from 10 different locations in Martinique (105 individuals), from Indonesia (four individuals), from Australia (one individual) and from Malaysia (one individual). The size of each circle represents the frequencies of the haplotype, with each colour showing the geographical origin of the isolates. Hatch marks indicate the numbers of mutations between haplotypes.

sequences of 98.98 ± 0.34 with *C. quadricarinatus* sampled in Malaysia (Accession number: KF649850.1) (Tan *et al.*, 2015), $99.19\% \pm 0.34$ with those from Indonesia (Accession number: KX377345.1) (Patoka *et al.*, 2016) and $99.63\% \pm 0.35$ with those from Australia (Accession number: DQ006294.1) (Shull *et al.*, 2005).

3.2 Distribution of *cherax quadricarinatus*

Among the 34 sites surveyed, crayfish were detected at 16 sites including eight streams and five closed water bodies, with *C. quadricarinatus* being recorded at ten new sites (six streams: Lorrain, Coulisses, Petite Riviere Site 1, Grand Galion, Petite Lezarde and Cacaos, and four closed water bodies: Chateau Gaillard, Jardin Emeraude, Habitation Ceron and Morne Rouge) (Tab. 1). All sites in the Lezarde river harboured crayfish over a distance of 15 km from upstream to downstream. In total, in the wild, 111 individuals were captured (56 females and 55 males) with highest numbers at Site 1 of the Lezarde river (29) (the most downstream) (Tab. 1; Fig. 1). Total lengths of crayfish ranged from 4.9 cm (Manzo and Grand Galion) to 22.1 cm (Lezarde Site 1) (Tab. 1). No crayfish were caught or observed in the Oman river where specimens had been previously detected in 2014 (Tab. 1), or in the Carbet flowing only 10 meters from the hatchery's ponds (Fig. 1).

3.3 Geographic distribution of the haplotypes

A total of eight haplotypes were found in Martinique (H1–H8). The first (H1) included the majority of individuals (45), consisting of individuals from Lezarde river (24), Grand Galion (9), Mangatal hatchery (5), Petite Riviere Site 1 (5), Manzo (1) and Morne Rouge (1) and was identical to one of the haplotypes from Indonesia. The second major haplotype (H2) included 39 individuals from the Mangatal hatchery (12), Petite Lezarde (10), Lezarde river (5), Coulisses (4), Morne Rouge (3), Manzo (2), Cacaos (1), Petite Riviere Site 1 (1) and Lorrain (1). The H3 haplotype was represented by individuals from Manzo (6), Cacaos (4) and Coulisses (1) and was identical to reference haplotypes from Indonesia and Australia. The H4 haplotype contained individuals from Mangatal hatchery (4) and from Manzo (1). The H5 haplotype was only found in two individuals from Grand Galion. The H6, H7 and H8 haplotypes were rare, being represented by one individual each from Petite Riviere Site 1, Cacaos and Petite Riviere Site 1, respectively. Only three haplotypes (H1, H2 and H4) were found among the 21 crayfish sampled from the Mangatal hatchery. Haplotypes H9 and H10 contained one individual each, from the reference haplotypes from Indonesia and Malaysia (Figs. 2 and 3; Tab. 2). The mean nucleotide diversity among all haplotypes was 0.0014.

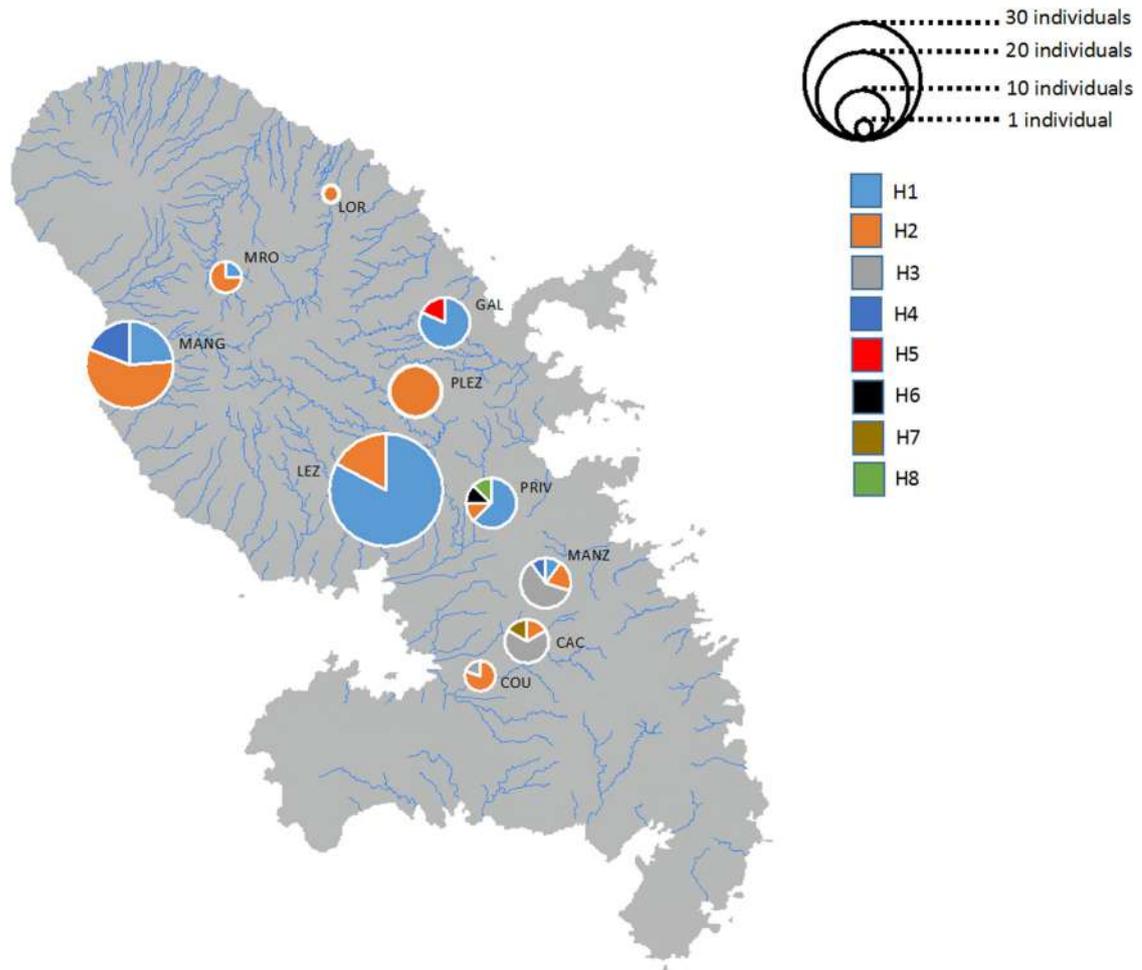


Fig. 3. Haplotype frequencies of *Cherax quadricarinatus* from 105 individuals sequenced in the 10 different locations in Martinique. Using data from Table 2 and Figure 2, diagrams are built, proportionally to the number of sequenced individuals, and each haplotype (H1–H8) was differentiated by one colour. Site names are encoded as follow: Lorrain (LOR), Morne Rouge (MRO), Mangatal (MANG), GAL (Grand Galion), Lezarde (LEZ), Petite Lezarde (PLEZ), Petite Riviere (PRIV), Manzo (MANZ), Cacaos (CAC) and Coulisses (COU).

Table 2. Inventory of the 111 red claw crayfish COI sequences used to carry out the haplotype network analysis.

Populations	Haplotypes (Number of individuals)										Total number of individuals
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	
Mangatal	5	12	0	4	0	0	0	0	0	0	21
Grand Galion	9	0	0	0	2	0	0	0	0	0	11
Lezarde	24	5	0	0	0	0	0	0	0	0	29
Coulisses	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	5
Petite Riviere Site 1	5	1	0	0	0	1	0	1	0	0	8
Petite Lezarde	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Cacaos	0	1	4	0	0	0	1	0	0	0	6
Lorrain	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Manzo	1	2	6	1	0	0	0	0	0	0	10
Morne Rouge	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Indonesia	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	4
Australia	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Malaysia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	46	41	12	5	2	1	1	1	1	1	

105 of them are from individuals collected in Martinique, with various number of sequences per population, four from Indonesia, one from Australia, one from Malaysia.

4 Discussion

Our results showed that the redclaw crayfish is now well established in the Martinican hydrographical networks, with 16 populations identified since its first introduction in 2004. The situation is alarming because 10 new populations were discovered since the previous survey in 2015. This number is probably an underestimation of the real situation for several reasons: (i) not all streams have yet been surveyed, (ii) capture efficiency of crayfish by traps depends on population size (Harper *et al.*, 2018) and activity of crayfish, which can be dependent on meteorological and hydrological conditions and lunar cycles at the time of trapping (Grandjean *et al.*, 2000).

Our results also showed that this crayfish, once introduced, can quickly colonize an entire watershed, as revealed in the Lezarde watercourse where the crayfish were sampled at four sites along 15 km of the river. This result confirms the high dispersal capabilities of this species as also reported by Nunes *et al.* (2017) with an average dispersal rate of 6.6 km/year. Surprisingly, the redclaw crayfish was not caught in three sites of the Carbet River adjacent to the Mangatal hatchery's ponds. This can be explained by the fact that this river has a torrential flow which would not favour the persistence of *C. quadricarinatus* which are found mainly in lentic or more stable and slowly flowing lotic systems (Jones, 1990).

The number of individuals caught varied among sites and ranged from 0 to 29 suggesting some populations may be present at high density, for example in the Lezarde. This is not really surprising, because *C. quadricarinatus* is found in Martinique freshwater ecosystems favourable for its development, suggesting a general absence of both competing species and large predators (Lim *et al.*, 2002). The physical parameters measured in this study revealed a temperature range from 25.4 to 28.8 °C with oxygen concentrations from 2.77 to 8.06 mg/L and pH from 6.78 to 7.49 in the sites where crayfish were present (Supp. Data 1). These ranges are in accordance with the ecological preferences of *C. quadricarinatus* (Karplus *et al.*, 1998; de Moor, 2002; Tropea *et al.*, 2010). In these conditions, females could reach sexual maturity within four months and generate up to five broods per year (de Moor, 2002; Bortolini *et al.*, 2007; Tropea *et al.*, 2010; Arzola-Gonzalez *et al.*, 2012; Mangatal, local farmer, *pers. com.*) which could explain their rapid expansion and their high density in the Lezarde river. These ecological conditions found in the rivers of Martinique seem to be excellent for the growth of this crayfish confirming by the size of trapped crayfish, up to 22 cm in total length (and 214 g) for the largest one in Lezarde river. These appear to be larger than those caught in Costa Rica, with a maximum total length of 9.22 cm (Azofeifa-Solano *et al.*, 2017). As a result, this crayfish represents one of the biggest species present in these fresh waters, able to capture and consume large prey species and having significant ecological impacts due to their broad dietary preferences and population densities.

The introduction of *C. quadricarinatus* to Martinique remains poorly documented. According to the popular opinion, however, the red claw crayfish was introduced in 2004 from Cuba when a few specimens (around 20) were brought by the owner of the major crustacean hatchery on the island (Mangatal *pers. com.*). Results from COI sequencing from

21 individuals sampled from the Mangatal hatchery revealed three haplotypes (H1, H2 and H4) of which H1 and H2 haplotypes were represented in most of the sites where crayfish were trapped. This is therefore consistent with the Mangatal stock being the principal origin of most of the populations established in the wild in Martinique and it is not surprising because the crayfish are sold alive as a food item. They are valued as food by local people and sold at a high price (24 euros/kilo), this increases the likelihood of their introduction and eventual establishment into local ponds and watercourses enhancing the availability of this species. Two additional haplotypes were recorded in three geographically closed populations (Manzo, Coulisses, Cacaos), with at least three mutations, that were not present in the Mangatal pool. As the initial stock came from 20 individuals including both males and females, it would seem unlikely the 8 haplotypes came from this original stock. So, we cannot exclude other independent introductions of this crayfish from older farming activities. Redclaw crayfish was previously sold (before the prohibition by the law on Exotic Species (JORF n°0229 of 19th september 2020 Text n° 3)) in pet shops in Martinique until 2019. Being highly regarded by aquarists, as it often exhibits a strong blue color in aquaria, it could have been bought from local pet shops or imported and released in the wild on a number of occasions. High level of genetic variability has been also recorded for other translocated species in Europe such as *Procambarus clarkii* (Officialdegui *et al.*, 2019) and *Pacifastacus leniusculus* (Petrušek *et al.*, 2017), potentially also reflecting multiple introductions.

Although no documented impacts have been reported on the ecosystem in Martinique, invasive crayfish are known to have profound impacts on freshwater communities (plants and animals) due to their opportunistic, omnivorous and predatory nature. This can affect the trophic chain at all levels, by competing with autochthonous species or preying on them and perturbing the entire ecosystem functioning (Loureiro *et al.*, 2015; Jackson *et al.*, 2017; Lang *et al.*, 2020). For example, several studies have shown that *P. clarkii* (Jackson *et al.*, 2014; Loureiro *et al.*, 2015; Lang *et al.*, 2020), *P. leniusculus* (Jackson *et al.*, 2014; Vaeßen and Hollert, 2015) and *Faxonius virilis* (formerly *Orconectes virilis*) (Jackson *et al.*, 2014) can cause strong decreases in species richness of insect larvae and mollusks through predation after their introductions to a new location. Studies also suggest a decrease in the abundance and diversity of aquatic plants and animals is directly related to crayfish density (Gherardi and Acquistapace, 2007; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015). Thus the presence of *C. quadricarinatus* could be having a significant impact on Martinique freshwater biodiversity especially where this crayfish reaches high levels of abundance such as in the Lezarde river. The rapid establishment and dispersal of this crayfish may have been facilitated by the limited number of natural crayfish predators in freshwater ecosystems in Martinique. So far, the only known effective native predators found in Martinique freshwaters seem to be eels, commonly used in biological control of crayfish in Europe (Aquiloni *et al.*, 2010). Only *Anguilla rostrata* occurs in Martinique (Lim *et al.*, 2002), but this species is now placed on the red list of species and by the IUCN as an endangered species. Because of their declining population, eels are unlikely to be able to reduce the crayfish densities and dispersal in Martinique.

Using traditional sampling methods, the current situation shows a spread of *C. quadricarinatus* throughout the Martinican water systems. The use of the environmental DNA (eDNA) technique in further studies could provide a more accurate measure of the distribution of *C. quadricarinatus* in Martinique streams. Recently, eDNA has been used to detect crayfish species, both endangered and invasive (Dougherty *et al.*, 2016; Agersnap *et al.*, 2017). This technique is becoming a very effective tool in the early detection of invasive species or in monitoring communities with greater efficiency than direct methods such as trapping or visual observation (Biggs *et al.*, 2015; Hänfling *et al.*, 2016).

In the global context of preservation of biodiversity, it seems urgent to develop strategies to prevent establishment of further new populations and investigating the impact of redclaw crayfish on the natural environment and native freshwater communities.

Acknowledgements. We thank the Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Martinique and the Office de l'Eau de Martinique for their financial support and the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Poitiers for the provision of all the equipment necessary to carry out the study.

Supplementary Material

Supplementary data 1: Environmental parameters (Temperature, oxygen concentration and pH) measured at each site prospected during baited-trap survey, with Ponsel Mesure Odeon field tool.

The Supplementary Material is available at <https://www.kmae-journal.org/10.1051/kmae/2020041/olm>.

References

Agersnap S, Larsen WB, Knudsen SW, Strand D, Thomsen PF, Hesselsoe M, Mortensen PB, Vrålstad T, Møller PR. 2017. Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS ONE* 12: 1–22.

Ahyong ST, Yeo DCJ. 2007. Feral populations of the Australian Red-Claw crayfish (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in water supply catchments of Singapore. *Biol Invasions* 9: 943–946.

Aquiloni L, Brusconi S, Cecchinelli E, Tricarico E, Mazza G, Paglianti A, Gherardi F. 2010. Biological control of invasive populations of crayfish: the European eel (*Anguilla anguilla*) as a predator of *Procambarus clarkii*. *Biol Invasions* 12: 3817–3824.

Arzola-Gonzalez JF, Maya de la Cruz E, Verde Osuna LI, Burgueño García E, Miguel L, Campaña Flores LM, Rubio Gutiérrez Y. 2012. Crecimiento, densidad y rentabilidad del cultivo de langosta de agua dulce (Decapoda: *Cherax quadricarinatus*) en Sinaloa, Mexico. *Ra Ximhai* 8: 17–26.

Austin CM. 1996. An electrophoretic and morphological taxonomic study of the freshwater crayfish genus *Cherax* (Decapoda: Parastacidae) in Northern and Eastern Australia. *Aust J Zool* 44: 259–296.

Azofeifa-Solano JC, Naranjo-Elizondo B, Rojas-Carranza AH, Cedeño-Fonseca M. 2017. Presence of the Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Parastacidae, Astacoidea) in a freshwater system in the Caribbean drainage of Costa Rica. *BioInvasions Rec* 6: 351–355.

Biggs J, Ewald N, Valentini A, Gaboriaud C, Dejean T, Griffiths RA, Foster J, Wilkinson JW, Arnell A, Brotherton P, Williams P, Dunn F. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biol Conserv* 183: 19–28.

Blackburn TM, Bellard C, Ricciardi A. 2019. Alien versus native species as drivers of recent extinctions. *Front Ecol Environ* 17: 203–207.

Bláha M, Patoka J, Kozak P, Kouba A. 2016. Unrecognized diversity in New Guinean crayfish species (Decapoda, Parastacidae): the evidence from molecular data. *Integr Zool* 11: 457–468.

Bortolini L, Alvarez F, Rodriguez-Almaraz G. 2007. On the presence of the Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Mexico. *Biol Invasions* 9: 615–620.

Chucholl C, Mrugała A, Petrussek A. 2015. First record of an introduced population of the southern lineage of white-clawed crayfish (*Austropotamobius italicus*) north of the Alps. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 416: 1–8.

de Moor I. 2002. Potential impacts of alien freshwater crayfish in South Africa. *Afr J Aquat Sci* 27: 125–139.

DEAL Martinique, ECOVIA, CREOCEAN. 2018. Diagnostic – Profil Environnemental de la Martinique. 139p.

DEAL Martinique, ODE Martinique. 2016. Réalisation de pêches électriques – Caractérisation de la franchissabilité de 9 ouvrages hydrauliques et Caractérisation des stations de surveillance au titre de la Directive Cadre sur l'Eau Synthèse des 3 années de suivi 41p.

Dougherty MM, Larson ER, Renshaw MA, Gantz CA, Egan SP, Erickson DM, Lodge DM. 2016. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *J Appl Ecol* 53: 722–732.

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 Marine Biol Biotechnol* 3: 294–299.

Gherardi F, Acquistapace P. 2007. Invasive crayfish in Europe: the impact of *Procambarus clarkii* on the littoral community of a Mediterranean lake. *Freshw Biol* 52: 1249–1259.

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). *Bull Fr Pêche Piscic* 356: 55–70.

Hall TA. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.

Hänfling B, Handley LL, Read DS, Hahn C, Li J, Nichols P, Blackman RC, Oliver A, Winfield IJ. 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Mol Ecol* 25: 3101–3119.

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). *Manag Biol Invasions* 9: 137–148.

- Hsieh C, Huang C, Pan Y. 2016. Crayfish plague *Aphanomyces astaci* detected in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* in Taiwan. *J Invertebr Pathol* 136: 117–123.
- Jackson MC, Evangelista C, Zhao T, Lecerf A, Britton JR, Cucherousset J. 2017. Between-lake variation in the trophic ecology of an invasive crayfish. *Freshw Biol* 62: 1501–1510.
- Jackson MC, 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. *Freshw Biol* 59: 1123–1135.
- Jaklič M, Vrezec A. 2011. The first tropical alien crayfish species in European waters: the redclaw *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana* 84: 651–665.
- Jones C. 1990. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Source OAL. 122 p.
- Karplus I, Zoran M, Milstein A, Harpaz S, Eran Y, Joseph D, Sagi A. 1998. Culture of the Australian red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus* in Israel: III. Survival in earthen ponds under ambient winter temperatures. *Aquaculture* 166: 259–267.
- Kotovska G, Khrystenko D, Patoka J, Kouba A. 2016. East European crayfish stocks at risk: arrival of non-indigenous crayfish species. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 417: 37.
- Lang I, Evangelista C, Everts RM, Loot G, Cucherousset J. 2020. Stable resource polymorphism along the benthic littoral–pelagic axis in an invasive crayfish. *Ecol Evol* 10: 2650–2660.
- Leigh JW, Bryant D. 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6: 1110–1116.
- Lim P, Meunier FJ, Keith PA, Noël PY. 2002. Atlas des poissons et des crustacés d'eau douce de la Martinique. *Collection patrimoines naturels*.
- Lodge DM, Deines A, Gherardi F, Yeo DCJ, Arcella T, Baldrige AK, Barnes MA, Chadderton WL, Feder JL, Gantz CA, Howard GW, Jerde CL, Peters BW, Peters JA, Sargent LW, Turner CR, Wittmann ME, Zeng Y. 2012. Global introductions of crayfishes: evaluating the impact of species invasions on ecosystem services. *Annu Rev Ecol Syst* 43: 449–472.
- Loureiro TG, Anastácio PSMG, Souty-Grosset C, Araujo PB, Almerão MP. 2015. Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion – an overview. *Nauplius* 23: 1–19.
- Madden T. 2002. Chapter 16: The BLAST sequence analysis tool. [Updated 2003 Aug 13]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>.
- Marufu L, Dalu T, Crispen P, Barson M, Simango R, Utete B, Nihwatiwa T. 2018. The diet of an invasive crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868), in Lake Kariba, inferred using stomach content and stable isotope analyses. *BioInvasions Rec* 7, 121–132.
- Mcquaid CD, Arenas F. 2009. Chapter 22-Biological invasions: insights from marine benthic communities. In: Wahl M (ed) *Marine Hard Bottom Communities*. Springer-Verlag, Berlin, p. 309–320.
- Morningstar CR, Daniel WM, Neilson ME, Yazaryan AK. 2020. The first occurrence of the Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) in the contiguous United States. *BioInvasions Rec* 9: 120–126.
- Naquiddin AS, Rahim KA, Long SM, Firdaus FF. 2016. The spread of the Australian redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus* von Martens, 1868) in Malaysia. *J Sustain Sci Manag* 11: 31–38.
- Nunes AL, Zengeya TA, Hoffman AC, Measey GJ, Weyl OLF. 2017. Distribution and establishment of the alien Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in South Africa and Swaziland. *PeerJ* 5: e3135.
- Oficialdegui FJ, Clavero M, Sánchez MI, Green AJ, Boyero L, Michot TC, Klose 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.
- Oficialdegui FJ, Sánchez MI, Clavero M. 2020. One century away from home: how the red swamp crayfish took over the world. *Rev Fish Biol Fish* 30: 121–135.
- 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.
- Patoka J, Kalous L, Kopecký O. 2015. Imports of ornamental crayfish: the first decade from the Czech Republic's perspective. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 416: 4.
- Patoka J, Wardiatno Y, Kurikova P, Petrtyl M, Kalous L. 2016. *Cherax quadricarinatus* (von Martens) has invaded Indonesian territory west of the Wallace Line: evidences from Java. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 417: 39.
- Patoka J, Wardiatno Y, Mashar A, Yonvitner, Wowor D, Jerikho R, Takdir M, Purnamasari L, Petrtyl M, Kalous L, Kouba A, Bláha M. 2018. Redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868), widespread throughout Indonesia. *BioInvasions Rec* 7: 185–189.
- Petrusek A, Filipová L, Kozubíková-Balcarová E, Grandjean F. 2017. High genetic variation of invasive signal crayfish in Europe reflects multiple introductions and secondary translocations. *Freshw Sci* 36: 838–850.
- Rodríguez-Pérez H, Hilaire S, Mesléard F. 2015. Temporary pond ecosystem functioning shifts mediated by the exotic red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*): a mesocosm study. *Hydrobiologia* 767: 333–345.
- Romero X, Jimenez J. 2002. Histopathological survey of diseases and pathogens present in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens), cultured in Ecuador. *J Fish Dis* 25: 653–667.
- Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke JM, Pagad S, Pyšek P, Winter M, Arianoutsou M, Bacher S, Blasius B, Brundu G, Capinha C, Celesti-Grappo L, Dawson W, Dullinger S, Fuentes N, Jäger H, Kartesz J, Kenis M, Kreft H, Kühn I, Lenzen B, Liebhold A, Mosena A, Moser D, Nishino M, Pearman D, Pergl J, Rabitsch W, Rojas-Sandoval J, Roques A, Rolke S, Rossinelli S, Roy HE, Scalera R, Schindler S, Štajerová K, Tokarska-Guzik B, Van Kleunen M, Walker K, Weigelt P, Yamanaka T, Essl F. 2017. No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nat Commun* 8: 1–9.
- Seqencher®. 2016. Version 5.4.6 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA.
- Shull HC, Pérez-Losada M, Blair D, Sewell K, Sinclair EA, Lawler S, Ponniah M, Crandall KA. 2005. Phylogeny and biogeography of the freshwater crayfish *Euastacus* (Decapoda: Parastacidae) based on nuclear and mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet Evol* 37: 249–263.
- Snovsky G, Galil BS. 2011. The Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Crustacea: Decapoda: Parastacidae) in the Sea of Galilee, Israel. *Aquat Invasions* 6: 35–37.
- Talavera G, Castresana J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol* 56: 564–577.
- Tan MH, Gan HM, Gan HY, Lee YP, Croft LJ, Schultz MB, Miller AD, Austin CM. 2015. First comprehensive multi-tissue transcriptome of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae)

- reveals unexpected diversity of endogenous cellulase. *Org Divers Evol* 16: 195–200.
- Tropea C, Piazza Y, López LS. 2010. Effect of long-term exposure to high temperature on survival, growth and reproductive parameters of the ‘redclaw’ crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 302: 49–56.
- Uderbayev T, Patoka J, Beisembayev R, Petrtýl M, Bláha M, Kouba A. 2017. Risk assessment of pet-traded decapod crustaceans in the Republic of Kazakhstan, the leading country in Central Asia. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 418: 30.
- Vaeßen S, Hollert H. 2015. Impacts of the North American signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) on European ecosystems. *Environ Sci Europe* 27: 1–6.
- Vodovsky N, Patoka J, Kouba A. 2017. Ecosystem of Caspian Sea threatened by pet-traded non-indigenous crayfish. *Biol Invasions* 19: 2207–2217.
- Weiperth A, Gál B, Kuřiková P, Langrová I, Kouba A, Patoka J. 2018. 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.

Cite this article as: Baudry T, Becking T, Goût J-P, 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. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.*, 421, 50.



Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot, an eDNA-based success story

Thomas Baudry^{a,b,c,d,*}, Quentin Mauvisseau^{e,f}, Jean-Pierre Goût^a, Alexandre Arqué^b, Carine Delaunay^c, Juliette Smith-Ravin^d, Michael Sweet^f, Frédéric Grandjean^c

^a Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, Route de la Pointe de Jaham - BP7212, Schoelcher 97274, Martinique, France

^b Office De l'Eau, 7 Avenue Condorcet, Fort-de-France, Martinique, France

^c Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, 5 rue Albert Turpin, Poitiers Cedex, France

^d Groupe BIOSPHERES, Université des Antilles, Campus de Schoelcher, Martinique, France

^e Natural History Museum, University of Oslo, Oslo, Norway

^f Aquatic Research Facility, Environmental Sustainability Research Centre, University of Derby, Derby DE22 1GB, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

Biodiversity hotspot
Cherax quadricarinatus
 Environmental DNA
 Freshwater
 Invasive species
 qPCR

ABSTRACT

The lesser Antilles archipelago in the Caribbean is known as a biodiversity hotspot, hosting many endemic species. However, recent introduction of a highly invasive species, the Australian redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*), has led to significant threats to this fragile ecosystem. Here we developed, validated, and optimized a species-specific eDNA-based detection protocol targeting the 16S region of the mitochondrial gene of *C. quadricarinatus*. Our aim was to assess the crayfish distribution across Martinique Island. Our developed assay was species-specific and showed high sensitivity in laboratory, mesocosm and field conditions. A significant and positive correlation was found between species biomass, detection probability and efficiency through mesocosm experiments. Moreover, we found eDNA persisted up to 23 days in tropical freshwaters. We investigated a total of 83 locations, spread over 53 rivers and two closed water basins using our novel eDNA assay and traditional trapping, the latter, undertaken to confirm the reliability of the molecular-based detection method. Overall, we detected *C. quadricarinatus* at 47 locations using eDNA and 28 using traditional trapping, all positive trapping sites were positive for eDNA. We found that eDNA-based monitoring was less time-consuming and less influenced by the crayfishes often patchy distributions, proving a more reliable tool for future large-scale surveys. The clear threat and worrying distribution of this invasive species is particularly alarming as the archipelago belongs to one of the 25 identified biodiversity hotspots on Earth.

1. Introduction

Introduction of invasive alien species in an environment often lead to an ecological disaster, caused by their significant negative impacts on indigenous communities and ecosystems (Dunn et al., 2017; Robinson et al., 2018). These effects are often worse in an island environment (Myers et al., 2000). Indeed, these areas are very sensitive due to their isolation, and any disturbance can have rapid and irreversible negative effects. Diffusion of invasive species often leads to a decrease in biodiversity, a result due to predation, food competition (Momot, 1995; Šidagytė et al., 2017) or spread of associated pathogens (Grandjean et al., 2017; Robinson et al., 2018). As an example, numerous crayfish species have been translocated in freshwater systems throughout the

world, mainly for aquaculture purpose or as a results of recreational aquarium activities (Souty-Grosset et al., 2006; Lodge et al., 2012). Often associated with an omnivore regime, these ecosystem engineer species have profound negative impacts on biodiversity where they are introduced and the ecosystems in general (Reynolds et al., 2013).

Among them, *Cherax quadricarinatus* also known as the 'Australian redclaw crayfish' or 'tropical blue' are showing an increasing trend, regarding geographical spread (Mendoza-Alfaro et al., 2011). Native from Australia and Papua New-Guinea, *C. quadricarinatus* was introduced in a number of tropical and subtropical regions for aquaculture purposes (Mendoza-Alfaro et al., 2011). Further this species is highly appreciated by aquarists due to its blue colour. Following escape from ponds or via direct human releases, *C. quadricarinatus* is now known to

* Corresponding author at: Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, University of Poitiers
 E-mail address: thmsbaudry@gmail.com (T. Baudry).

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107637>

Received 15 December 2020; Received in revised form 2 March 2021; Accepted 17 March 2021

1470-160X/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

quickly establish itself due to its ease of breeding, fast growth rates and high tolerance regarding water quality (Tropea et al., 2010). This is particularly worrying, as invasive crayfish are known to affect the trophic chain and modify their environment due to their opportunistic and omnivorous behaviour (Jackson et al., 2017; Lang et al., 2020). Indeed, Mendoza-Alfaro et al. (2011) highlighted a strong impact on local macroinvertebrates by direct predation after the introduction of *C. quadricarinatus* in Thailand. These effects are even more exacerbated on tropical islands, which are often regarded as biodiversity hotspots, hosting small and fragile native populations (Vitousek, 1988; Myers et al., 2000).

On Martinique Island, the freshwater shrimp species *Macrobrachium rosenbergii* was originally farmed in the North-Atlantic part of the island but a tense ecotoxicological context led to the closure of many aquaculture farms. The area suitable (non-contaminated) for the aquaculture was the North-Caribbean part, in smaller ponds, making the farming of *M. rosenbergii* unprofitable. As an alternative, *C. quadricarinatus* was imported from Cuba in 2004, aimed at reinvigorating aquaculture practices (Baudry et al., 2020). In 2015, the presence of this crayfish was observed in three rivers and one closed water system. In 2018, a larger survey, using baited-traps, confirmed the presence of 10 'new' populations (Baudry et al., 2020). However, these precedent surveys were relying on traditional monitoring methods such as electrofishing and baited-traps. Therefore, the species distribution was thought to be underestimated. Indeed, conventional methods for monitoring freshwater biodiversity often rely on electrofishing, gillnetting, snorkelling, trapping, or kick-sampling (Manfrin et al., 2019). These techniques require large sampling effort, therefore are time consuming, labour intensive, and expensive in addition to often being ecologically invasive (Hänfling et al., 2016; Harper et al., 2018; Robinson et al., 2018). As a result, traditional sampling methods have often been shown to lead to false negative detection of the monitored species, in particular when a species is present at relatively low density (Keller and Kumschick, 2017).

Effective management plans rely on the knowledge of species presence and the use of molecular-based detection has recently been shown as a reliable alternative for monitoring species in aquatic habitats (Rees et al., 2014). Environmental DNA detection (or eDNA), relies on the detection of DNA in pieces of skin, eggs, mucus left by organisms in their environments, without the need to physically observe the targeted species, at any stage of life (Ficetola et al., 2008; Thomsen and Wilferslev, 2015). eDNA-detection based techniques have been shown to be very effective, making them promising tools for the early detection of both invasive and/or rare, endangered endemic species (Hänfling et al., 2016; Harper et al., 2018). eDNA has now been used extensively, to track the presence of invasive crayfish for example; *Procambarus clarkii*, *Pacifastacus leniusculus* and *P. virginialis* (Tréguier et al., 2014; Harper et al., 2018; Mauvisseau et al., 2019b) and for endangered crayfish species such as *Austropotamobius pallipes* (Atkinson et al., 2019; Troth et al., 2020).

Here, we aimed to evaluate the potential of eDNA-based detection for mapping the distribution of *C. quadricarinatus* throughout the island of Martinique. We developed and validated a species-specific real-time quantitative PCR (qPCR) assay amplifying a 109 bp fragment of the 16S region of *C. quadricarinatus*. We further investigated its reliability and efficiency under controlled laboratory conditions and within mesocosms with variable biomass treatments. Finally, a large field survey (combining both eDNA detection and traditional monitoring assessment) was performed on a total of 83 locations across Martinique. We now present a precise distribution map of *C. quadricarinatus* presence and discuss its impacts on autochthonous species. This led to an optimised eDNA protocol being established for the detection of *C. quadricarinatus* in Martinique ecosystems. Finally, we assessed the efficiency of DNA-based detection as reliable monitoring tool compared to traditional methods and provide recommendations for future surveys.

2. Material and methods

2.1. Study area

Martinique is a French volcanic island of 1128 km² belonging to the Lesser Antilles, in the eastern Caribbean Sea/Atlantic Ocean. This area, identified as one of the 25 biodiversity hotspots, harbour a large number of endemic species (Anadón-Irizarry et al., 2012).

The Martinique hydrographic network is vast, and encompass 70 main rivers, fed by numerous tributaries, most of which are permanent (Martinique, 2018).

2.2. Sampling sites

In this study, we sampled a total of 83 locations spread over 53 rivers, one ornamental pond and one water retention dam, from September 2019 to December 2019. To allow an exhaustive validation of our assay, we sampled locations known to be positive, negative, or unknown for the presence of *C. quadricarinatus*. All sampled locations were further investigated using traditional crayfish trapping to compare the efficiency between eDNA-based detection and previously established methods. All locations were investigated twice: each time, cassava-baited traps were set at the end of the day and raised in the morning.

Filtration occurred on-site, after water collection from the river. A hand-operated vacuum pump (Nalgene™ Repairable Hand-Operated PVC Vacuum Pumps with Gauge) was utilised, together with a 1L-filtration unit (Nalgene™) (Lawson Handley et al., 2019) and nitrocellulose filters (Sartorius® 47 mm diameter and 0.45 µm size pore). Water samples were collected from the middle of the water body, along a transect originating from the margin outwards, using a decontaminated plastic bottle and non-powdered gloves (Coward et al., 2018). This was immediately poured in the funnel of the unit. Filtration occurred until the filter was clogged, and the volume filtered was recorded at each sampled location. The filter was then removed and placed (folded in quarters) into 1.5 mL tube using sterile forceps and preserved with 1 mL of absolute molecular-grade ethanol. Three natural replicates (i.e. independent eDNA water samples) were collected at each sampling location.

To avoid potential field cross-contamination, filtration units and sampling bottles were decontaminated using 50% bleach after each sampling site and thoroughly rinsed using tap water. Furthermore, 1000 mL of distilled water (blank control sample) was also filtered at each site, before conducting eDNA sampling in order to account for potential field contamination (following the protocol above). All samples were stored in a cooling bag until return to the laboratory and stored at -20 °C until DNA extraction.

2.3. Mesocosm

Controlled mesocosm experiments were conducted to: (i) assess a potential correlation between eDNA detection and quantification related to various abundance and biomass and (ii) determine eDNA persistence in water under controlled conditions.

Five treatments, consisting of: (A) 1.33 g/L of biomass (corresponding to one individual of 40 g in a 30 L aquarium); (B) 3.33 g/L of biomass (corresponding to two individuals of 50 g each in a 30 L aquarium); (C) 33.33 g/L of biomass (corresponding to 15 individuals of 1000 g of total biomass in a 30 L aquarium); (D) approximately 50 g/L of biomass (corresponding to one ton of crayfish biomass in a 20 m² tank) and (E) approximately 3.75 g/L of biomass (corresponding to three tons of crayfish biomass in a farming pond of 1000 m²). Water samples were collected and filtered as described above two days after crayfish introduction. For the three 30 L aquarium conditions, water temperature and pH were maintained at 27 °C and 7.5 respectively, corresponding to optimal values for *C. quadricarinatus* development (Tropea et al., 2010). This was modulated using a 12 h light/dark photoperiod. Each

treatment was conducted in duplicate (i.e. two identical 20 m² mesocosms), two independent water samples filtered (two biological replicates per mesocosm) and two qPCR replicates per biological replicate (i.e. a total of eight qPCR replicates per treatment).

To test persistence of eDNA in the water over time, samples from treatments A and B were collected again after crayfish removal. Water collection and filtration occurred three, eight, 13, 17, 23 and 28 days after crayfish removal, following the methods described above.

2.4. DNA extraction protocol from filters

DNA extractions were performed using Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit following manufacturers guidelines with minor modifications (Appendix A).

2.5. qPCR assays

Species-specific primers and probe, targeting a 109 bp fragment within the 16S region of *C. quadricarinatus* (Forward: 5'- TGG AGG CTG GAA TGA ATG G-3', Reverse: 5'- GGT CTT ATC GTC CCT CTA A-3' and specific 6-FAM MGB labelled probe 5'- TGG ACG AGA AGG AAG CTG TC-3') were developed. Primer design, *in-silico* and *in-vitro* tests were performed following Troth et al. (2020) (Appendix B). Optimization of primers and probe concentration was processed using different concentrations ranging from 0.5 μM to 10 μM. Annealing temperature for qPCR was also optimized by testing a gradient of temperature ranging from 55 °C to 65 °C.

2.6. qPCR treatments

Each natural replicate (i.e. water sample) was analysed in four technical replicates (qPCR replicates) to obtain a final number of 12 replicates per sampling 'station' following methods outlined in Appendix C.

Standard curves were generated using DNA extracted from *C. quadricarinatus* (20 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 5 ng.μL⁻¹ to 2×10⁻⁸ ng.μL⁻¹. According to Agersnap et al. (2017), positive signals were considered when a Ct value < 42 (i.e. considered 'false positive' if above). A site was identified as 'invaded by *C. quadricarinatus*' if at least one replicate of the 12 technical replicates (per station) was positive (Bedwell and Goldberg, 2020).

2.7. Limit of detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

In order to align with the MIQE Guidelines (Bustin et al., 2009), Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) must be determined. For that, the serial dilutions used for standard curves generation (16 dilutions in total), were treated in 10 replicates by qPCR. LOD corresponds to the lowest concentration at which one replicate of a dilution can be amplified by qPCR at a threshold cycle (Ct) < 45. LOQ corresponds to the lowest concentration at which targeted DNA can be quantified in a minimum of nine replicates of qPCR with Ct < 45 (Mauvisseau et al., 2019a).

2.8. Optimal protocol

From our data, which consisted of three natural replicates (i.e. water samples) and four technical replicates (i.e. qPCR reactions) per natural replicate, we explored the optimal level of sampling and replication needed to detect *C. quadricarinatus* in Martinique. For this, we tested the detection efficiency with one, two and three natural replicates and between two and four technical replicate per natural replicate.

2.9. Analyses

Maps were generated using QGIS 2.18 (Las Palmas) software (QGIS Development Team, 2016): Martinique map was imported from the database ©IGN and the streams from BD Carthage® and BD Topo®. Watersheds were created from Field Numeric Model (BD Alti®) performing the "r.watershed" function in Grass Gis 7 software and the six main invaded watersheds were extracted.

Statistical analyses were all performed using RStudio v1.1.463 (Core Team R Development, 2019), all field data are averaged by station in Appendix D. Two hypotheses were tested:

- (i) Do environmental parameters have an influence on the detection probability of *C. quadricarinatus*?
- (ii) Does water volume filtered have an influence on the detection probability of *C. quadricarinatus*?

Shapiro-Wilk normality test used to verify the normal distribution of the data. We ran site occupancy modelling approaches to assess effects of environmental covariates on presence of *C. quadricarinatus* eDNA and to estimate detection probability of our assay (MacKenzie et al., 2002; Royle and Dorazio, 2009). Covariates tested included: (i) volume of water filtered (potentially leading to an increase of target DNA or inhibition), (ii) pH, (iii) Oxygen concentration, (iv) Oxygen saturation, (v) Temperature, and (vi) Conductivity. Analyses were performed using the 'eDNAoccupancy' package in R (Core Team R Development, 2019). Model selection, and interpretation, followed procedures given in Dorazio and Erickson (2018). Our model was fitted using the 'occModel' function from the described package. MCMC chains ran for 10,000 iterations for obtaining parameter estimates and credible intervals.

The model developed by Griffin et al. (2019) allowed us to estimate false positive and false negative errors, and was applied to our data following instructions under the defaults settings. Analyses were performed using the website (<https://seak.shinyapps.io/eDNA/>), with the presence/absence of crayfish as covariate. Probability of species presence (ψ), probability of eDNA presence given species presence ($\theta11$ or true positive field sample), probability of eDNA presence given species absence ($\theta10$ or false positive field sample), probability of eDNA detection given eDNA presence ($p11$ or true positive qPCR detection), probability of eDNA detection given eDNA absence ($p10$ or false positive qPCR detection) were investigated. To investigate the influence of crayfish biomass on detection efficiency, Student t-tests were performed under RStudio v1.1.463 (Core Team R Development, 2019).

3. Results

3.1. qPCR assays and protocol optimization

The primers and probe successfully amplified *C. quadricarinatus* extracted DNA and were found to be species-specific (i.e. no amplification was observed using DNA extracted from the other freshwater crayfish species tested: *A. pallipes*, *P. leniusculus*, *P. clarkii* and *C. destructor*). After qPCR optimization, optimum yields were observed using a final concentration of 5 μM for both primers and probe with an annealing temperature of 58 °C.

The mean amplification value (Ct Value) for DNA extracted from *C. quadricarinatus* tissue was 15.63 for a concentration of 60 ng.μL⁻¹ (measured with NanoDrop® 1000 Spectrophotometer). Limit of Detection was found to be 1.19×10⁻⁶ ng.μL⁻¹ (2/10 replicates) and Limit of Quantification 1.91×10⁻⁵ ng.μL⁻¹ (9/10 replicates). Concentration of *C. quadricarinatus* DNA in a sample can be correlated to the crossing point of amplification with the equation: $y = 21.004 - 3.3525x$.

3.2. Mesocosm

Mesocosm experiments revealed a significant influence of crayfish

biomass on the detection efficiency by qPCR, with mean Ct values ranging from 29.52 ± 1.55 (Treatment C, 1000 g of crayfish) to 34.24 ± 0.76 for treatment A (one crayfish or 40 g) ($t = 8.100$, $df = 10.171$, $p\text{-value} < 0.001$). Further there was significant differences between the 40 g aquarium mesocosm vs one ton pond ($t = 5.381$, $df = 8.496$, $p\text{-value} < 0.001$) and the 40 g vs three tons raised pond ($t = 11.064$, $df = 13.641$, $p\text{-value} < 0.001$) (Fig. 1). There were no significant differences between the 40 g aquarium mesocosm vs the 100 g aquarium mesocosm or between the 1000 g aquarium mesocosm and one ton pond or three tons raised pond (Fig. 1).

There was a decrease in the detection probability over time, once the crayfish were removed across both treatments. For treatment A this started at 100% at Day 0, followed by 50% after 13 days, 12.5% after 23 days and 0% after 28 days (Fig. 2A). For treatment B, DNA was successfully amplified during all 28 days of the experiment: detection probability reached 100% up to 8 days and decreased to 50% after 17 days, then 12.5% after 28 days. (Fig. 2B). These results were mirrored by an increase of Mean Ct value (starting from 37.32 ± 2.49 to 40.47 ± 0 for treatment A and from 38.25 ± 0.88 to 40.91 ± 0 for treatment B) (Fig. 2).

3.3. eDNA detection in situ and comparison with traditional method

Among the 83 sampled field sites, *C. quadricarinatus* eDNA was detected in 47 locations (i.e. 56.6% of sites surveyed). This corresponds to 23 rivers and 2 closed water basins. Crayfish were caught with traps only in 28 sites (33.7% of those surveyed), and all these were positive using the eDNA-based survey (Fig. 3). Six watersheds were therefore classed as being 'invaded', with detection at most of the prospected sites: 'Lezarde', 'Case-Navire', 'Rivière Salée-Coulisses', 'Capot', 'Galion' and

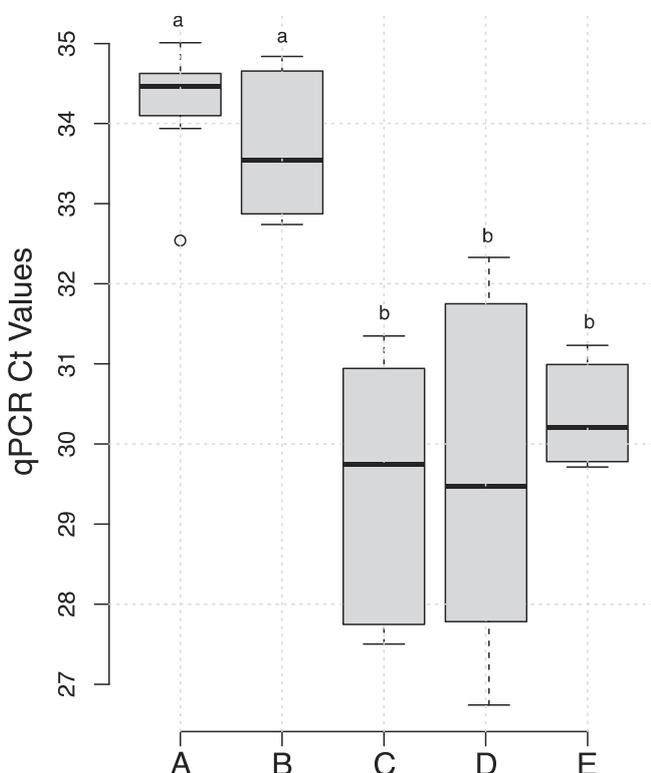


Fig. 1. Influence of crayfish biomass, under mesocosm conditions, on qPCR detection efficiency. Treatment (A) correspond to 40 g of total biomass (one crayfish) in 30 L aquarium, (B) 100 g of total biomass (two individuals) in 30 L aquarium, (C) 1000 g of total biomass in 30 L aquarium, (D) Approximately one ton of total biomass in a 20 m²-decontamination pond and (E) Approximately three tons of total biomass in a farming pond of 1000 m². Symbols a and b showed the significant statistical difference between each treatment.

'Rivière Pilote' (Fig. 3). None of these stations had previously shown to be positive using traditional methods. No amplification occurred in control samples (distilled water filtered on the field) and in negative samples, showing no cross-contamination occurred. The total volume filtered by station varied from 300 mL to 7500 mL.

3.4. Covariates influence on detection probability

A significant effect of the total volume filtered per station on the probability of eDNA occurrence was shown ($F = 9.879$; $p\text{-value}: 0.002$). Detection probability decreased when the total volume of water filtered increased (see Fig. 4A). Optimal detection probability was observed when between 300 and 2000 mL water was filtered (Fig. 4A). A decrease of detection, up to 50%, was observed with a total volume of 4000 mL and the eDNA occurrence was $< 10\%$ when filtering up to 7500 mL. Furthermore, we also found that the variability of total eDNA measured increased with the total volume of water filtered. Other parameters recorded and investigated (pH, conductivity, oxygen and temperature) were not found to have an impact on the species presence, highlighting its high tolerance regarding water quality in freshwater habitats (Fig. 4).

3.5. False negative and false positive errors

Posterior mean values of the *C. quadricarinatus* presence probability Ψ (0.514) and the probability of false positive field sample θ_{10} (0.115) are in accordance with expected values (respectively 0.5 and 0.11) (Table 1). The probability of 'true positive' field samples (θ_{11}), is overestimated in comparison with expected value (0.986 vs 0.88) (Table 1). The probability of 'true positive' qPCR detection (p_{11}) and false positive qPCR detection (p_{10}) are lower than expected values given by the model (p_{11} : 0.778 vs 0.9 and p_{10} : 0.001 vs 0.1) (Table 1).

3.6. Optimal protocol

When only one field-filtered biological replicate was utilised with one technical replicate, we were unable to detect crayfish with any level of confidence. When two technical replicates were used, the assays efficiency was significantly higher (87.71%). This increased even further with four technical replicates (97.76%). Processing two biological replicates in contrast (each with two qPCR replicates) saw a detection efficiency as high as 98.88%. 100% efficiency was achieved when four qPCR replicates were used, each with two biological replicates and/or when three biological replicates were used with either two or four qPCR replicates (Fig. 5).

4. Discussion

Our study was conducted to explore the feasibility of using environmental DNA to detect *C. quadricarinatus* with high reliability. In order to ensure this reliability in this novel assay, we followed the validation steps outlined by Thalinger et al. (2020). The specificity of our primers was initially assessed *in-silico*, followed by *in-vitro* validation using DNA extracted from other closely related crayfish species. The designed assay showed high sensitivity and the Limit of Detection and Limit of Quantification were in accordance with other recently optimized studies on freshwater invertebrates (Mauvisseau et al., 2019a, 2019b).

Mesocosm experiments indicated that biomass had a positive effect on the detection efficiency and demonstrated that eDNA persisted (once the animal was removed) for at least 21 days (when one crayfish was present per 30 L) and 28 days (two crayfish present). Our results are in accordance with Minamoto et al. (2012) who showed a long persistence of fish eDNA in cold water (upwards of a month at 17 °C). This result can be surprising, as other studies shown an increase of the eDNA degradation with an increase of the water temperature (Robinson et al., 2018).

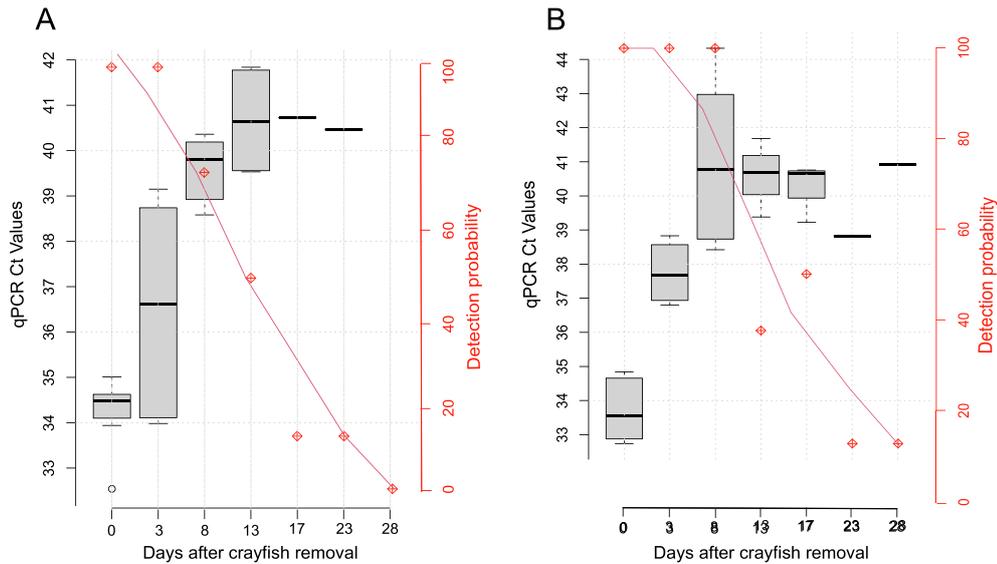


Fig. 2. Evolution of qPCR Ct values and proportion of qPCR positive replicates (in red) following removal of one crayfish (A) or two crayfish (B) in a 30L container after 28 days of experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

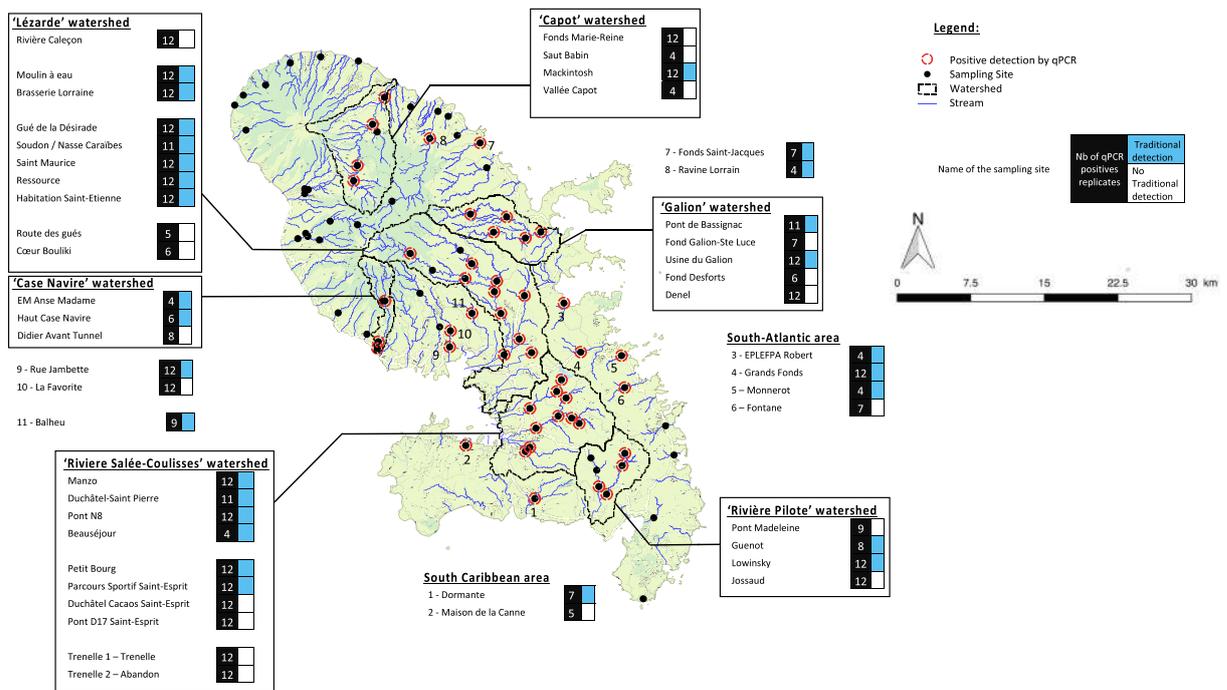


Fig. 3. Detection of *Cherax quadricarinatus* in Martinique. Black points on the map represent the 83 sampling sites while red-surrounded points show *Cherax quadricarinatus* presence. The black squares in legend represent *Cherax quadricarinatus*-specific qPCR positive amplification with the number of qPCR positive replicates (total of 12 technical replicates). All sites were surveyed by traditional trapping method and blue squares are the sites where *Cherax quadricarinatus* have been detected with this method. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Furthermore, with eDNA persistence being higher than 20 days, there is a decrease in the probability of false negatives results often associated with rapid eDNA degradation (Li et al., 2019). That said, other environmental parameters associated with false negatives may well still play important roles here, such as flow rates (Deiner and Altermatt, 2014). However, the long detection efficiency may result in false positives if (or when) the crayfish has left the surveyed site or died. That said, recent evidence suggests dead crayfish release little to non-detectable eDNA traces (Curtis and Larson, 2020), and so this should be of least concern with the reliability of the assay.

Our mesocosm experiments also showed a positive correlation

between biomass and detection efficiency. This is in accordance with findings from Dougherty et al. (2016) who showed 95% detection probability, with low sampling effort, when sampling the rusty crayfish (*Faxonius rusticus*) at moderate-to-high densities (CPUE from 1.52 to > 10). Interestingly, in our study, eDNA detection remained successful at locations where the CPUE was relatively low, again this reflects other studies on *Pacifastacus fortis*, or *Astacus astacus* and *P. leniusculus* for example (Coward et al., 2018; Strand et al., 2019).

As part of our survey data we were also able to further test the reliability of the assay by utilizing known presence/absence of *C. quadricarinatus* across a number of sites (Guan et al., 2019). From 83

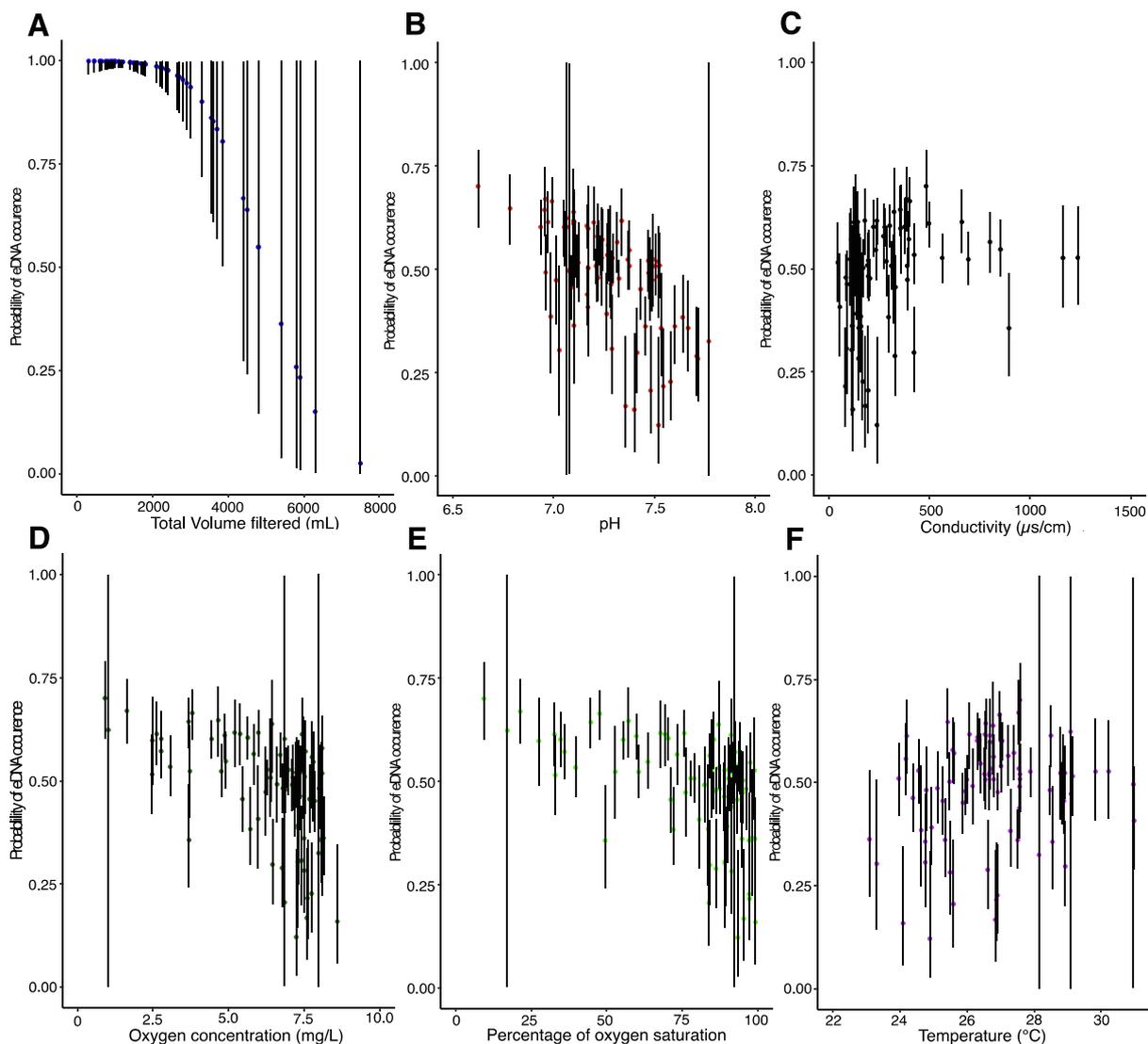


Fig. 4. Influence of covariates: (A) Total volume filtered, (B) pH (C) Conductivity, (D) oxygen concentration, (E) Percentage of oxygen saturation and (F) Temperature on the probability of *C. quadricarinatus* eDNA occurrence following site occupancy modelling.

Table 1

False negative and false positive rates in eDNA-based detection.

	2.5 Credible Interval	Posterior Mean	97.5 Credible Interval	Expected Value
Ψ : Probability of species presence	0.324	0.514	0.664	0.5
θ_{11} : Probability of true positive field sample	0.916	0.986	0.999	0.88
θ_{10} : Probability of false positive field sample	0.00002	0.115	0.372	0.11
p_{11} : Probability of true positive qPCR detection	0.741	0.778	0.811	0.9
p_{10} : Probability of false positive qPCR detection	6×10^{-5}	0.001	0.007	0.1

surveyed sites, 47 were positive for eDNA. Out of the 28 sites found positive using trapping, all were shown to be positive for eDNA indicating 100% efficiency of the assay when mapped to the traditional survey methods. This is similar to other studies who also focused on a number of different invertebrate species (Dougherty et al., 2016; Harper et al., 2018; Atkinson et al., 2019; Troth et al., 2020). However, interestingly, one study showed much lower efficiency values (59%) when detecting *P. clarkii* in freshwater ponds in France (Tréguier et al., 2014).

We were also interested in exploring what was the desired number of natural and/or technical replicates need to give optimal efficiency (Mauvisseu et al., 2019a, 2019b). This is particularly important when

working with crayfish over fish for example, as crustaceans release less DNA (Dougherty et al., 2016). Here, we clearly showed that with only one field-filtered biological replicate, we were unable to detect any crayfish with any confidence. According to our results, the optimal protocol in terms of detection efficiency and lab experiments is three field-filtered biological replicates and two qPCR technical replicates per biological replicate.

Finally, we explored the possibilities of tackling the issues around potential false negatives and false positives using modelling (Griffin et al., 2019). Here, we were able to ascertain the influence of covariates (total volume filtered per station, oxygen saturation, oxygen

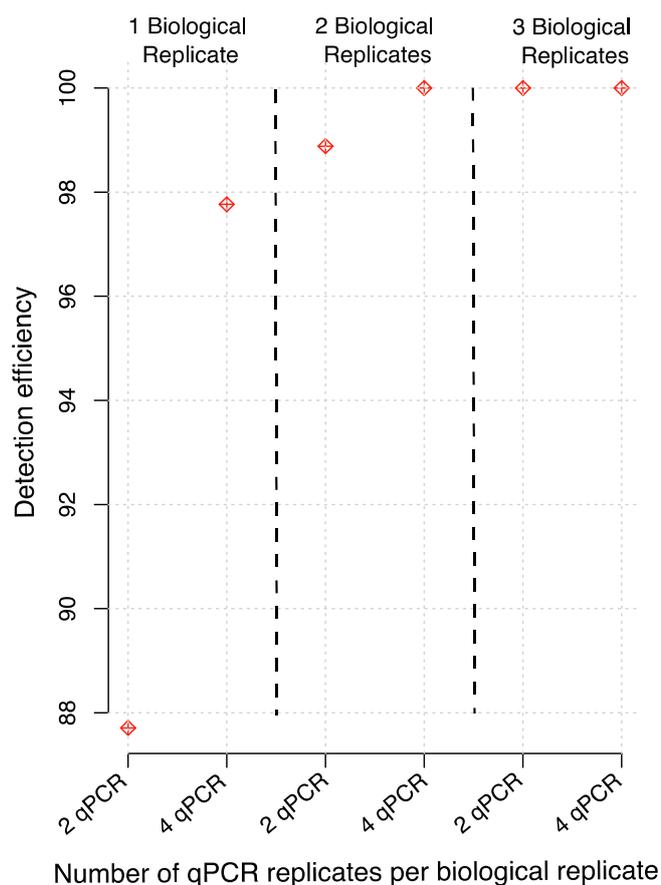


Fig. 5. Exploring the optimal protocol for eDNA detection of *Cherax quadricarinatus* in Martinique. *In-situ* detection efficiency of *C. quadricarinatus* with one, two or three biological replicates (filtrations on the field) followed by either two or four qPCR replicates per filter.

concentration, pH, temperature and conductivity) on eDNA detection efficiency. Interestingly, we found that optimal detection yields were obtained after filtering a maximum of 2000 mL spread over three natural replicates at any given site. These results differ from other studies that often highlight an increase of species detection rates when processing larger volumes: up to 30 L by site for Strand et al. (2019), and 34 to 340 L for Cantera et al. (2019) for example. In our study, we used relatively large pore size filters (0.45 μm), to facilitate an increase of the total volume filtered. Smaller pore sizes lead to an increase of retrieved suspended matter, rapidly clogging them (Bedwell and Goldberg, 2020). However, increasing the volume filtered, could lead to an increase of the amount of total eDNA captured (targeted and non-targeted). In particular, increased columns often results in increases in particular matter captured on the filter and or may have a dilution effect on the target DNA. Indeed, various studies have already highlighted the influence of turbidity on the detection efficiency for example, potentially leading to false negative results in particular (Coward et al., 2018; Strand et al., 2019). The other covariates (oxygen, pH, temperature and conductivity) were not correlated with the detection efficiency. However, when considering temperature, Moyer et al. (2014) showed a decrease of detection of 1.7 times when the temperature rises by 1.02 $^{\circ}\text{C}$. In our case, this contradictory finding may be due to *C. quadricarinatus* high tolerance regarding these environmental parameters (Tropea et al., 2010). However, regardless of the lack of effect associated with these covariates we were able to show that the probability of detection could be over-estimated (probability of true positive field sample θ_{11} : 0.986 while expected value is 0.88) or underestimated (probability of true positive

qPCR detection p_{11} and false positive qPCR detection p_{10} : respectively 0.778 and 0.001 while expected values are 0.9 and 0.1).

Nevertheless, such over or under estimation would likely be consistent regardless of technique used to survey and we conclude by highlighting the usefulness of this novel eDNA based assay for surveying *C. quadricarinatus*. Worryingly, this study highlights that *C. quadricarinatus* is present across much of Martinique. However, the impacts of this invasive species remain unknown. Invasive crayfish in general are known to negatively affect the trophic chain at all levels through competition or predation (Loureiro et al., 2015; Jackson et al., 2017; Lang et al., 2020) and various studies have shown a strong decrease of invertebrates after the introduction of invasive crayfish (Jackson et al., 2014; Loureiro et al., 2015; Lang et al., 2020). In our study, crayfish seem highly abundant in some sites such as the Lezarde river for example. These high densities, coupled with an absence of predators able to control populations point to the likelihood of critical loss of the biodiversity in the very near future, unless active management and control of this species is undertaken. The first record of this species in Martinican streams was only in 2009 during electrofishing surveys (Pers. Com., ODE Martinique), another survey, targeting directly this crayfish species, described 10 sites where populations of *C. quadricarinatus* were found (six streams and four closed water bodies) (Baudry et al., 2020). Here, we presented 47 identified sites populated by *C. quadricarinatus* (23 rivers and two closed water basins), indicating the species is widely distributed throughout Martinique. Only 36 sites appear to be 'free' from the species. How long these will remain as such, is a difficult question to answer. Monitoring these crayfish-free stations, using the eDNA assay developed here will now enable rapid detection of newly colonised sites and therefore allow for a mitigation strategy to be implemented before populations get too large and out of control (Gherardi et al., 2011; Havel et al., 2015; Early et al., 2016). A citizen science approach could also be applied here, aiming to educate locals around the risk of release and escapes.

5. Conclusion

Here we have developed and validated (through *in-silico*, *in vitro*, mesocosm and *in-situ* experiments) a novel assay to detect the highly invasive crayfish species *C. quadricarinatus*. We utilised this assay to assess the current invasion of this species across Martinique, a biodiversity hotspot in the Caribbean tropical area. We found a positive relationship between crayfish biomass and eDNA detection probability and illustrated that eDNA persisted up to three weeks in the absence of the crayfish, even in the warm tropical waters of the island. This update, in the distribution of *C. quadricarinatus* across Martinique can now be used by management as a way to try and contain the invasion and to protect invasive-free watersheds.

CRedit authorship contribution statement

Thomas Baudry: Conceptualization, Methodology, Software, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Validation, Project administration, Funding acquisition. **Quentin Mauvisseau:** Conceptualization, Methodology, Software, Formal analysis, Writing - review & editing, Visualization. **Jean-Pierre Goût:** Supervision, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Alexandre Arque:** Supervision, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Carine Delaunay:** Methodology, Validation. **Juliette Smith-Ravin:** Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Michael Sweet:** Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition. **Frédéric Grandjean:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

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 would like to thank Eleni Matechou and Alex Diana for their help with the statistical model they have developed, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Poitiers for the provision of all the equipment necessary to carry out the study.

This project was funded by the Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Martinique (DEAL), the Office de l'Eau de Martinique (ODE), the Office Français de la Biodiversité (OFB) and the Collectivité Territoriale de Martinique (CTM).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107637>.

References

- Agersnap, S., Larsen, W.B., Knudsen, S.W., Strand, D., Thomsen, P.F., Hesselsoe, 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, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179261>.
- Anadón-Irizarry, V., Wege, D.C., Ugren, A., Young, R., Boom, B., León, Y.M., Arias, Y., Koenig, K., Morales, A.L., Burke, W., Pérez-Leroux, A., Levy, C., Koenig, S., Gape, L., Moore, P., 2012. Sites for priority biodiversity conservation in the Caribbean Islands Biodiversity Hotspot. *J. Threatened Taxa* 04, 2806–2844. <https://doi.org/10.11609/jott.o2996.2806-44>.
- 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 Sci.* 38, 503–509. <https://doi.org/10.1101/562710>.
- 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. *Knowledge Manage. Aquatic Ecosyst.* 421 <https://doi.org/10.1051/kmae/2020041>.
- Bedwell, M.E., Goldberg, C.S., 2020. Spatial and temporal patterns of environmental DNA detection to inform sampling protocols in lentic and lotic systems. *Ecol. Evol.* 10, 1602–1612. <https://doi.org/10.1002/ece3.6014>.
- 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. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Cantera, I., Cilleros, K., Valentini, A., Cerdan, A., Dejean, T., Iribar, A., Taberlet, P., Vigouroux, R., Brosse, S., 2019. Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers. *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39399-5>.
- Core Team R Development. (2019). R: a language and environment for statistical computing.
- 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. *J. Crustac. Biol.* 38, 257–266. <https://doi.org/10.1093/jcobiol/ruy007>.
- Curtis, A.N., Larson, E.R., 2020. No evidence that crayfish carcasses produce detectable environmental DNA (eDNA) in a stream enclosure experiment. *PeerJ* 8, e9333. <https://doi.org/10.7717/peerj.9333>.
- DEAL Martinique, ECOVIA, CREOCEAN. (2018). Diagnostic - Profil Environnemental de la Martinique 139 p.
- 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>.
- Dorazio, R.M., Erickson, R.A., 2018. ednaoccupancy: an R package for multiscale occupancy modelling of environmental DNA data. *Mol. Ecol. Resour.* 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. *J. Appl. Ecol.* 53, 722–732. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12621>.
- 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>.
- Early, R., Bradley, B.A., Dukes, J.S., Lawler, J.J., Olden, J.D., Blumenthal, D.M., Gonzalez, P., Grosholz, E.D., Ibañez, I., Miller, L.P., Sorte, C.J.B., Tatem, A.J., 2016. Global threats from invasive alien species in the twenty-first century and national response capacities. *Nat. Commun.* 7, 12485. <https://doi.org/10.1038/ncomms12485>.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>.
- Gherardi, F., Aquiloni, L., Diéguez-Urbeondo, J., Tricarico, E., 2011. Managing invasive crayfish: Is there a hope? *Aquat. Sci.* 73, 185–200. <https://doi.org/10.1007/s00027-011-0181-z>.
- 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. *Aquat. 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.* <https://doi.org/10.1111/rssc.12390>.
- Guan, X., Monroe, E.M., Bockrath, K.D., Mize, E.L., Rees, C.B., Lindsay, D.L., Baerwaldt, K.L., Nico, L.G., Lance, R.F., 2019. Environmental DNA (eDNA) Assays for Invasive Populations of Black Carp in North America. *Trans. Am. Fish. Soc.* 148, 1043–1055. <https://doi.org/10.1002/tafs.10195>.
- Hänfling, B., Handley, L.L., Read, D.S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R.C., Oliver, A., Winfield, L.J., 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Mol. Ecol.* 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). *Manage. Biol. Invas.* 9, 137–148. <https://doi.org/10.3391/mbi.2018.9.2.07>.
- Havel, J.E., Kovalenko, K.E., Thomaz, S.M., Amalfitano, S., Kats, L.B., 2015. Aquatic invasive species: challenges for the future. *Hydrobiologia* 750, 147–170. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2166-0>.
- Jackson, M.C., Evangelista, C., Zhao, T., Lecerf, A., Britton, J.R., Cucherousset, J., 2017. Between-lake variation in the trophic ecology of an invasive crayfish. *Freshw. Biol.* 62, 1501–1510. <https://doi.org/10.1111/fwb.12957>.
- 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. *Freshw. Biol.* 59, 1123–1135. <https://doi.org/10.1111/fwb.12333>.
- Keller, R.P., Kumschick, S., 2017. Promise and challenges of risk assessment as an approach for preventing the arrival of harmful alien species. *Bothalia* 47, 1–8. <https://doi.org/10.4102/abc.v47i2.2136>.
- Lang, I., Evangelista, C., Everts, R.M., Loot, G., Cucherousset, J., 2020. Stable resource polymorphism along the benthic littoral-pelagic axis in an invasive crayfish. *Ecol. Evol.* 10, 2650–2660. <https://doi.org/10.1002/ece3.6095>.
- Lawson Handley, L., Read, D.S., Winfield, L.J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., Hahn, C., Blackman, R., Wilcox, R., Donnelly, R., Sztienberg, 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>.
- Li, J., Lawson Handley, L.J., Harper, L.R., Brys, R., Watson, H.V., Di Muri, C., Zhang, X., Hänfling, B., 2019. Limited dispersion and quick degradation of environmental DNA in fish ponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA* 1, 238–250. <https://doi.org/10.1002/edn3.24>.
- Lodge, D.M., Deines, A., Gherardi, F., Yeo, D.C.J., Arcella, T., Baldrige, A.K., Barnes, M. A., Chadderton, W.L., Feder, J.L., Gantz, C.A., Howard, G.W., Jerde, C.L., Peters, B. W., Peters, J.A., Sargent, L.W., Turner, C.R., Wittmann, M.E., Zeng, Y., 2012. Global introductions of crayfishes: evaluating the impact of species invasions on ecosystem services. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 449–472 <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-111511-103919>.
- Loureiro, T.G., Anastácio, P.S.M.G., Souty-Grosset, C., Araujo, P.B., Almerão, M.P., 2015. Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion - an overview. *Nauplius* 23, 1–19.
- 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).
- Manfrin, C., Souty-Grosset, C., Anastácio, P.M., Reynolds, J., Giulianini, P.G., 2019. Detection and control of invasive freshwater crayfishes: From traditional to innovative methods. *Diversity* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3390/d11010005>.
- Mauvisseau, Q., Davy-Bowker, J., Bulling, M., Brys, R., Neyrinck, S., Troth, C., Sweet, M., 2019a. Combining ddPCR and environmental DNA to improve detection capabilities of a critically endangered freshwater invertebrate. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50571-9>.
- Mauvisseau, Q., Tönges, S., Andriantsoa, R., Lyko, F., Sweet, M., 2019b. Early detection of an emerging invasive species: eDNA monitoring of a parthenogenetic crayfish in freshwater systems. *Management of Biological Invasions* 10, 461–472. <https://doi.org/10.3391/mbi.2019.10.3.04>.
- Mendoza-Alfaro, R.E., Rodríguez-Almaraz, G.A., Castillo-Alvarado, S.A. (2011). Riesgo de dispersión y posibles impactos de los acociles australianos del género *Cherax* en México. <https://doi.org/10.13140/2.1.4722.7528>.
- Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M.N., Kawabata, Z., 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13, 193–197. <https://doi.org/10.1007/s10201-011-0362-4>.
- Momot, W.T. (1995). Reviews in Fisheries Science Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems Redefining the Role of Crayfish in Aquatic Ecosystems. *Reviews*

- in Fisheries Science 3, 33-63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10641269509388566> PLEASE.
- Moyer, G.R., Diaz-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>.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>.
- Rees, H.C., Maddison, B.C., Middleditch, D.J., Patmore, J.R.M., Gough, K.C., 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. J. Appl. Ecol. 51, 1450–1459. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>.
- Reynolds, J., Souty-Grosset, C., Richardson, A., 2013. Ecological roles of crayfish in freshwater and terrestrial habitats. Freshwater Crayfish 19, 197–218. <https://doi.org/10.5869/fc.2013.v19-2.197>.
- 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. Biol. Conserv. 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. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374097-7.X0001-4>.
- Šidagytė, E., Razluskij, V., Alekhovich, A., Rybakovas, A., Moroz, M., Šniaukškaitė, V., Vaitonis, G., Arbačiauskas, K., 2017. Predatory diet and potential effects of *Orconectes limosus* on river macroinvertebrate assemblages of the Southeastern Baltic Sea Basin: Implication for ecological assessment. Aquat. Invasions 12, 523–540. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.4.09>.
- Souty-Grosset, C., Noël, P.Y., Malcolm, D., 2006. Atlas of crayfish in Europe. Collection Patrimoines naturels.
- Strand, D.A., Johnsen, S.I., Rusch, J.C., Agersnap, S., Larsen, W.B., Knudsen, S.W., Møller, P.R., Vrålstad, T., 2019. Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. J. Appl. Ecol. 56, 1661–1673. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13404>.
- Team, Q.D., 2016. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project.
- Thalinger, B., Deiner, K., Harper, L., Rees, H., Blackman, R., Sint, D., Traugott, M., Goldberg, C., Bruce, K., 2020. A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. BioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.063990>.
- Thomsen, P.F., Willerslev, E., 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Biol. Conserv. 183, 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>.
- 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. J. Appl. Ecol. 51, 871–879. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12262>.
- Tropea, C., Piazza, Y., López, L.S., 2010. Effect of long-term exposure to high temperature on survival, growth and reproductive parameters of the 'redclaw' crayfish *Cherax quadricarinatus*. Aquaculture 302, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.027>.
- 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. Sci. Total Environ. 748, 141394 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141394>.
- Vitousek, P.M., 1988. Diversity and Biological Invasions of Oceanic Islands. Biodiversity. 181–190.

A retenir :

- 4 populations connues en 2015 (suivi ODE non-spécifique pêche électrique)
- 8 rivières et 5 bassins d'eau close envahis en 2018 (méthode traditionnelle)
- 8 haplotypes (gène mitochondrial COI - 491 bp) découverts en Martinique dont 3 majoritaires
- Deux autres haplotypes présents dans le Sud, assez divergents

⇒ Invasion qui progresse

⇒ Évidence de plusieurs évènements d'introduction

- 23 rivières totalement envahies et 2 bassins d'eau close totalement envahis

⇒ Méthode ADNe optimisée et validée pour *C. quadricarinatus* en zone tropicale

⇒ Invasion massive en Martinique (multiples évènements d'introduction et dispersion assistée par l'Homme)

Chapitre 3 - Écologie trophique de *Cherax quadricarinatus* et ses impacts sur les communautés des cours d'eau de Martinique



I. Introduction du Chapitre 3

Les écrevisses exotiques envahissantes sont des crustacés omnivores, de grande taille, agissant comme des régulateurs des communautés natives et causant de profonds dommages dans les écosystèmes où elles sont introduites (Twardochleb et al., 2013; Souty-Grosset et al., 2016). Leurs impacts écologiques ont été étudiés et sont relativement bien connus (voir Introduction générale). Elles peuvent avoir des impacts directs (prédation, transmission de pathogènes) ou indirects (compétition pour la ressource alimentaire ou les habitats) sur l'ensemble des communautés faunistiques et floristiques des écosystèmes d'eau douce (Souty-Grosset et al., 2016). De nombreuses études ont révélés des effets sur les communautés telles que les mollusques, les macrophytes ou les autres invertébrés benthiques (Loureiro et al., 2015; Jackson et al., 2017; Lang et al., 2020; Madzivanzira et al., 2020). En tant qu'espèces dites « ingénieures », elles modifient également les caractéristiques physiques et chimiques du milieu, provoquant une modification du fonctionnement des écosystèmes (Souty-Grosset et al., 2016). Les impacts sur les communautés autochtones peuvent être dramatiques, avec des pertes de biodiversité importantes, dues à des déplacements de populations de certaines espèces ou l'extirpation d'autres. Par exemple, les impacts sont bien souvent plus importants en milieu insulaire, à cause des réseaux trophiques peu complexes qui les caractérisent, la faible diversité spécifique, et l'absence de « top-prédateur » natifs (Nivet et al., 2010). Ces impacts pourraient être dépendants des tailles corporelles des individus (effet ontogénétique), comme l'ont révélé plusieurs études. Par exemple, les adultes *P. leniusculus* consomment significativement plus de détritits que les juvéniles, qui vont préférer les invertébrés (*Chironomidae*, *Ephemeroptera*, ainsi que les *Coleoptera*) (Guan and Wiles, 1998). Ces résultats s'expliquent par des besoins énergétiques plus importants chez les juvéniles afin d'assurer une croissance maximale, et par une moins grande agilité des adultes à capturer des proies mobiles (Guan and Wiles, 1998). Néanmoins, ce patron ontogénique peut être variable entre les espèces (Jackson et al., 2017).

La compétition et la prédation des communautés autochtones peuvent être étudiées grâce à différentes méthodes, soit dans le milieu naturel, soit par des

expérimentations en mésocosme. Concernant les approches pour quantifier ces interactions, l'analyse du contenu gastrique permet d'apporter des informations intéressantes sur les sources d'alimentation des écrevisses, à une échelle de temps très courte, généralement relative au dernier repas (Whitledge and Rabeni, 1997; Parkyn et al., 2001). Cette technique reste facile à mettre en place mais elle comporte quelques biais : les individus capturés peuvent n'avoir aucun aliment dans leurs intestins (surtout si l'on utilise des nasses appâtées pour la capture), et lorsque ce n'est pas le cas, les déterminations taxonomiques sont souvent difficiles, car les proies sont physiquement altérées (Marufu et al., 2018b). Par exemple, les macroinvertébrés, dont le corps est mou, sont assimilés plus vite et sont rarement retrouvés (Marufu et al., 2018b). Les méthodes moléculaires permettent une analyse des impacts à une échelle plus globale, comme les analyses des isotopes stables. Cette méthode est devenue assez populaire (Fry, 2006; Grey, 2006) et a largement été utilisée pour l'étude des relations trophiques entre les écrevisses exotiques envahissantes et les communautés autochtones (Bodey et al., 2011; Pacioglu et al., 2019; Linzmaier et al., 2020). Grâce à l'analyse des isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) et du carbone ($\delta^{13}\text{C}$), les flux d'énergie (i.e. énergie réellement assimilée) sont quantifiés au sein du réseau trophique, permettant également d'appréhender les régimes alimentaires à long terme (plusieurs semaines) des espèces considérées (Grey, 2006). Grâce à une diminution des coûts d'analyses et le développement de modèles statistiques, les relations de compétition et de prédation au sein des réseaux trophiques envahis peuvent être mesurées de manière fiable (Cucherousset et al., 2012).

Il est également possible de mettre en place des expérimentations en milieu contrôlé (mésocosme ou aquarium) pour déterminer le choix alimentaire des écrevisses exotiques envahissantes. Cette méthode permet d'obtenir des preuves sur les potentiels impacts de ces espèces et elle a largement été utilisée dans le cadre des invasions par les écrevisses (Šidagytė et al., 2017; Linzmaier et al., 2020; Dobler, 2021).

Même si aucune donnée n'est disponible sur les cours d'eau de Martinique, on peut s'attendre à de forts impacts de *C. quadricarinatus* sur les communautés aquatiques. En effet, plusieurs études ont montré que *C. quadricarinatus* devenait très rapidement majoritaire en termes de biomasse dans son environnement d'accueil (si celui-ci est

favorable) grâce à ses caractéristiques intrinsèques de reproduction et de croissance impressionnantes (Madzivanzira et al., 2020; Haubrock et al., 2021). Les données sur ses impacts réels sont rares et souvent anecdotiques (Madzivanzira et al., 2020; Haubrock et al., 2021). La seule étude connue à ce jour est celle menée par Marufu et al. (2018) sur une population du lac Kariba, au Zimbabwe. Grâce à l'analyse isotopique, ils ont mis en évidence une position trophique plutôt haute de *C. quadricarinatus*, sans changement ontogénétique net. Les modèles de mélange ont permis de classer l'écrevisse comme omnivore, à tendance herbivore, avec une préférence pour les macrophytes, puis les macroinvertébrés, les détritiques et les poissons. Pour les individus adultes, du cannibalisme a été observé (Marufu et al., 2018b). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de contenu gastrique de 161 individus, avec la présence de macrophytes comme étant la source principale de nourriture (63.6-97.1%), suivi des détritiques (20-45.5%) et le cannibalisme (jusqu'à 9%). Très peu de macroinvertébrés ont été retrouvés visuellement dans le contenu stomacal des écrevisses (Marufu et al., 2018b).

En Martinique, *C. quadricarinatus* a été introduite au début des années 2000 pour en faire son élevage et, à la suite de relâchers intentionnels, s'est retrouvée dans le milieu naturel (Baudry et al., 2020). Aujourd'hui, elle est présente dans plus de 20 rivières (Baudry et al., 2021), les conséquences de ses impacts potentiels sur les communautés autochtones, doivent être investiguées d'une part pour augmenter nos connaissances et d'autre part pour communiquer sur celles-ci afin d'éviter son introduction dans d'autres zones. Nous faisons l'hypothèse d'une variation de la niche trophique avec la taille des écrevisses (effet ontogénétique). Nous suspectons de forts impacts sur les communautés locales (aussi bien végétales qu'animales) et notamment les mollusques, pour lesquels un déclin de populations a déjà été observé (Pers. Com. Jarne). En raison du caractère omnivore de *C. quadricarinatus*, nous suspectons des chevauchements de niche écologique avec les espèces autochtones, et notamment les crevettes, qui ont des caractéristiques morphologiques et alimentaires très proches. D'après la littérature, il ne serait pas surprenant d'observer une prépondérance d'une alimentation riche en plantes/détritiques ainsi que du cannibalisme, aux vues des fortes densités de population à certaines stations. L'objectif de cette étude a été de quantifier,

grâce à l'analyse des isotopes stables, (i) l'écologie trophique de *C. quadricarinatus* sur quatre rivières envahies, (ii) en tenant compte des trajectoires ontogénétiques, ainsi que (iii) ses impacts sur les communautés autochtones en Martinique, en comparant la structure des chaînes trophiques entières (plantes, mollusques, crevettes et poissons), en zones envahies (quatre sites) et non-envahies (quatre sites). Enfin, (iv) des expérimentations en condition contrôlée ont permis d'obtenir des preuves de l'impact de l'écrevisse sur les communautés de mollusques (*Thiaridae* ; *Melanoides tuberculata* et *Tarebia granifera*).

II. Matériel et méthode

a. Analyses isotopiques

Prélèvement in-situ et morphométrie

Les captures en milieu naturel ont eu lieu entre Août 2021 et Septembre 2021. Huit sites ont été retenus : 4 envahis (Bassignac, Saint-Esprit, Cacao, Saint-Jacques) et 4 non-envahis par *C. quadricarinatus* (Carbet, Canal, Maison Rousse, Lorrain) (statut préalablement vérifié par ADN environnemental (Baudry et al., 2021) et prospection à l'épuisette) (Figure IV.1). Ces stations ont été choisies car elles sont comparables entre elles, au niveau de leur hydromorphologie, de leurs caractéristiques environnementales et des communautés indigènes en présence. Elles sont généralement caractérisées par un faible courant, avec une alternance fosse (majoritairement sablonneuse), plat, radier (majoritairement composé de gravier et de roches de granulométrie variable, de 1 cm à 1 mètre). La ripisylve est dominée par des *Bombacaceae* et *Artocarpus altilis*, deux espèces d'arbres, et de *Panicum maximum*, une espèce d'herbacée. Les macrophytes aquatiques sont composées de *Chara sp.* et de *Ceratophyllum sp.* (Maddi, 2014). Les communautés locales de crevettes sont dominées par les *Atyidae*, les *Xiphocarididae* et les *Palaemonidae*, et les communautés de poissons par les *Gobiidae*, les *Eleotridae*, les *Cichlidae*, les *Poeciliidae* et les *Mugilidae* (Lim et al., 2002). Les mollusques dominants présents dans les cours d'eau de Martinique sont les *Neritidae* (dans les zones courantes) et les *Thiaridae* (*Melanoides tuberculata* et *Tarebia granifera* ; dans les zones calmes) (Delannoye et al., 2015).

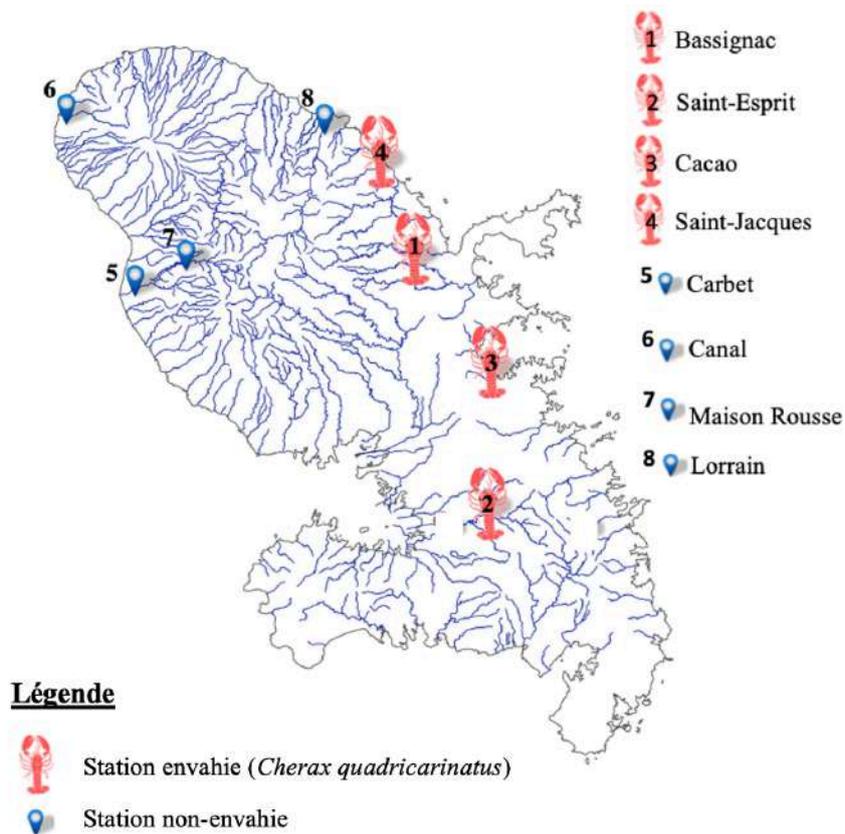


Figure IV.1 : Cartographie des sites d'étude pour les analyses isotopiques. Les quatre stations (1 à 4) représentées par une écrevisse de couleur rouge correspondent aux sites envahis par *Cherax quadricarinatus* et celles représentées par un point bleu correspondent aux stations non-envahies.

Les écrevisses et les crevettes de taille adulte ont été capturées grâce à des pièges (80 cm de long x 25 cm de largeur x 25 cm de hauteur, avec des mailles de 1 cm² et un cône anti-retour), appâtés avec de la pâtée pour chat, posés pour la nuit et relevés le matin suivant. Les poissons, ainsi que les crevettes juvéniles, ont été capturés à l'épuisette, et les mollusques, la litière et les macrophytes ont été collectés à la main. Le biofilm a été récolté en grattant les surfaces rocheuses avec un scalpel. Tous les échantillons ont été classés et identifiés au niveau taxonomique le plus précis possible (espèce ou genre) et les plantes ont été classées en tant que producteur allochtone ou autochtone. Pour les analyses isotopiques, tous les individus ont été conservés au frais après les prélèvements, jusqu'au retour au laboratoire où ils ont été stockés à -20°C jusqu'au début des expérimentations.

Les individus *C. quadricarinatus* ont été mesurés au millimètre près (LT : longueur totale du rostre au telson) (Figure IV.2) et classés comme juvéniles (Cherax I; < 5 cm), sub-adulte (Cherax II; 5-10 cm), adulte (Cherax III; 10-14 cm) et adulte II (Cherax IV; >

14 cm). De la même manière, les crevettes ont été mesurées, toutes espèces confondues, du rostre au telson (Figure IV.2) et classées en tant qu'adultes ou juvéniles, (*Macrobrachium sp.* correspondant aux juvéniles).

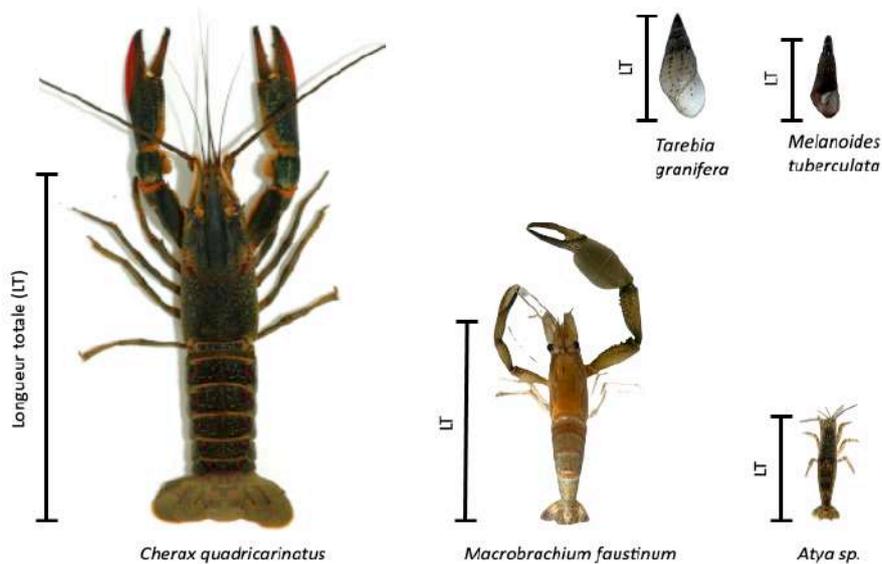


Figure IV.2 : Planche photo illustrant les prises de mesure de longueur sur l'écrevisse *Cherax quadricarinatus*, deux espèces de crevettes autochtones, *Macrobrachium faustinum* et *Atya sp.*, et deux espèces de mollusques Thiaridae, *Melanoides tuberculata* et *Tarebia granifera*.

Préparation des échantillons

En laboratoire, les échantillons ont été décongelés et les tissus de chaque taxon disséqué : le muscle abdominal pour les écrevisses et les crevettes, le muscle dorsal pour les poissons et le muscle du pied pour les mollusques. Les dissections ont été réalisées au moyen de ciseaux, de scalpels et de pinces, nettoyés au préalable avec de l'eau distillée et essuyés avec du papier Kimtech™ entre chaque échantillon, afin d'éviter tout risque de contamination. Pour les plantes, les parties les moins fibreuses ont été utilisées. Chaque échantillon de tissu a été placé dans un tube Eppendorf® puis mis à l'étuve à 60°C pendant 96 h. Les tissus végétaux ont été broyés grâce à un broyeur Retsch® Mixer Mill 400 afin d'obtenir une poudre homogène. Tous les tubes ont ensuite été scellés avec du parafilm et envoyés au Cornell Stable Isotope Laboratory (USA), pour les analyses isotopiques.

Analyses statistiques

Positions trophiques

D'après les recommandations de Post (2002), nous avons utilisé les facteurs de discrimination (TDFs) communément utilisés pour les analyses isotopiques réalisées sur les écrevisses ($\Delta^{15}\text{N} = 3.4 \pm 0.98 \%$, $\Delta^{13}\text{C} = 0.39 \pm 1.3 \%$). Ainsi, suivant McCutchan et al. (2003), les positions trophiques (TP) des écrevisses *C. quadricarinatus* et des crevettes ont été calculées individuellement :

$$TP_i = \frac{\delta^{15}N_i - \delta^{15}N_b}{\Delta^{15}N} + TP_b$$

avec TP_i et $\delta^{15}N_i$ sont la TP et le $\delta^{15}N$ des individus i considérés et $\Delta^{15}N = 3.4$ (TDFs proposé par Post (2002)). Les mollusques *Thiaridae* ont été utilisés comme valeur de base ($TP_b = 2$), grâce à leur comportement alimentaire herbivore et leur longue espérance de vie, leur permettant d'intégrer des signaux isotopiques très variables provenant des producteurs primaires, sur de longues échelles de temps (Post, 2002). Ensuite, l'influence de la taille de l'écrevisse sur la TP a été étudiée grâce à des modèles de régression linéaire et les TP des envahisseurs *C. quadricarinatus* ont été comparées entre les sites envahis. La TP moyenne de chaque espèce de crevette (*Atyidae*, *Xiphocarididae* et *Palaemonidae* – juvéniles et adultes), suivant le statut d'invasion de la rivière considérée, a également été calculée et comparée grâce à une ANOVA à un facteur (Core Team R Development, 2019).

Modèles de mélange

Les modèles de mélange sont utilisés en écologie isotopique pour estimer la contribution de chaque taxon au régime alimentaire de l'espèce cible (ici *C. quadricarinatus*) (Phillips et al., 2014). Pour chaque station envahie, les modèles ont été appliqués à chaque classe de taille de *C. quadricarinatus* grâce au package MixSIAR ('Mixing models for Stable Isotope Analysis in R' ; Stock and Semmens (2016)). Les proies potentielles ('sources') ont été rassemblées, par station, en 6 groupes : (1) Biofilm ($n = 2$), (2) Litière/détritus ($n = 3$), (3) Macrophytes ($n = 3$), (4) Mollusques (*Thiaridae* and *Neritidae*) ($n = 2-17$), (5) Crevettes (*Atyidae*, *Xiphocarididae* and *Palaemonidae* – juvéniles and adultes) ($n = 25-32$) et (6) Poissons (*Gobiidae*, *Eleotridae*, *Cichlidae*,

Poeciliidae and *Mugilidae*) (n = 4-10). Comme du cannibalisme peut être observé chez les individus adultes d'écrevisses (Bondar et al., 2005), 'crayfish' a été ajouté comme 'source' dans le modèle, pour les classes de taille « adulte » et « adulte II ». Comme il n'existe pas de TDFs spécifiques des contributeurs au régime alimentaire de *C. quadricarinatus*, nous avons utilisé les valeurs utilisées dans la littérature pour les organismes aquatiques : $\Delta^{15}\text{N} = 3.23 \pm 0.41\text{‰}$ et $\Delta^{13}\text{C} = 0.47 \pm 1.23\text{‰}$ pour les macroinvertébrés (Vander Zanden and Rasmussen, 2001), et $\Delta^{15}\text{N} = 2.4 \pm 0.42\text{‰}$ et $\Delta^{13}\text{C} = 0.40 \pm 0.28\text{‰}$ pour les détritiques et les végétaux (McCutchan et al., 2003).

Les modèles MixSIAR ont été paramétrés (Markov Chain Monte Carlo) comme « normal » dans la fonction *run_model* du package (chain length = 100,000 ; burn-in = 50,000 ; thin = 50 ; chains = 3). La station d'origine des échantillons a été ajoutée comme facteur aléatoire dans le modèle et les tests diagnostiques Gelman-Rubin et Geweke ont permis l'évaluation de la convergence de chaque modèle. La contribution de chaque taxon au régime alimentaire de *C. quadricarinatus* a été calculée et combinée de manière à obtenir la proportion de tissus d'origine végétale (macrophytes, détritiques et biofilm), la proportion de poissons, la proportion de crevettes, la proportion de mollusques et enfin la part de cannibalisme (pour les individus adultes), pour chaque classe de taille. Les résultats ont été reportés par moyenne, médiane et intervalle de confiance à 97.5% (Annexe 5).

Taille de la niche trophique

La taille de la niche pour chaque taxon, de chaque station, a été déterminée grâce au package SIBER ('Stable Isotope Bayesian Ellipses in R' ; Jackson et al., 2011) (Core Team R Development, 2019). Les aires d'ellipses standard corrigées (SEAc : Corrected Standard Ellipses Areas) ont été calculées afin de mesurer l'espace isotopique des individus, en présence ou non de *C. quadricarinatus*. Les différences de SEAc entre taxons et entre station ont été analysées grâce à une ANOVA à un facteur et un test post-hoc (Tukey HSD) (Core Team R Development, 2019). De la même manière que pour l'azote, les variations inter-sites concernant le carbone peuvent être très importantes (Vander Zanden and Rasmussen, 1999) et une correction des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ permet ces comparaisons inter-sites (Olsson et al., 2009) :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{corr}_i} = \frac{\delta^{13}\text{C}_i - \delta^{13}\text{C}_{\text{meaninv}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{maxinv}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{mininv}}}$$

Où $\delta^{13}\text{C}_i$ est le ratio isotopique de carbone pour l'individu i considéré, $\delta^{13}\text{C}_{\text{meaninv}}$ le ratio isotopique moyen de carbone de tous les invertébrés collectés sur la station considérée (représentant des proies potentielles de l'écrevisse) et $\delta^{13}\text{C}_{\text{maxinv}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{mininv}}$ l'étendue des valeurs de carbone des consommateurs primaires utilisés pour calculer les TPs, collectés sur la station donnée (ici, les *Thiaridae*).

b. Expérimentations en condition contrôlée

Prélèvement in-situ et morphométrie

Les captures des individus (écrevisses et mollusques) ont eu lieu, sur les mêmes stations que pour les analyses isotopiques (Figure 1), entre Janvier 2022 et Mars 2022. Comme précédemment, les écrevisses ont été mesurées au millimètre près (LT : longueur totale du rostre au telson) (Figure IV.2) et classés comme juvéniles (Cherax I; < 5 cm), sub-adulte (Cherax II; 5-10 cm), adulte (Cherax III; 10-14 cm) and adulte II (Cherax IV; > 14 cm). Concernant les mollusques, la longueur totale de la coquille a été mesurée (Figure IV.2) et les individus ont été classés en tant que petits (< 1 cm), moyens (entre 1 et 1.5 cm) ou grands (> 1.5 cm).

Conditions expérimentales

Les expérimentations en condition contrôlée se sont déroulées à l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) de Martinique, à partir de Février 2022. Le matériel expérimental utilisé comprenait 30 aquariums en plastique (55 cm x 19 cm x 39 cm) (Figure IV.3), munis de couvercle et alimentés en oxygène par un système de surpresseur centralisé réglable.

Les mollusques ont été placés en accommodation pendant 48h avant l'introduction des prédateurs. Les écrevisses (prédateurs) ont été maintenues en stabulation, à jeûner, pendant 5 jours, dans des bacs de 500 litres, isolées entre elles, dans des pots immergés et stabilisés sur une planche flottante (Figure IV.3).

Durant les expérimentations, chaque aquarium contenait 20 litres d'eau (équivalent à une hauteur d'eau de 10 cm), sans substrat ni cache, afin de faciliter la rencontre de l'écrevisse avec ses proies. Afin de reproduire des conditions similaires à celles retrouvées dans le milieu naturel, les caractéristiques physico-chimiques de l'eau ont été maintenues telles que : température comprise en 25°C et 27°C, pH de 7.5 et photopériode 12h/12h L:D.



Figure IV.3 : Dispositif expérimental utilisé pour les manipulations en condition contrôlée. À gauche, les installations de 30 aquariums en plastique, disposés sur des étagères et à droite, le dispositif de mise en isolement des écrevisses.

Vingt répliques ont été réalisées, en mettant en contact dans chaque aquarium, une écrevisse (LT de 51 - 172 mm) et uniquement des mollusques (de la famille des *Thiaridae*) : 10 *T. granifera* (LT : 8 - 29 mm) et 10 *M. tuberculata* (LT : 8 - 22 mm). En parallèle, 10 aquariums ont été consacrés aux conditions témoins, contenant les mêmes densités de mollusques (10 *T. granifera* et 10 *M. tuberculata*), mais dépourvu de prédateur. Au bout de 48h, les écrevisses ont été retirées et les gastéropodes survivants ont été décomptés afin de calculer la consommation individuelle des *C. quadricarinatus*. Les relations de prédation (nombre de proies consommées en fonction de la taille du prédateur et/ou de la taille de la proie) ont été analysées grâce à un modèle de régression linéaire et une ANOVA (sur R version 4.0.2 ; Core Team R Development, 2019).

III. Résultats

a. Écologie trophique de l'écrevisse

Cherax quadricarinatus occupait une position trophique relativement basse sur toutes les stations envahies, avec des TP moyennes de 1.22 ± 0.12 pour la station Cacao, 1.24 ± 0.17 pour Saint-Espirit, 1.68 ± 0.16 pour Bassignac et 1.75 ± 0.18 pour la station Saint-Jacques, respectivement (Figure IV.4).

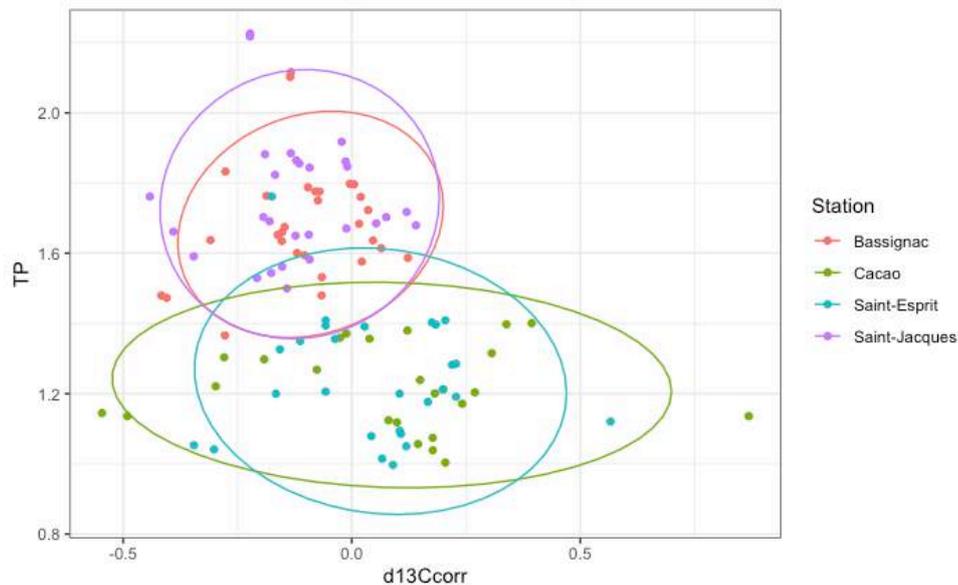


Figure IV.4 : Niche trophique de *Cherax quadricarinatus* dans les quatre stations envahies (Bassignac, Cacao, Saint-Espirit et Saint-Jacques).

Une corrélation significative existait entre la taille des individus et leur TP, mais qui variait entre les stations (Interaction Taille:Station : $F = 5.702$; p -value = 0.001). Concernant les stations Bassignac et Saint-Jacques, la TP de *C. quadricarinatus* était positivement corrélée à la taille. À l'inverse, la TP des écrevisses des stations Saint-Espirit et Cacao était négativement corrélée à leur taille (Figure IV.5A). Pour toutes les stations, il existait une corrélation positive significative entre la taille de *C. quadricarinatus* et leur valeur de $\delta^{13}\text{C}_{\text{corr}}$ ($F = 28.73$; p -value < 0.001) (Figure IV.5B).

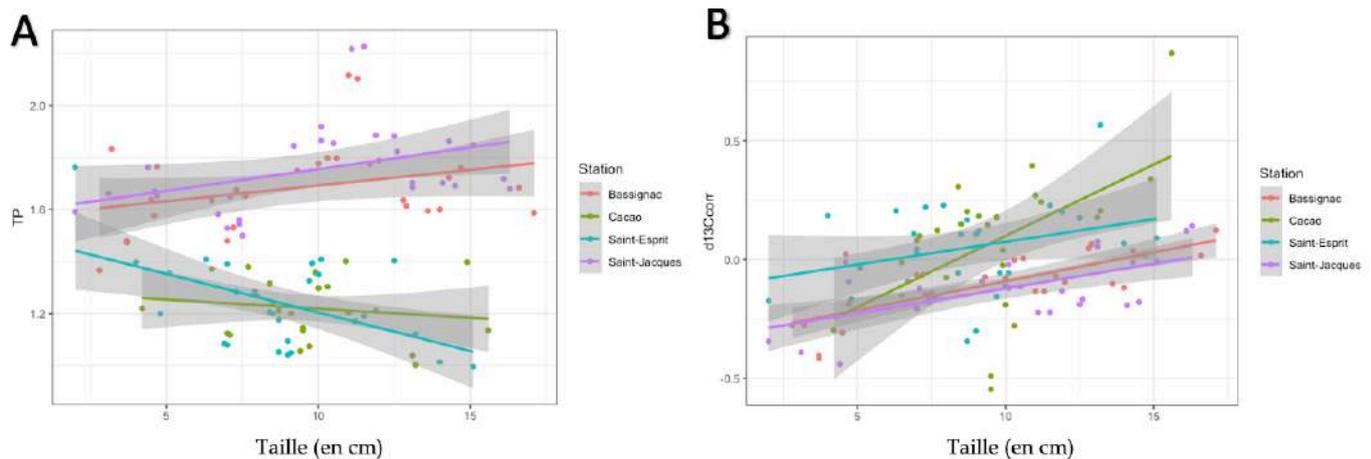


Figure IV.5 : Relation entre la taille des *Cherax quadricarinatus* et (A) la position trophique (TP) et (B) les $\delta^{13}C_{corr}$.

b. Contributions au régime alimentaire

Les calculs des contributions des différentes ressources au régime alimentaire de *C. quadricarinatus* ont mis en évidence, pour toutes les classes de taille, un caractère omnivore et une alimentation dominée par les ressources végétales. En effet, celles-ci représentaient, en cumulé, 68 % du régime alimentaire des individus juvéniles (Cherax I), 67% de celui des individus sub-adultes (Cherax II), 70% pour les adultes (Cherax III) et 74% pour les adultes II (Cherax IV) (Table IV.1). Le biofilm (Cherax I : 34.8 ± 16.5 % ; Cherax II : 33.2 ± 16.1 % ; Cherax III : 35.8 ± 13.9 % ; Cherax IV : 36.4 ± 13.3 %) et la litière végétale (Cherax I : 27.1 ± 14.1 % ; Cherax II : 24 ± 14.2 % ; Cherax III : 28.3 ± 12.4 % ; Cherax IV : 34.1 ± 14 %) étaient les deux ressources d'origine végétale majoritairement assimilés par toutes les classes de taille de *C. quadricarinatus*. Les plus jeunes écrevisses (Cherax I et Cherax II) avaient un régime alimentaire composé, respectivement, à $32.3 (\pm 29.2)$ % et $33.3 (\pm 32.4)$ % de ressources animales (poissons, mollusques et crevettes) (Table IV.1). Ces mêmes ressources contribuaient moins aux écrevisses de grandes tailles (Cherax III et IV). En revanche, ces dernières semblaient avoir des comportements cannibales assez importants, avec une contribution des congénères s'élevant à 17.3 ± 10.8 % pour les Cherax III et 10.6 ± 8.6 % pour les adultes Cherax IV (Table IV.1).

Table IV.1 : Contributions estimées des différents taxons (biofilm, litière, macrophytes, poisson, mollusque, crevette et écrevisse) au régime alimentaire de *Cherax quadricarinatus*. Les résultats sont rapportés sous forme de moyenne, médiane et intervalle de confiance à 97.5 (97.5 IC), pour chaque classe de taille d'écrevisse (Cherax I, II, III et IV).

Station	Ressources alimentaires	Contributions au régime alimentaire											
		Cherax I			Cherax II			Cherax III			Cherax IV		
		Moyenne	Médiane	97.5% IC	Moyenne	Médiane	97.5% IC	Moyenne	Médiane	97.5% IC	Moyenne	Médiane	97.5% IC
Global	Biofilm	0.348	0.338	0.696	0.332	0.306	0.664	0.358	0.344	0.657	0.364	0.355	0.653
	Litière	0.271	0.262	0.562	0.24	0.214	0.559	0.283	0.268	0.56	0.341	0.333	0.636
	Macrophyte	0.058	0.032	0.279	0.096	0.058	0.424	0.057	0.037	0.217	0.031	0.017	0.137
	Poisson	0.117	0.092	0.362	0.109	0.074	0.404	0.042	0.024	0.19	0.039	0.022	0.188
	Mollusque	0.084	0.055	0.355	0.11	0.07	0.419	0.038	0.02	0.194	0.065	0.047	0.227
	Crevette	0.122	0.091	0.388	0.114	0.084	0.387	0.048	0.025	0.219	0.054	0.03	0.235
	Ecrevisse	-	-	-	-	-	-	0.173	0.152	0.444	0.106	0.087	0.319

c. Effets sur la niche trophique des communautés autochtones

Les valeurs moyennes de SEAc mollusques, des crevettes et des poissons différaient entre les zones envahies et les zones non-envahies. Ces valeurs étaient inférieures en zone non-envahies pour les mollusques (4.01 ‰ vs 7.33 ‰ en zones envahies) et pour les crevettes (3.595 ‰ vs 4.55 ‰ en zones envahies). Au contraire, elles augmentaient pour les poissons (3.895 ‰ en zone non-envahies vs 1.732 ‰ en zones envahies) (Figure IV.6).

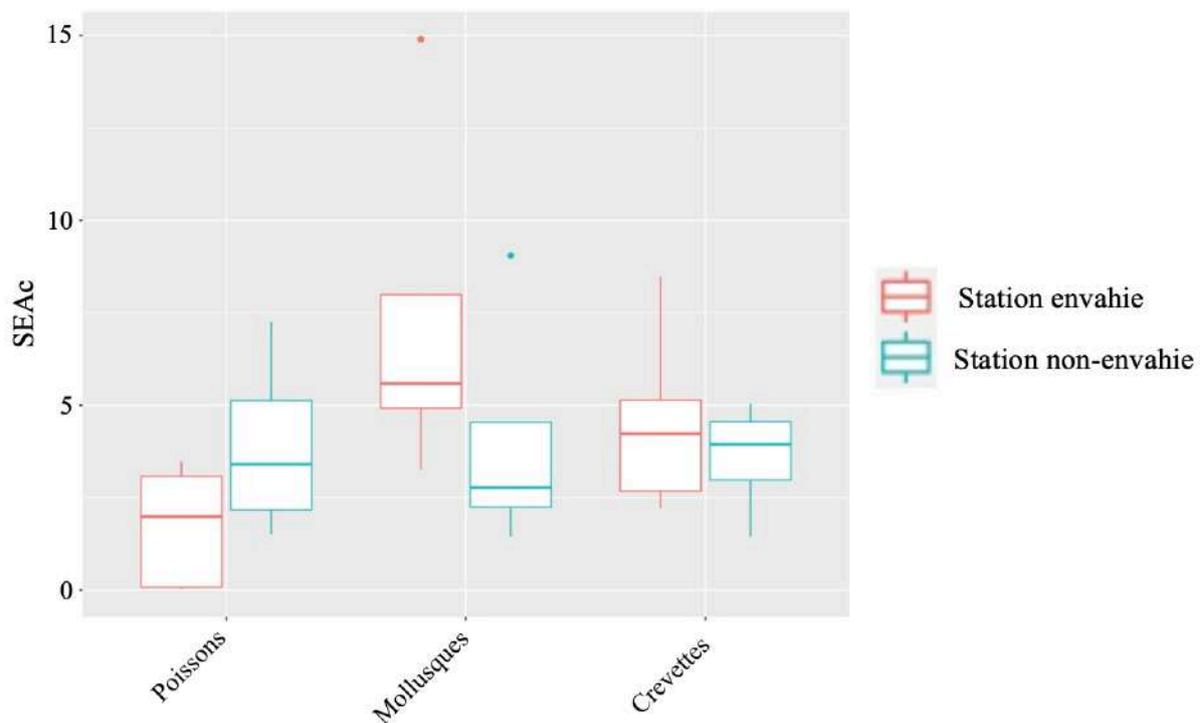


Figure IV.6 : Taille de la niche trophique (ellipses standards corrigées, SEAc) pour les poissons, mollusques et crevettes entre sites envahis (rouge) et non-envahis (bleu).

Il existait un chevauchement de niche écologique entre *C. quadricarinatus* et les crevettes autochtones, pour toutes les classes d'âge de l'écrevisse (Figure IV.7A) et avec toutes les espèces de crevettes (Figure IV.7B).

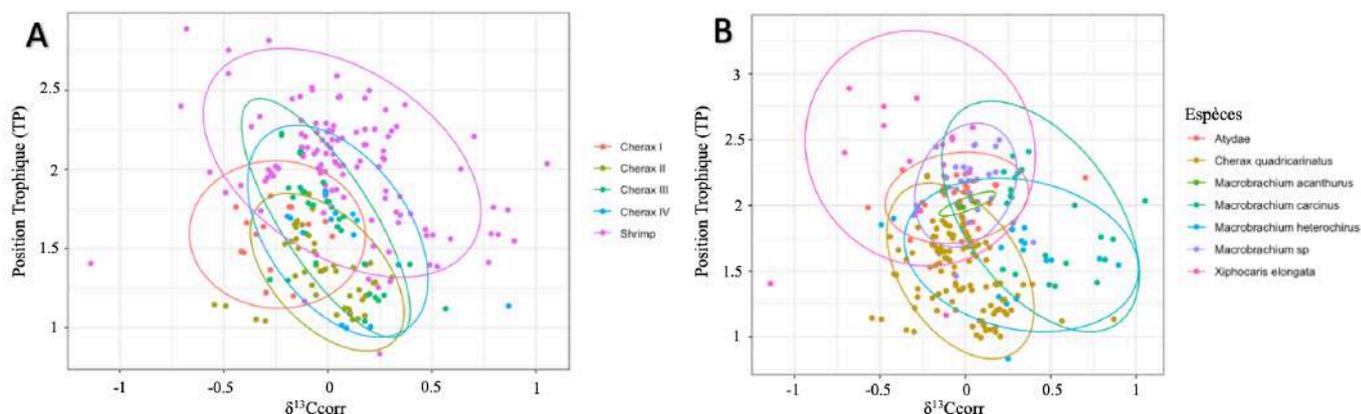


Figure IV.7 : A) Niche trophique de chaque classe d'âge de *Cherax quadricarinatus* (Cherax I, II, III et IV) et des crevettes autochtones (toutes espèces confondues), en rose ; B) Chevauchement de niche trophique de *C. quadricarinatus* et de toutes les espèces de crevettes autochtone.

Une baisse significative de la TP des crevettes (toutes espèces confondues) a été constatée en présence d'écrevisses (sites non-envahis : TPmoyenne = 2.46 ± 0.245 vs sites envahis : TPmoyenne = 2.01 ± 0.36 ; $F = 160.33$; $p\text{-value} < 0.001$) (Figure IV.8). Les *Macrobrachium* juvéniles (sites non-envahis : TPmoyenne = 2.59 ± 0.185 vs sites envahis : TPmoyenne = 2.13 ± 0.23 ; $p\text{-value} < 0.001$) et les *Macrobrachium carolinus* (sites non-envahis : TPmoyenne = 2.55 ± 0.07 vs sites envahis : TPmoyenne = 1.89 ± 0.35 ; $p\text{-value} < 0.001$) (Figure IV.8) étaient les espèces les plus impactées par la présence de l'écrevisse.

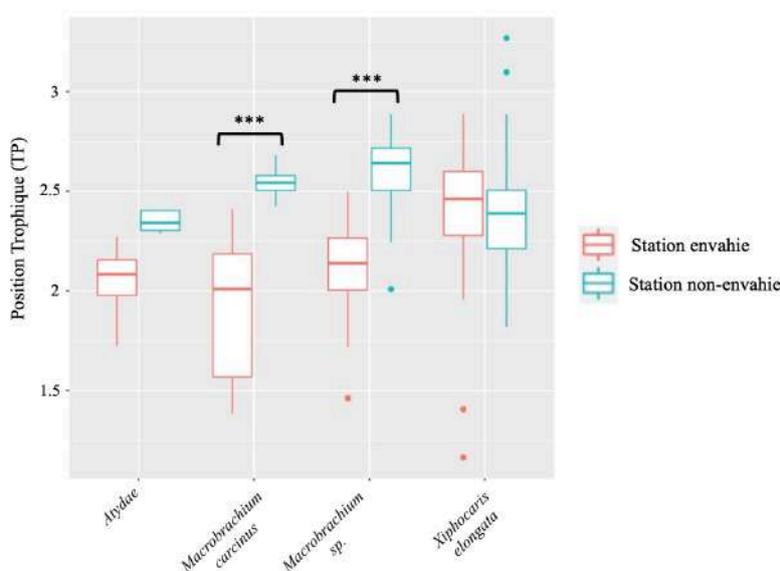


Figure IV.8 : Position trophique (TP) des différentes espèces de crevettes autochtones (*Atyidae*, *Macrobrachium carolinus*, *Xiphocaris elongata* et *Macrobrachium sp* / juvéniles) dans les stations envahies (en rouge) et non-envahies (en bleu).

d. Expérimentations en conditions contrôlées

Les individus adultes (> 12 cm) consommaient plus de 8 mollusques (*M. tuberculata* et *T. granifera*) en 48h, sans différence significative entre les deux espèces de mollusques présentées ($t = -0.864$, $p\text{-value} = 0.398$). Aussi bien pour *M. tuberculata* que pour *T. granifera*, il existait une corrélation positive et significative entre la taille du prédateur (longueur totale) et le nombre de mollusques consommés (*M. tuberculata* : $R^2 = 0.337$, $p\text{-value} < 0.001$; *T. granifera* : $R^2 = 0.271$, $p\text{-value} = 0.018$) (Figure IV.9A). L'effet de la taille de *C. quadricarinatus* sur sa capacité à consommer un grand nombre de mollusques était significative entre classes d'écrevisses ($F = 2.897$; $p\text{-value} = 0.0391$, Figure IV.9B), et il y avait un effet significatif de la taille du mollusque dans l'efficacité de prédation de l'écrevisse ($F = 12.276$; $p\text{-value} < 0.001$).

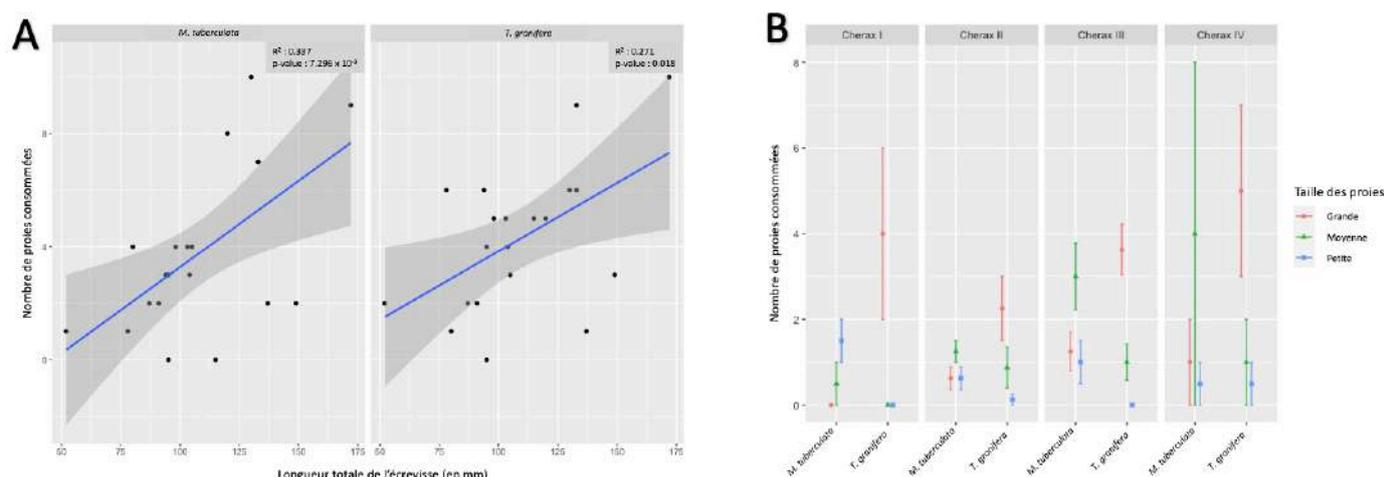


Figure IV.9 : A) Relation entre le nombre de mollusques consommés (à gauche *Melanoides tuberculata* et à droite *Tarebia granifera*) en 48h par écrevisse (*Cherax quadricarinatus*) et leur taille; B) Nombre de proies consommées par les différentes classes de taille de *Cherax quadricarinatus* (Cherax I, II, III et IV), en fonction de l'espèce de mollusque (*M. tuberculata* ou *T. granifera*) et de la taille de la proie (petite < 1 cm, moyenne 1 à 1.5 cm ou grande > 1.5 cm).

IV. Discussion

Cette étude fournit de premiers résultats intéressants sur les impacts de *C. quadricarinatus* en dehors de son aire de répartition naturelle, et plus précisément sur les communautés autochtones de Martinique. L'écrevisse semblait occuper une place plutôt basse dans les réseaux trophiques, avec des changements de niche trophique en fonction de la taille des individus (effet ontogénétique). Ainsi, les modèles de mélange ont permis de mettre en évidence un régime alimentaire omnivore, à tendance herbivore, avec des preuves de cannibalisme pour les individus adultes. La comparaison des structures de niche trophique, entre les zones envahies et les zones non-envahies, a montré un impact significatif sur les niches trophiques des espèces de crevettes autochtones. Enfin, les expérimentations en conditions contrôlées ont mis en évidence un fort impact de *C. quadricarinatus* sur les mollusques, avec une influence positive de la taille du prédateur sur son taux de consommation, confirmant ainsi l'effet ontogénétique observé grâce aux analyses isotopiques.

La TP de *C. quadricarinatus* dans les hydrosystèmes de Martinique variait de 1.22 à 1.75. Cette valeur plutôt basse de TP est à relativiser car elle a été modélisée à partir des facteurs de discrimination (TDFs = 3.4). L'écrevisse occupait donc le second niveau trophique, au même titre que les brouteurs (mollusques) ou les crevettes filtreuses, avec un effet ontogénétique variable selon les stations. Des résultats similaires ont été démontrés par Marufu et al. (2018), remplaçant cette même espèce d'écrevisse envahissante (*C. quadricarinatus*) au second niveau trophique (2.61 - 2.87), dans le lac Kariba, au Zimbabwe. En revanche, ces auteurs n'ont pas observé de différence significative entre les classes de taille. Cette occupation du second niveau trophique a déjà été observée chez l'écrevisse marbrée (*P. virginalis*), envahissante en Slovaquie (Lipták et al., 2019), ou encore l'écrevisse américaine (*F. limosus*), introduite dans les cours d'eau de Roumanie (Pacioglu et al., 2019). Cette TP plutôt basse peut s'expliquer par une consommation dirigée préférentiellement vers des ressources basales (végétales). La TP est aussi influencée par la complexité des réseaux trophiques, notamment la composition (Ruokonen et al., 2013) et la longueur de la chaîne trophique (Post et al., 2000). Or, la Martinique fait partie de ces écosystèmes insulaires

tropicaux, avec des réseaux trophiques peu complexes et des chaînes courtes (Nivet et al., 2010).

Malgré cette TP basse, *C. quadricarinatus* atteint de fortes densités de population dans les rivières où elle a été introduite et cette insertion dans la chaîne trophique doit nécessairement impacter d'une quelconque manière le fonctionnement de l'écosystème. Les modèles de mélange mettaient en évidence un caractère omnivore de *C. quadricarinatus*, avec une tendance à consommer beaucoup de ressources végétales (près de 70% du régime alimentaire), notamment du biofilm et de la litière. Ces résultats ont déjà été démontrés chez les écrevisses en général, et certaines invasives comme l'écrevisse de Louisiane (*P. clarkii*) sont bien connues pour réduire les peuplements de macrophytes (Souty-Grosset et al., 2016). Cette forte activité détritivore, similaire à celles d'autres espèces d'écrevisses invasives (*P. virginialis* (Linzmayer et al., 2020), *P. clarkii* et *P. leniusculus* (Alp et al., 2016)), entraînant une accélération de la décomposition de la litière, peut affecter le fonctionnement de l'écosystème, en modifiant sa productivité. D'autre part, cette augmentation de la concentration de matières en suspension provoque une augmentation de la turbidité et un changement des caractéristiques physico-chimiques de l'eau. Cependant, le régime alimentaire des écrevisses invasives est influencé à la fois par (1) la disponibilité des ressources (Ruokonen et al., 2013) et (2) la densité de population des congénères (Reynolds et al., 2013).

L'écrevisse bleue (*C. quadricarinatus*) a été détectée dans le milieu naturel pour la première fois en 2010 et est donc déjà établie depuis plusieurs années (Baudry et al., 2020). Les stations étudiées ici sont envahies depuis au moins 3 ans (Baudry et al., 2020) et même si l'analyse des isotopes stables permet une identification du régime alimentaire sur le long terme, une ressource disparue depuis plusieurs années, à la suite d'une surexploitation par l'écrevisse, ne pourra vraisemblablement pas être retrouvée. Par exemple, de gros déclin de populations de *Thiaridae* (*M. tuberculata* et *T. granifera*) ont été observés sur le terrain, après 2010 (date de début de l'invasion de *C. quadricarinatus*) (Jarne, Com. Pers.). La corrélation entre ces deux événements n'est pas établie mais il semblerait que les mollusques soient présents en bien plus grande

densité dans les zones non-envahies par l'écrevisse (Jarne, Com. Pers.). Ceci est à corréler avec d'autres études, qui ont mis en évidence la responsabilité des écrevisses exotiques envahissantes dans la disparition d'espèces de mollusques (Montes et al., 1993; Herrmann et al., 2022; voir aussi Souty-Grosset et al., 2016). La densité d'écrevisses envahissantes joue un rôle important dans l'acquisition des ressources végétales : il semblerait qu'une augmentation de leur densité de population entraîne une augmentation de la décomposition de la litière (Reynolds et al., 2013). Sous la pression de compétition, induites par les congénères ou les espèces natives, les écrevisses consomment des matériaux facilement accessibles, même s'ils sont moins nutritifs (Momot, 1995). Ainsi, la TP et l'étendue de la niche trophique des écrevisses sont inversement proportionnelles à leur densité de population (Jackson et al., 2017). En revanche, cette forte densité de population a pour effet d'augmenter les rencontres avec les congénères (et donc les interactions agressives), menant à l'apparition de comportements cannibales (Houghton et al., 2017). Dans notre étude, le cannibalisme représentait en moyenne 14% du régime alimentaire, pour les individus adultes (Cherax III et Cherax IV). Enfin, la contribution des poissons au régime alimentaire de *C. quadricarinatus* semblait faible, avec de rares évènements de consommation de cadavres de Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Observation personnelle).

Même si la nourriture végétale était la ressource préférentielle, pour toutes les classes d'âge de *C. quadricarinatus*, des effets ontogénétiques ont été montrés dans cette étude : les écrevisses juvéniles consommaient deux fois plus de nourriture d'origine animale (poissons, mollusques et crevettes), que leurs congénères adultes. Ces changements ontogénétiques peuvent s'expliquer par des besoins alimentaires plus grands chez les juvéniles, associés à leur croissance (et donc des mues plus régulières). Ceci peut aussi être dû à une plus grande agilité des juvéniles, leur permettant de capturer des proies mobiles plus facilement (Momot, 1995). Au contraire, Jackson et al. (2017) ont mis en évidence une augmentation de la TP (2.49 ± 0.48) avec l'augmentation de la taille des individus (chez l'écrevisse de Louisiane *P. clarkii*), dans des lacs de faible productivité. Cet « effet site » a été retrouvé dans notre étude : deux stations (Bassignac et Saint-Jacques) démontraient une TP de *C. quadricarinatus* positivement corrélée à sa taille et, au contraire, pour deux stations (Cacao et Saint-Esprit), une TP négativement

corrélée à la taille des individus. De telles variabilités entre populations d'une même espèce, en termes d'écologie trophique, ne sont pas rares (Ercoli et al., 2014) et ceci peut s'expliquer par une productivité moindre de ces deux premières stations (Jackson et al. 2017).

Cette arrivée de *C. quadricarinatus* dans la chaîne trophique provoque un accroissement de la compétition pour la ressource alimentaire, ainsi que pour les caches, avec les autres crustacés fonctionnellement très proches, comme les crevettes (Banha and Anastácio, 2011). Ces relations de compétition provoquent une augmentation des comportements de fourragement chez les écrevisses exotiques envahissantes (Momot, 1995), mais aussi une augmentation des comportements agressifs inter-spécifiques (Banha and Anastácio, 2011). Ces auteurs ont mis en évidence le caractère de prédation de *P. clarkii* envers la crevette autochtone *Atyaephyra desmarestii* (Atyidae), au Portugal, observant une forte régression de l'espèce dans les sites où l'écrevisse est présente en forte densité. Cependant, dans notre étude, *C. quadricarinatus* semblait plutôt provoquer un phénomène d'exclusion compétitive : les crevettes autochtones (Atyidae, Xiphocarididae et Palaemonidae) ne contribuaient qu'à environ 11-12% du régime alimentaire des jeunes écrevisses (Cherax I et II) et seulement 5% pour les écrevisses adultes (Cherax III et Cherax IV), mais un fort chevauchement de niche écologique a été mis en évidence. Ceci se traduisait par une baisse significative des TP des espèces de *Macrobrachium*, en présence de *C. quadricarinatus*. En effet, les *Palaemonidae*, auxquels appartiennent les *Macrobrachium*, sont susceptibles d'entrer en compétition avec l'écrevisse : ce sont des espèces omnivores à tendance carnivore, fonctionnellement et morphologiquement très proches, possédant des pinces et atteignant 10 à 15 cm de longueur totale (du rostre au telson) (Lim et al., 2002). Cependant, les écrevisses sont bien connues pour être plus compétitives que les espèces de crevettes natives : Wang et al. (2021) ont observé un fort chevauchement de niche écologique entre *P. clarkii* et *Macrobrachium nipponense*, dans le Yangtze en Chine, avec une supériorité de l'espèce d'écrevisse envahissante. Cette relation de compétition, dominée par *C. quadricarinatus*, provoque donc une exclusion compétitive, qui oblige les crevettes locales à changer leur régime alimentaire et à consommer des proies à un échelon trophique inférieur. Ceci devrait

à termes provoquer localement des déclin de populations locales et des déplacements d'espèces (Rabalais and Magoulick, 2006).

Concernant nos expérimentations de prédation, uniquement deux espèces *T. granifera* et *M. tuberculata* de mollusques étaient proposés. Les résultats ont montré un fort impact de l'écrevisse sur ces communautés d'invertébrés : les individus adultes (> 12 cm) consommaient jusqu'à 10 mollusques (toutes espèces confondues) en 48h. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Monde et al. (2017), démontrant une activité de prédation importante de *C. quadricarinatus* sur les *Thiaridae*, avec près de 6 mollusques consommés par jour et par individu. Comme pour les analyses isotopiques, nos expérimentations ont montré un effet ontogénétique, avec une consommation significativement accrue chez les individus adultes. L'impact des écrevisses sur les mollusques a déjà été montré chez d'autres espèces d'écrevisses exotiques, comme *P. clarkii* (Hofkin et al., 1992; Souty-Grosset et al., 2016) ou *F. immunis* (Herrmann et al., 2022), également dans ces conditions expérimentales, où le contact entre les individus est facilité. Cette même étude de Herrmann et al. (2022) corrélait, sur le terrain, la disparition de sept populations de mollusques (dont plusieurs espèces en danger critique d'extinction) dans des lacs en Allemagne, au cours des sept années suivant l'introduction de l'espèce exotique *F. immunis*. Ces résultats, combinés aux études disponibles dans la littérature, sont de bonnes preuves des impacts de *C. quadricarinatus* sur les communautés de *Thiaridae*. Même si la responsabilité de l'écrevisse dans le déclin des mollusques en milieu naturel en Martinique n'est pas démontrée, cette étude offre de premiers indices importants.

V. Conclusion

Cette étude rapporte les premiers résultats de l'écologie trophique de *C. quadricarinatus* en Martinique. L'écrevisse semble occuper une position trophique plutôt basse, avec un rôle important de consommateur primaire/détritivore. Comme beaucoup d'autres espèces d'écrevisses envahissantes, *C. quadricarinatus* est une espèce avec un comportement alimentaire omnivore, opportuniste et très vorace, traduisant une forte implication dans la niche trophique. Les crevettes locales, ayant

un régime alimentaire et des caractéristiques morphologiques très proches, semblent les plus impactées. Moins compétitives, elles se retrouvent exclues et obligées de se nourrir à des échelons trophiques inférieurs. Cependant, l'invasion est déjà bien avancée et *C. quadricarinatus* pourrait déjà avoir eu des effets néfastes sur les communautés de mollusques et les macrophytes.

A retenir :

- Position trophique de *C. quadricarinatus* plutôt basse (TP < 2)
 - Effet ontogénétique significatif, variable suivant les stations
 - Caractère omnivore à tendance herbivore, avec du cannibalisme observé chez les adultes
 - Fort chevauchement de niche écologique avec les crevettes autochtones, induisant une exclusion compétitive de celles-ci.
 - Grosse consommation de mollusques en condition contrôlée (jusqu'à 8 en 48h)
- ⇒ Forte implication de *C. quadricarinatus* dans la niche trophique, à cause de son caractère omnivore et vorace, ainsi que les fortes densités de population observées
- ⇒ Impact négatif avéré sur les crevettes autochtones
- ⇒ Invasion déjà bien avancée et les déclin populations déjà observés posent question quant aux impacts beaucoup plus profonds de l'écrevisse.

Chapitre 4 - Étude de la bioaccumulation et de la décontamination du chlordécone chez *C. quadricarinatus*.



Introduction du Chapitre 4

Les polluants organiques persistants (POP) sont des molécules chimiques organiques qui peuvent avoir deux origines : volontaire, via la production de produits chimiques tels que les pesticides, les polychlorobiphényles (PCB) et les insecticides, ou involontaire, en particulier lors du processus de combustion des ordures ménagères (dioxines, furanes et hydrocarbures aromatiques polycliniques (HAP)) (Jones and de Voogt, 1999). Ils possèdent bien souvent des propriétés chimiques et physiques qui, une fois relargués dans l'environnement, leur permettent d'y persister pendant de très longues périodes (plusieurs années, voire des siècles) (Wania and Mackay, 1996; Jones and de Voogt, 1999; Alharbi et al., 2018) : on parle de rémanence. Leur mise au point a débuté au cours du 20^{ème} siècle, avec l'essor de la chimie organique, et ont depuis été largement utilisés partout dans le monde (Wania and Mackay, 1996; Jones and de Voogt, 1999). Ceci pose un problème important en santé humaine car ces molécules sont maintenant largement distribuées dans les sols à travers la planète et sont capables de s'accumuler dans les chaînes trophiques, des plantes à l'Homme, par un phénomène de bioaccumulation : plus le niveau trophique est haut, plus la concentration en polluant est forte (Wania and Mackay, 1996; Jones and de Voogt, 1999; Kelly et al., 2007). De nombreuses études se sont focalisées sur la dangerosité de ces produits, aussi bien pour la nature que pour l'Homme, mettant en avant leur responsabilité dans l'apparition des cancers, des dommages sur le système nerveux ou encore des troubles de la reproduction (Alharbi et al., 2018). Ces effets dramatiques sur la santé ont poussé à la signature d'une convention internationale (convention de Stockholm) en 2004, interdisant l'utilisation et la production de certaines de ces substances, jugées très polluantes (Kelly et al., 2007).

Le chlordécone (CLD), est un insecticide qui fait partie de cette famille des POP. Il n'existe pas naturellement et a été produit dès les années 1950 aux Etats-Unis, sous le nom de Kepone® (Epstein, 1978). Il est alors utilisé comme insecticide, à des doses raisonnables, sur le tabac et les arbustes ornementaux contre les fourmis, mais aussi comme larvicide contre les diptères (Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). Malgré quelques controverses concernant sa toxicité (reprotoxicité notamment, chez la souris

(Huber, 1963)), sa production explose dans les années 1960. En parallèle, en Martinique, la banane a pris une place importante dans l'agriculture, que ce soit en termes de surface au sol ou de revenus (Bernoux et al., 2004; Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). Son mode de culture intensif, en monoculture et sans rotation, rend les plantations vulnérables vis-à-vis des maladies et des ravageurs (Bocquené and Franco, 2005). Par exemple, le charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*) engendra d'importantes pertes jusqu'au début des années 1970. Le chlordécone est alors mis à l'essai, en substitution du lindane, autre insecticide organochloré, jugé inefficace (Fintz, 2010). Malgré un refus d'homologation par la Commission des produits toxiques, le ministre de l'Agriculture donne son aval pour son utilisation en 1972. Une exposition très importante des travailleurs à la molécule toxique, à la suite d'un dysfonctionnement de l'usine de production d'Hopewell, en 1975, oblige les Etats-Unis à interdire sa production et son utilisation deux ans plus tard (Cannon et al., 1978). Malgré le lien établi entre la molécule et des troubles neurologiques (tremblements, anxiété ...), la production est relancée à Béziers, en France hexagonale, et est de plus en plus intensive (Fintz, 2010). Le chlordécone fait ainsi son retour dans les Antilles Françaises sous le nom de Curlone® en 1980, après l'ouragan Allen, qui a provoqué l'apparition de charançons du bananier (Fintz, 2010; Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). Malgré les dangers connus de ce produit, il est utilisé jusqu'en 1990 avant d'être interdit en France. Les Antilles Françaises obtinrent néanmoins une dérogation de 3 ans, avec une utilisation plus intense que jamais, en attendant de trouver une alternative à cet insecticide (Cabidoche et al., 2009; Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). Depuis 2009, la production et l'utilisation du chlordécone est interdite dans le monde et inscrite dans la convention de Stockholm (Figure V.1).

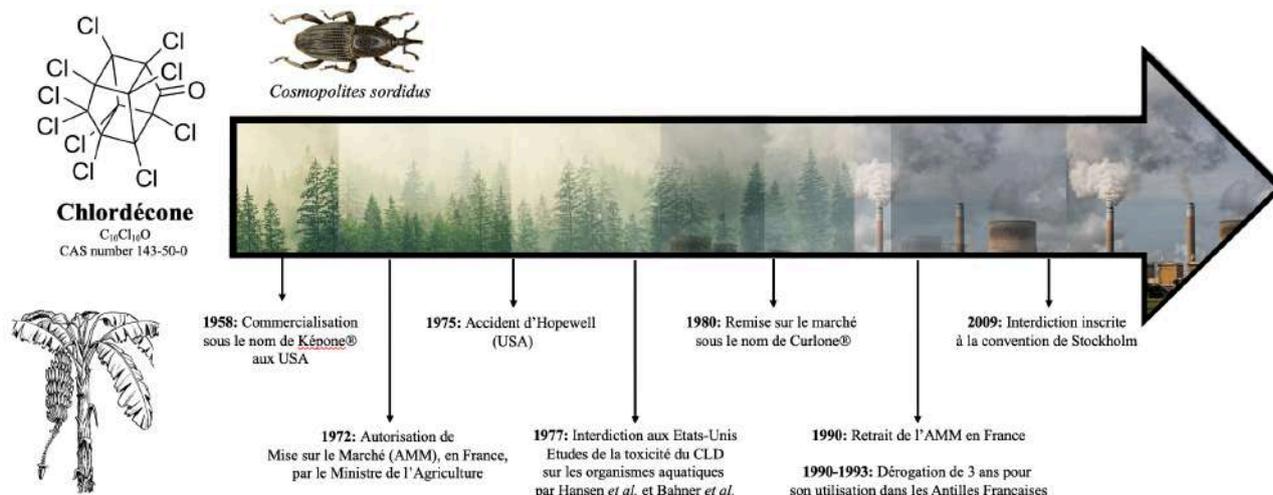


Figure V.1 : Frise chronologique reprenant les différents évènements marquants, liés au chlordécone, depuis sa commercialisation en 1958 jusqu'en 2009, année de son inscription à la convention de Stockholm. La figure reprend également la structure moléculaire du chlordécone, ainsi qu'une photo du charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*), responsables de lourdes pertes dans les bananeraies.

A la suite de l'accident d'Hopewell aux Etats-Unis, de nombreuses études furent menées pour prouver la toxicité du chlordécone, sur différents organismes aquatiques. Bahner et al. (1977) expérimentent la bioconcentration (transfert tout au long de la chaîne alimentaire) et la dépurabilité du chlordécone : pour toutes les doses testées, même infimes, ils constatent une accumulation du chlordécone chez des espèces d'huître (*Crassostrea virginica*), de crustacés (*Mysidopsis bahia* et *Palaemonetes pugio*), de poissons (*Cyprinodon variegatus* et *Leiostomus xanthurus*) et un genre d'algue (*Chlorococcum sp.*). Plus la concentration en chlordécone initiale de l'eau était forte, plus la bioconcentration des espèces animales testées était forte. Après s'être inséré dans la chaîne alimentaire, soit par voie directe (respiration ou adsorption), soit par voie trophique lors des prises alimentaires, le chlordécone peut s'accumuler dans la chaîne trophique par biomagnification : les grands mammifères étant plus contaminés que les poissons, eux-mêmes plus contaminés que les copépodes (Hoekstra et al., 2003). Le chlordécone peut ainsi atteindre l'Homme par consommation de produits contaminés, mais aussi par d'autres voies (e.g. respiration), et pourrait être responsables de dérèglements endocriniens et de cancers (Multigner et al., 2010; Boucher et al., 2013). Ceci pose cependant un gros problème de santé humaine dans les Antilles Françaises, où le chlordécone a été largement utilisé. Sa rémanence dans le milieu est telle que,

même plus de 20 ans après l'arrêt de son utilisation, la molécule reste détectable dans le sol et les cours d'eau, de manière majoritaire par rapport aux autres pesticides (Sources : Office de l'Eau de Martinique) (Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). Des modélisations ont même prédit que la présence du polluant dans ces sols volcaniques perdurerait encore plusieurs siècles (Cabidoche et al., 2009).

Ces découvertes sur la dangerosité du chlordécone ont mené les autorités à prendre des mesures dans les Antilles Françaises. La pêche en rivière est interdite par arrêté préfectoral, une Limite Maximale Résiduelle (LMR) de 20 µg de chlordécone par kg de poids frais dans les aliments (tendant même maintenant vers du « zéro chlordécone ») a été fixée et des études ont été mises en place (dans le cadre des Plans Chlordécone). Celles-ci visent à améliorer les connaissances générales sur ce produit toxique, son transfert entre les organismes, sa dispersion et ses effets toxiques sur les populations. Parmi ces études, le projet MACHLOMA (financement ANR - ANR-10-CESA-014) a été mené en Guadeloupe. Son objectif, en utilisant comme modèle la crevette géante d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* était : (i) d'observer les modalités d'exposition des organismes, en fonction de la biodisponibilité de la chlordécone, (ii) leurs capacités de détoxification/dépuration, et (iii) l'impact de la molécule sur la physiologie des organismes (neurotoxicité et perturbation endocrinienne notamment). Les résultats ont montré que le chlordécone s'accumule facilement et très rapidement dans les organismes (dès les premières heures d'exposition) et se répartit ensuite de manière plus ou moins égales entre les différents organes (muscle, hépatopancréas et cuticule), avec également une possible détoxification de ceux-ci (Lafontaine et al., 2017). Il a été suggéré des activités anti-ecdystéroïde et perturbatrice de la reproduction : le chlordécone semble perturber l'expression de deux molécules clés du processus de mue et donc de croissance (la 20-HE et la chitobiase) (Lafontaine et al., 2016a) mais également l'expression de la vitellogénine, impliquée dans le processus de reproduction (Lafontaine et al., 2016b).

Largement étudiée en Guadeloupe, cette contamination du biote a moins été investiguée en Martinique, mais les contextes hydromorphologiques, écologiques et écotoxicologiques similaires nous laissent penser que les résultats seraient semblables.

Cherax quadricarinatus est présente majoritairement sur des cours d'eau très pollués, pouvant poser ainsi un réel problème de santé humaine pour ceux qui la consomment : malgré l'interdiction de pêche, l'écrevisse, très prisée par les Martiniquais, est capturée en rivière contaminée et se revend au prix fort sur le marché (jusqu'à 25€/kg). Par conséquent, les objectifs de ce chapitre sont (i) d'étudier la présence de chlordécone dans le muscle abdominal (partie consommée par l'homme) de *C. quadricarinatus* collecté dans trois rivières martiniquaises selon un gradient de contamination (biosurveillance), puis (ii) de déterminer la cinétique de la bioconcentration de chlordécone dans le muscle de *C. quadricarinatus* dans des conditions de laboratoire contrôlées pour comprendre le mécanisme de bioconcentration et enfin, (iii) d'étudier une décontamination potentielle de l'écrevisse avant sa consommation, pour évaluer son risque en tant que produit alimentaire et apporter une solution alternative pour diminuer les risques liés à sa consommation. Ces travaux ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans la revue internationale, *Chemosphere*, spécialisée en écotoxicologique.



The invasive crayfish *Cherax quadricarinatus* facing chlordecone in Martinique: Bioaccumulation and depuration study

Thomas Baudry^{a,b,c,d,*}, Eric Gismondi^e, Jean-Pierre Goût^a, Alexandre Arqué^b, Juliette Smith-Ravin^d, Frédéric Grandjean^c

^a DEAL Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, Route de la Pointe de Jaham, BP7212, Schoelcher, 97274, Martinique

^b ODE Office De l'Eau, 7 Avenue Condorcet, Fort-de-France, Martinique

^c Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, 5 Rue Albert Turpin, Poitiers Cedex, France

^d Groupe de Recherche BIOSPHERES, Université des Antilles, Campus de Schoelcher, F.W.I, Martinique

^e University of Liège, Laboratory of Animal Ecology and Ecotoxicology (LEAE) - Freshwater and Oceanic Sciences Unit of ReSearch (FOCUS), Chemistry Institute, Bât. B6C, 11 Allée du 6 Août, B-4000, Sart-Tilman, Belgium

HIGHLIGHTS

- CLD contamination of *Cherax quadricarinatus* wild population.
- Toxicokinetics of CLD in *C. quadricarinatus* in laboratory conditions.
- Positive correlation between CLD concentrations in water and crayfish muscle.
- 20-day decontamination ineffective to achieve MRL in crayfish muscle exposed to 2 µg/L.
- Human health concern for Martinican consumers.

ARTICLE INFO

Handling Editor: Alvine C.Mehinto

Keywords:

Aquatic ecotoxicology
Decapoda
French West Indies
Invasive species
POP

ABSTRACT

The redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, was introduced to Martinique Island for aquaculture purposes at the beginning of the 21st century, in an attempt to revitalize the freshwater crustacean aquaculture sector. Mainly due to its high economical value, it was intentionally released in the wild and was caught and sold by fishermen. Martinican rivers are polluted by chlordecone, considered as one of the worst Persistent Organic Pollutants (POP). Despite its dangerousness, it was used until 1993 in the French West Indies against a banana pest and was always found in the ecosystems. This study aimed to investigate the level of contamination in the muscle of crayfish caught in the wild, as well as the potential of bioconcentration and depuration in the *C. quadricarinatus* muscle. This study could allow us to quantify the risk for consumers but also, to evaluate a depuration process to reduce the risk related to its consumption. Using both *in-vitro* and *in-situ* experiments, results highlighted the importance of the chlordecone concentration in the water and the time of exposure to the pollutant. The bioconcentration seems to be very quick and continuous in crayfish muscle, as chlordecone can be detectable as early as 6 h of exposure, whatever the concentration tested. Finally, it appears that, even after 20 days of depuration in chlordecone-free water, chlordecone concentrations remained higher to the residual maximum limit (i.e. 20 ng/g wet weight), concluding that the decontamination of the muscle seems not very efficient, and the risk for the Martinican people could be serious.

1. Introduction

Worldwide aquaculture development is known to be a pathway for

the introduction of non-native species to new countries (FAO, 2016). It can lead to the transfer of organisms into new ecosystems facilitated by humans especially when sold alive and at a high price. It can result in

* Corresponding author. DEAL Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, Route de la Pointe de Jaham, BP7212, Schoelcher, 97274, Martinique

E-mail address: thmsbaudry@gmail.com (T. Baudry).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131926>

Received 30 April 2021; Received in revised form 22 July 2021; Accepted 16 August 2021

Available online 18 August 2021

0045-6535/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

serious aquatic invasions threatening native aquatic ecosystems (Filipová et al., 2013).

The Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*, is a good example as it was translocated to many territories in tropical and subtropical areas (references in Baudry et al., 2020) for aquaculture, due to its high reproductive capacity and rapid growth (Jones, 1990; Patoka et al., 2014; Azofeifa-Solano et al., 2017). In Martinique, a tense ecological situation led to the closure of many aquaculture facilities raising the shrimps *Macrobrachium rosenbergii*. In fact, most of the soils where this species was produced became contaminated with chlordecone (CLD). Only one farm was able to survive by exporting its activity to a smaller site, making the production of *M. rosenbergii* unprofitable and forcing the farmer to find an alternative (Baudry et al., 2020). *Cherax quadricarinatus* was finally introduced to the island in the early 2000s, from Cuba, in order to reinvigorate this sector (Baudry et al., 2020). Following intentional releases, crayfish were found in the natural environment and, thanks to their high dispersal capacity and its high tolerance of environmental quality, were able to colonize a large part of the island's river systems (Baudry et al., 2021).

In the international toxicological context, several studies have shown that invasive species have a higher absorption potential than native ones, particularly in the presence of abiotic stressors (Fedorenkova et al., 2013; Pedro et al., 2017). For example, Pedro et al. (2017) show a higher concentration of POPs in non-native fish species capelin and sandlance (*Mallotus villotus* and *Ammodytes* spp.) than in the native Arctic cod (*Boreogadus saida*). Weir and Salice (2012) show the higher resistance of

the snail species *Melanoides tuberculatus* to malathion compared to the native *Biomphalaria glabrata*. In bryozoans, large drops in biomass, often with no recovery, are observed in native species exposed to heavy metals, whereas in non-native species, an increase in biomass is sometimes even observed (Crooks et al., 2011).

French West Indies soils and rivers are contaminated by chlordecone (CLD) ($C_{10}Cl_{10}O$; CAS number 143-50-0) (Coat et al., 2006; Lafontaine et al., 2017b), considered to be the worst Persistent Organic Pollutant (POP) for these areas. It was widely used to eliminate the banana weevil (*Cosmopolites sordidus*), considered the most important banana crop pest (Serge, 1994; Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). The hazards of this pollutant are known and led to a refusal to register it by the Toxics Commission and the ban of its use in 1977 by the United States (Cannon et al., 1978). Indeed, chlordecone is well known to be an endocrine disruptor and could also be responsible for other diseases such as prostate cancer, for example (Multigner et al., 2007, 2010). In France, CLD was only prohibited in 1990 and the French West Indies obtained a 3-year derogation, until 1993, waiting to find an alternative to this pesticide (Cabidoche et al., 2009; Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012).

Like most pesticides, CLD can be bioaccumulated along trophic chains (Bahner et al., 1977; Hansen et al., 1977). This is rather worrying given that aquatic ecosystems are well known to be the final receptacle of these toxic molecules through soil leaching and/or erosion processes (Snegaroff, 1977; Coat et al., 2006; Cabidoche and Lesueur-Jannoyer, 2012). Because of its very high persistence in soils, CLD is still present

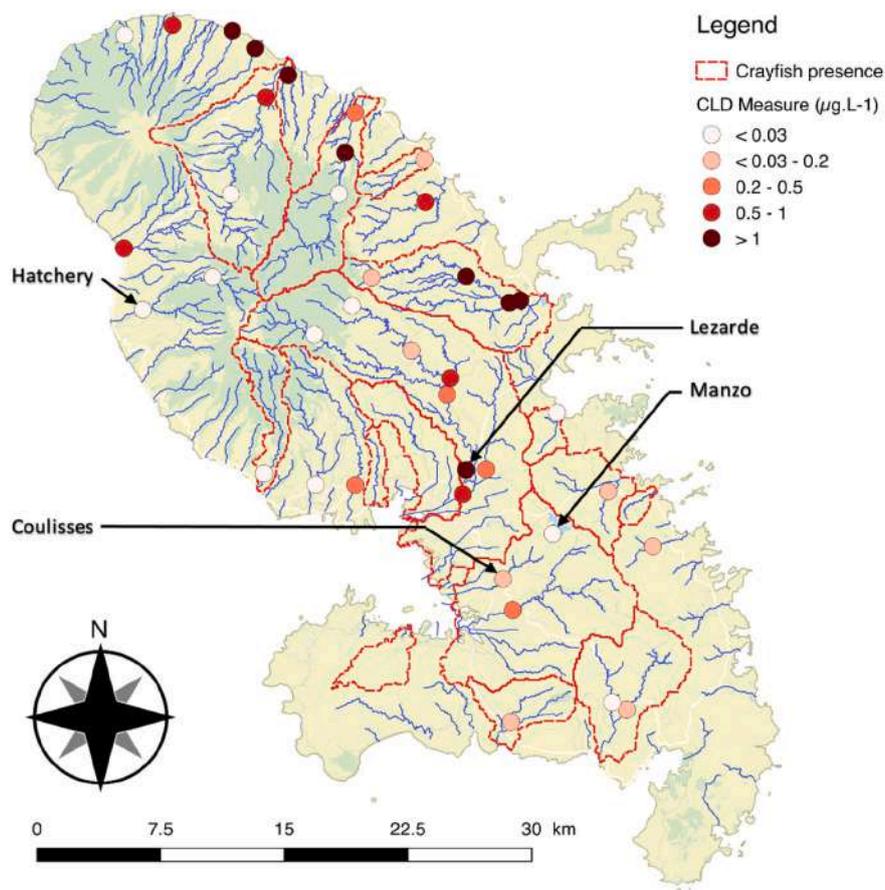


Fig. 1. Map showing the presence of *Cherax quadricarinatus* in Martinique and the stations where the chlordecone concentration in water is known. Colored points correspond to these stations, darker points indicate more polluted stations. Invaded watersheds by *Cherax quadricarinatus* are highlighted by red dotted lines, from data in Baudry et al. (2021). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

today in soils and rivers of Martinique (Merlin et al., 2016) and also in biota. Indeed, several studies highlighted a positive correlation between CLD concentrations in the water and CLD concentrations measured in organisms (Hansen et al., 1977) with potentially very high bioconcentration factors (Bahner et al., 1977). This highlights the dangerousness of the situation in Martinique given that *C. quadricarinatus*, having a preference for slow-moving waters, often located downstream and therefore receiving a large dose of pollutants, is highly likely to accumulate substantial doses of CLD. Highly appreciated by local fishermen, *C. quadricarinatus* is fished in the wild and resold at high prices on the markets or to restaurants, but this could raise a major human health problem in the population, given the high doses of chlordecone found in the water at some sites, especially in the North of Martinique (Fig. 1). CLD concentrations in Martinican rivers can be very variable (Fig. 1). Fig. 1 exposed the variability in terms of CLD concentration in the water. This variability can be explained, for example, by different CLD amount used in the past by each banana plantation owner, known to be largely located in the North. This observation could also be due to the type of soil which plays a role in the CLD retention and depending on the location of the different plantations, from north to south, the soil composition is not the same. Indeed, Cabidoche et al. (2009) modeled the persistence of chlordecone in different type of soil and highlighted that CLD is more persistent in andosol than nitisol. Finally, CLD concentrations measured in rivers are also dependent to the rainfall, responsible for soil leaching, and the North of the island is known to be more exposed to the rainfalls. As the problem is destined to persist over time, given that CLD has a very long persistence in the environment, the French health authorities have set a Maximum Residual Limit (MRL), above which products are considered consumable, which is at 20 ng g⁻¹ wet weight.

Therefore, the aims of this study were to (i) investigate the presence of CLD in the abdominal muscle (part consumed by humans) of *C. quadricarinatus* collected from three Martinican rivers according to a contamination gradient (biomonitoring), then (ii) determine the kinetics of bioconcentration of CLD in *C. quadricarinatus* muscle under controlled laboratory conditions to understand the bioconcentration mechanism and finally, (iii) investigate a potential decontamination of the crayfish before its consumption, to assess its risk as a food product.

2. Material and method

2.1. Is CLD bioaccumulated in wild crayfish?

Three sites, known to be contaminated by chlordecone, and a control site (uncontaminated) were selected to investigate the potential of *C. quadricarinatus* to accumulate CLD.

The four sites were selected according to a CLD-gradient of contamination, representing the main CLD concentrations measured in Martinique rivers where crayfish populations were observed (Baudry et al., 2021). These four sites were: a non-contaminated site, corresponding to the hatchery (CLD concentration in the water < limit of detection (LOD)), a low contaminated site “Manzo” (below quantification limit 0.03 µg.L⁻¹), an intermediate station on the Coulisses stream (annual mean 0.45 µg.L⁻¹) and a highly contaminated station, on the Lezarde river (annual mean 2.48 µg.L⁻¹). At each sampling site, five male crayfish were collected, between 10 and 14 cm (i.e. adult stage), weighed and measured. Only males were analyzed to avoid possible bias in analysis due to the reproductive cycle in females (Lafontaine et al., 2017b). After sampling, abdominal muscle was dissected in laboratory, weighed and stored at -20 °C until analysis.

2.2. What are the CLD bioconcentration and depuration kinetics in crayfish in laboratory conditions?

2.2.1. Kinetics of bioconcentration

A total of 180 crayfish males were provided by a hatchery in Carbet

(Martinique), a CLD-free area, according to results of ‘Office de l’Eau de Martinique’ (ODE). They were all between 10 and 14 cm body length and between 15 and 59 g (the most common size range in the Martinique rivers, *Personal observation*) and were transferred to the laboratory of IFREMER, Le Robert, Martinique. As for *in-situ* experiments, only males were used, to avoid bias due to reproduction cycle in females.

Thirty 20 L aquaria were filled with CLD-free water. Crayfishes were acclimated, for seven days before experiments, under constant oxygenation aeration and a natural light/dark photoperiod. Water temperature and pH were maintained at 27 °C ± 0.11 and 7.72 ± 0.28 corresponding to optimal values for *C. quadricarinatus* development (de Moor, 2002; Tropea et al., 2010). Crayfish were fed daily with pieces of carrot.

Exposure was carried out using two chlordecone conditions: 0.2 µg.L⁻¹, 2 µg.L⁻¹, chosen for their environmental relevance in rivers of Martinique, and a control (containing 0.01% acetone, corresponding to the use of prepared stock solutions of CLD in acetone). Intermediate solutions were prepared with two successive dilutions from CLD (GC purity area ≥98%; Sigma-Aldrich, USA): first, a 1 g.L⁻¹ CLD stock solution was prepared with 100% acetone and then, a 10 mg.L⁻¹ CLD solution was prepared with water (therefore containing 1% acetone), used in exposure media preparation. The real CLD concentrations of exposure were measured at the Laboratoire Territorial d’Analyse (LTA) of Martinique (Table 1).

Ten aquaria per condition were used (six individuals per aquarium). As for the acclimation period, crayfishes were fed daily with pieces of carrot, small enough (around 0.125 cm³) to be eaten quickly and avoid a possible adsorption of pollutant. According to Lafontaine et al. (2017b), to keep a constant CLD concentration in water during all the experiments, it is necessary to perform a 7-day period to saturate the aquariums’ walls before exposure, and renew the exposure medium every 96 h.

To analyze the CLD concentration in *C. quadricarinatus*, five individuals per condition were randomly sampled in aquariums after six exposure times: 6 h, 1 day, 2 d, 6 d, 12 d and 20 d. The abdominal muscle was dissected, weighed and conserved at -20 °C until analysis.

2.2.2. Kinetics of depuration

At the end of the bioconcentration experiment (i.e. 20 days), the remaining individuals (from 0.2 to 2 µg.L⁻¹ exposure) were rinsed thoroughly with CLD-free water (to avoid possible traces of CLD adsorbed on the cuticle) and transferred to different aquaria filled with CLD-free water, to analyze a possible decontamination. Experimental conditions in terms of feeding, photoperiod and physico-chemical values were the same as for the bioconcentration kinetics experiment. Moreover, to avoid a possible recontamination of individuals, water was renewed every 3 days. Five crayfishes per condition were collected after 1, 2, 8 and 20 days of depuration. The abdominal muscle was dissected, weighed and stored at -20 °C until CLD analysis. Only for aquaria where crayfish initially exposed to 2 µg.L⁻¹ of CLD were placed, the CLD concentration was measured at day 1 and day 3 to quantify a possible CLD release in the depuration water (Table 1).

Table 1

Comparison of nominal values of the different treatments run during the experiments with the mean measured values, performed by the Laboratoire Territorial d’Analyses de Martinique. One water sampling per aquarium, in 3 different aquaria (3 replicates) per condition was done.

Treatment	Nominal value (µg.L ⁻¹)	Mean value (µg.L ⁻¹) ± Standard deviation
Control	0	<0.01 ^a
C1	0.2	0.23 ± 0.03
C2	2	2.75 ± 0.21
1 day-depuration	-	0.02 ± 0.003
3 day-depuration	-	0.06 ± 0.02

^a 0.01 µg.L⁻¹ representing the Limit of Detection of chlordecone.

2.3. Chlordane concentration analysis

CLD concentration in *C. quadricarinatus* muscles was analyzed according to the protocol detailed in Lafontaine et al. (2017a). Briefly, muscles were freeze-dried and an average of 250 mg of lyophilized samples were used to CLD extraction, which was performed in Accelerated Solvent Extraction (ASE) with a mixture of *n*-hexane:dichloromethane (90:10; v:v; Biosolve-Chimie, France). After fat fraction extraction, samples were evaporated, resuspended in 2 mL hexane, and purified with a volume of 2 mL 98% sulfuric acid, used to remove organic matter. Then, a 3-min centrifugation at 3000 rpm allowed recovery of the organic layer, which was evaporated under gentle nitrogen flow. Finally, the extract was resuspended with 50 μ L *n*-hexane and 50 μ L of a solution PCB 209 (100 pg/ μ L in *n*-hexane) as an injection internal injection standard.

A procedural blank and a Quality Control were analyzed alongside the samples. The procedural blank consisted of ASE extraction without biological matrix, while the Quality Control consisted of ASE extraction with biological matrix (i.e. *Cherax quadricarinatus* muscle, CLD-free) spiked with CLD solution to obtain a final concentration of 2.5 ng g⁻¹ wet weight.

CLD concentrations were analyzed in GC-ECD (Thermo Scientific, USA) using the parameters described in Lafontaine et al. (2017a). The limit of detection (LOD) was fixed at 0.02 ng/g wet weight (i.e. three times the background noise of chromatogram) and the limit of quantification was 0.06 ng/g wet weight. All CLD concentrations were expressed as ng.g⁻¹ wet weight.

2.4. CLD uptake and depuration rate constants

The toxicokinetic model was done according to the OECD 305 Fish Bioconcentration Guidelines (OECD, Test No. 305), with some adaptations because our experimental design does not allow consideration of the fecal and gill elimination constants. Thus, to estimate the uptake rate constant (k_1) and the depuration rate constant (k_2), we assumed that CLD bioconcentration followed a first order kinetics. With this hypothesis, a linear model was obtained, and the depuration rate constant (k_2) correspond to the slope of equation (1):

$$\ln(\text{CLD}_{Cq}) = -k_2 \cdot t + c \quad (1)$$

with $\ln(\text{CLD}_{Cq})$ the natural logarithm of the CLD amount in *C. quadricarinatus* muscle (ng), k_2 the depuration rate constant and c the intercept, corresponding to the natural logarithm of the CLD concentration in *C. quadricarinatus* muscle (ng.g⁻¹) at the end of the accumulation phase (i.e. start of the depuration phase). As the experiment time was relatively short (40 days in total), we considered no growth variation, and therefore the depuration rate constant was not corrected for organism growth. The uptake rate constant (k_1) can be estimated from k_2 with this equation (2):

$$C_{Cq} = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t}) \quad (2)$$

with C_{Cq} the concentration of CLD in the organism (ng.g⁻¹), C_w the concentration of CLD in the exposure medium (μ g.L⁻¹) and t the time in days.

Finally, the bioconcentration factor (BCF) can be estimated using equation (3):

$$\text{BCF} = \frac{k_1}{k_2} \quad (3)$$

Finally, the depuration rate constant (k_2) was used to determine the time of depuration phase necessary to reach (or be) under the MRL (i.e. 20 ng g⁻¹) in the muscle of *C. quadricarinatus*. For that, estimation was performed with equation (4):

$$C_{Cq} = C_{Cq0} \cdot e^{-k_2 \cdot t} \quad (4)$$

where C_{Cq} equals 20 ng g⁻¹ and C_{Cq0} corresponding to the mean CLD concentration in the muscle tissue at the end of the bioconcentration phase (i.e. 15.91 \pm 7.44 ng g⁻¹ for the C1 treatment and 91.19 \pm 20.73 ng g⁻¹ for the C2 treatment). Similarly, half-life of CLD in the muscle tissue was calculated, for each condition using equation (5):

$$T_{1/2} = \ln(2)/k_2 \quad (5)$$

with $T_{1/2}$ corresponding to the half-life of CLD and k_2 the depuration rate constant.

From equation (4) and using k_2 of each exposure conditions, theoretical values of CLD concentration at each sampling time of depuration can be calculated. For that, C_{Cq0} correspond to the mean CLD concentration measured in the crayfish muscle at the end of the accumulation phase (91.19 ng g⁻¹ for 2 μ g/L exposure and 15.91 ng g⁻¹ for 0.2 μ g/L exposure), k_2 to the depuration rate constant for each condition (0.007 for 0.2 μ g/L exposure and 0.03 for 2 μ g/L) and t to each sampling time, during the depuration experiment. Thus, these theoretical values can be compared with the measured ones.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were all performed using RStudio v1.1.463 (Core Team R Development, 2019). Normality and homogeneity of variance were tested with Shapiro and Bartlett tests ($p > 0.05$). The effect of the exposure time and CLD concentrations of exposure on the concentration measured in *C. quadricarinatus* muscle were analyzed with a two-way ANOVA, with a significant probability less than 0.05. Kruskal-Wallis test was performed on k_1 values, for each treatment, between each exposure time, to visualize a possible significative influence of the exposure time on the uptake rate constant. The same tests were used on the CLD concentration, to highlight the presence of different statistical groups between each treatment, at each exposure time. After that, each group were compared using a posthoc Kruskal test (Dunn's-test). A Generalized Linear Model (GLM) was used to investigate the correlation between the CLD concentration in the water (*in-situ*) and the CLD concentration in the crayfish tissues but also the influence of biotic parameters (body length and total weight) on the CLD bioconcentration in muscle. Student t-test and an Analyze of Variance were utilized to test respectively the difference of BCF between in lab-conditions and *in-situ* conditions.

3. Results

3.1. CLD accumulation in crayfish wild population

A significant positive correlation was observed between the CLD concentration in water and the CLD concentration accumulated in *C. quadricarinatus* muscle of wild populations ($R^2 = 0.64$; p -value < 0.001) (Fig. 2).

In the hatchery, where no CLD concentration was measured (i.e. below the LOD), the CLD concentration in the *C. quadricarinatus* muscle reached 0.13 \pm 0.12 ng g⁻¹ while, at the most CLD-polluted station (i.e. Lezarde, with 2.48 μ g.L⁻¹ of CLD concentration all year round), the CLD concentration in the organism muscles reached 74.9 \pm 51.01 ng g⁻¹ (with a bioconcentration factor of 30.21 \pm 20.58). At the intermediate stations, Manzo (below quantification limit 0.03 μ g.L⁻¹) and Coulisses (mean 0.45 μ g.L⁻¹ all year round), the CLD concentrations measured in *C. quadricarinatus* muscles were 0.65 \pm 0.62 ng g⁻¹ (21.52 \pm 20.71 of bioconcentration factor) and 9.82 \pm 11.65 ng g⁻¹ (22 \pm 26.12 of bioconcentration factor), respectively (Table 2; Fig. 2). No significant difference was observed between the BCF estimated for each of the three contaminated stations ($F = 0.4$; p -value = 0.54).

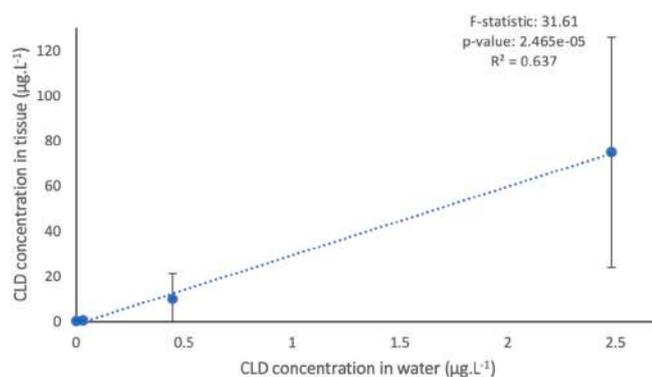


Fig. 2. Changes in CLD concentration ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) in the *Cherax quadricarinatus* muscle (captured in the wild) depending on CLD concentration measured in the river water ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.2. Short term exposure (lab experiment)

3.2.1. Kinetics of bioconcentration

The real CLD concentrations, measured in the exposure medium, were close to the nominal values: $0.23 \pm 0.03 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ against $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $2.75 \pm 0.21 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ against $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Table 1). As expected, no CLD was detected in the control condition.

The CLD concentration bioaccumulated in *C. quadricarinatus* muscle was significantly influenced by both time of exposure and CLD concentration of exposure (Table 3) but not by body length of crayfish (R^2 : 0.007, p-value: 0.75) nor by crayfish weight (R^2 : -0.007, p-value: 0.84) (Fig. 3). At the end of exposure (20 days), the mean CLD concentrations measured were $15.91 \pm 7.44 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ for $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ condition and $91.19 \pm 20.73 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ for $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ treatment (Fig. 4). The CLD concentration in muscle of the crayfish control group reached $1.47 \pm 1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (Fig. 4). Results highlighted also that CLD concentrations measured in muscle were over the LOD and LOQ from 6 h of exposure, regardless the exposure condition (Fig. 4).

Values of k_1 (uptake rate constant) were calculated at each sampling time for both exposure conditions (Fig. 5). For the $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ treatment, the maximal k_1 value ($10.27 \pm 2.93 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) was observed after 6 h of CLD exposure, then it decreased to reach a plateau around $3 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ until the end of the exposure (Fig. 5). For the $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ treatment, the same trend was observed, except that the maximal k_1 value ($3.29 \pm 0.38 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) was estimated for the 6th day of exposure (Fig. 5).

BCF values, at the end of the absorption phase, showed that individuals exposed to the lowest CLD concentration (i.e. $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) had the highest bioconcentration factor: 560.3 ± 464.3 and 67.4 ± 29.9 for the $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ treatments, respectively (Table 2) highlighting a significant difference between the two conditions ($t = 2.59$, p-value = 0.04).

3.2.2. Depuration

Depuration rate constants (k_2) reached respectively 0.007 days^{-1} (for $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ condition) and 0.03 days^{-1} (for $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ condition).

After 20 days of depuration, a very low decrease of CLD

concentration in muscle was observed for crayfish exposed at $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: the CLD concentration reached $10.8 \pm 6.26 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, corresponding to a 32.12% loss (CLD concentration at the end of bioconcentration period was $15.91 \pm 7.44 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) (Fig. 4). This maximum time of depuration tested seemed to reduce the CLD concentration in muscle, even though it was already below the MRL at the end of the exposure time.

For *C. quadricarinatus* exposed to $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, no decrease in CLD concentration was observed during the six first days. Then, a slow decrease

Table 3

Two-way Analysis of Variance (ANOVA) investigating the effects of exposure time to CLD (Time) and the CLD concentration of exposure (Medium) on the CLD concentration bioaccumulated in *Cherax quadricarinatus* muscle.

Source of variation	Sum of square	d.f.	F	p-Values
Time	20472	5	31.88	<0.001
Medium	10319	1	80.36	<0.001
Time x Medium	10550	5	16.43	<0.001
Residuals	5650	44		

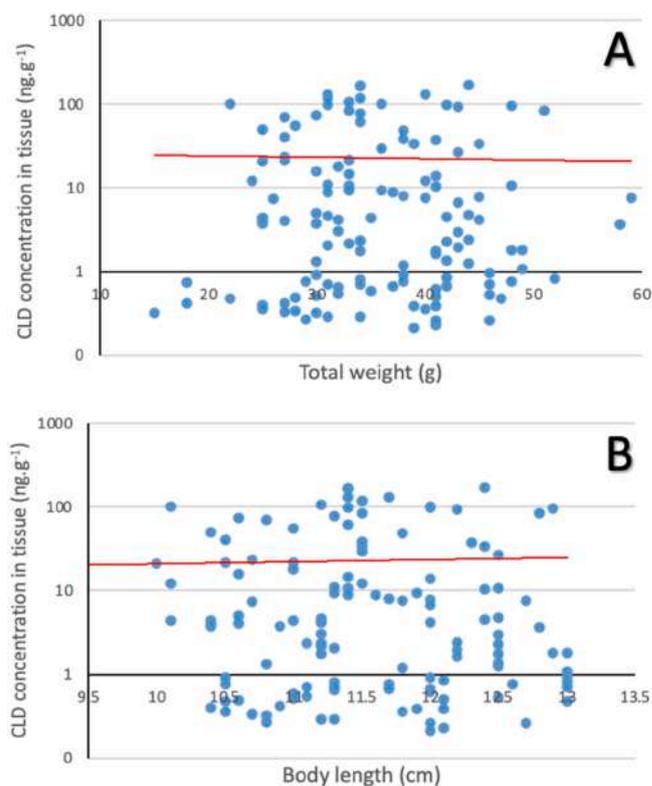


Fig. 3. Influence of total weight (A) and total body length (B) of the crayfish on CLD concentration measured in the muscle of *Cherax quadricarinatus*, using a Generalized Linear Model (GLM). Neither of the two parameters seems to be significant (respectively for A: R^2 : -0.007, p-value: 0.84 and B: R^2 : 0.007, p-value: 0.75).

Table 2

Bioconcentration factor ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$) of chlordecone for *in lab* experiments and for *in situ* conditions, calculated at the end of the 20 days-experiment for the lab conditions (i.e. $0.23 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $2.75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and from individuals (five per site) caught in the four reference stations in the wild (i.e. Long-term exposure experiment: Hatchery, Manzo, Coulisses and Lezarde). Letters in the statistical analysis represent the significant difference between each condition (Student t-test for *in-lab* experiments: $t = 2.59$, p-value = 0.04; and ANOVA for *in situ* experiments: $F = 0.4$; p-value = 0.54).

	In lab		In situ			
	$0.23 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$2.75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Hatchery	Manzo	Coulisses	Lezarde
Measured CLD concentration	$0.23 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$2.75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	< LOD	$<0.03 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.45 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$2.48 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
BCF	560.3 ± 464.3^A	67.4 ± 29.9^B	-	21.52 ± 20.71^A	22 ± 26.12^A	30.21 ± 20.58^A

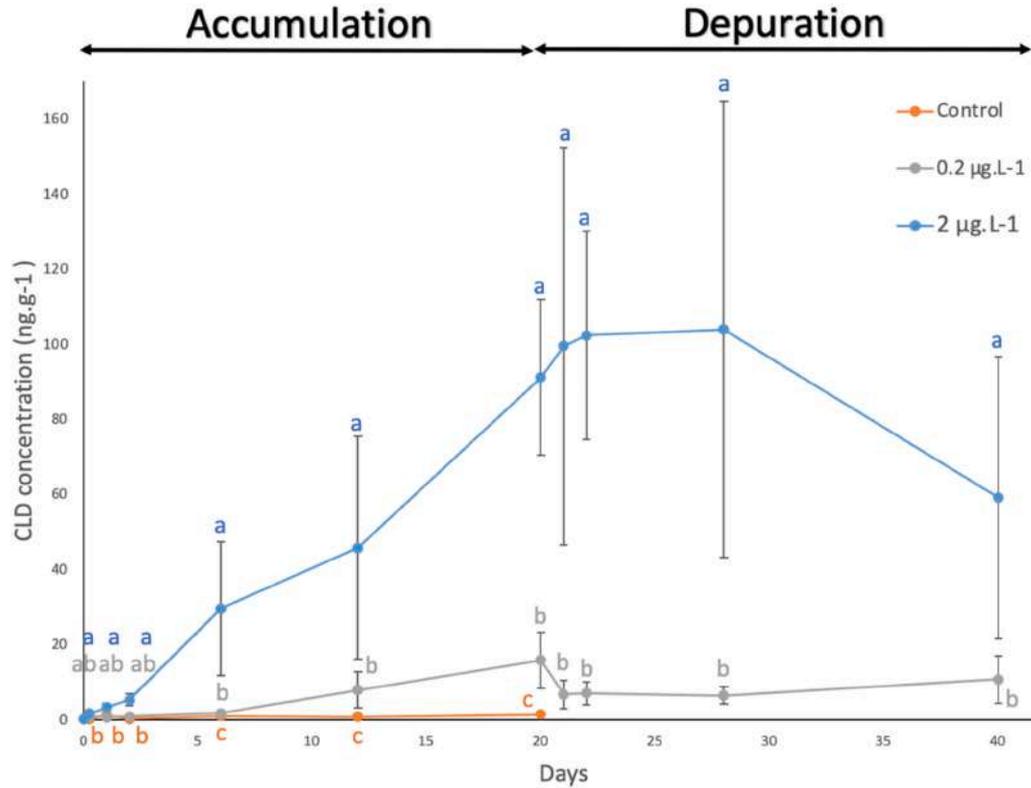


Fig. 4. Accumulation and depuration phases of CLD in the *Cherax quadricarinatus* muscle for the two exposure conditions tested (0.2 µg.L⁻¹ chlordecone exposition condition in orange and 2 µg.L⁻¹ in grey). Depuration was done by placing crayfish in CLD-free water during 20 days with a renewal of the water every 3 days. Letters represent the statistical differences between each condition at each time, following Kruskal-Wallis and posthoc tests. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

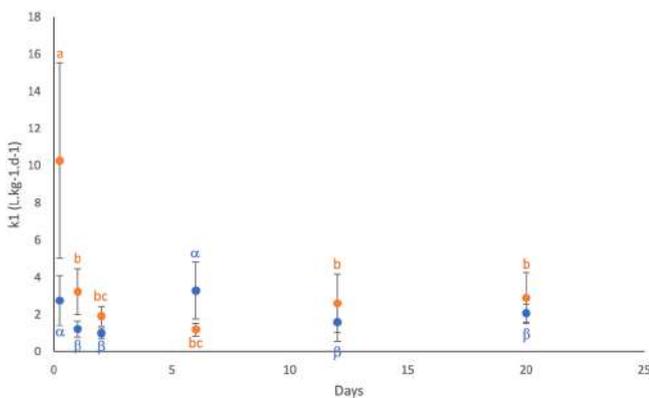


Fig. 5. Variation of the constant accumulation rate (k_1) for *Cherax quadricarinatus*, calculated from the constant elimination rate k_2 , over time, for the 0.2 µg.L⁻¹ CLD exposition condition (orange dot) and the 2 µg.L⁻¹ chlordecone exposition condition (blue dot). Letters represents the different statistical groups between each exposure time, for each condition. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

was measured and CLD concentration reached $59.18 \pm 37.47 \text{ ng g}^{-1}$ at the end of the decontamination period, corresponding to a 35.1% loss (CLD concentration at the end of the bioconcentration period was $91.19 \pm 20.73 \text{ ng g}^{-1}$) (Fig. 4). This CLD concentration at the end of the depuration phase was always higher than the MRL, however, according to calculations from uptake and elimination constants, 50.57 days seems necessary to reach the MRL (20 ng g⁻¹) in muscle of crayfish exposed for

20 days at 2 µg.L⁻¹.

The half-life of CLD in the muscle tissue is 99 days for the 0.2 µg.L⁻¹ condition and 23.1 days for the 2 µg.L⁻¹ condition.

For the 0.2 µg.L⁻¹ of CLD exposure condition, the mean measured values of CLD in the crayfish muscle are below the theoretical values at each depuration time, with an increase of the CLD concentration at Day 20 (6.8 ng g⁻¹ at Day 1 and 10.1 ng g⁻¹ at Day 20 for the measured values vs 15.8 ng g⁻¹ at Day 1 and 13.8 ng g⁻¹ at Day 20) (Table 4).

For the 2 µg.L⁻¹ of CLD exposure condition, the mean measured values raise until day 8 (82.9 ng g⁻¹ at Day 1–103.9 ng g⁻¹ at Day 8) and are above the theoretical values for the Day 2 and Day 8 of depuration. After that the mean CLD measured values decrease until Day 20 and reach 59.8 ng g⁻¹, close to the theoretical value calculated (50.1 ng g⁻¹) (Table 4).

Finally, the CLD concentration measurements in water, after 1 and 3

Table 4

Comparison of theoretical values of CLD concentration in crayfish muscle at each sampling time during the depuration experiment, for each condition, based on calculations with equation (4) and the respective k_2 values, with the measured values.

	0.2 µg.L ⁻¹ of CLD exposure condition		2 µg.L ⁻¹ of CLD exposure condition	
	Theoretical values (ng.g ⁻¹)	Measured values (ng.g ⁻¹)	Theoretical values (ng.g ⁻¹)	Measured values (ng.g ⁻¹)
Day 1	15.8	6.8	88.5	82.9
Day 2	15.7	7.1	85.9	102.4
Day 8	15	6.5	71.7	103.9
Day 20	13.8	10.1	50.1	59.2

days of depuration (for crayfish initially exposed to $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ of CLD), revealed an increase of CLD in the water over time: $0.02 \pm 0.003 \mu\text{g.L}^{-1}$ at Day 1 and $0.06 \pm 0.02 \mu\text{g.L}^{-1}$ at Day 3 (Table 1).

4. Discussion

4.1. CLD in wild crayfish populations

The CLD concentration analysis in muscle of *C. quadricarinatus* wild population highlighted a significant positive correlation between the CLD concentration in river water and the CLD concentration bioaccumulated in organisms. This trend is consistent with several studies showing bioaccumulation of CLD in aquatic organisms like fish or crustaceans. Coat et al. (2006) showed CLD concentrations ranging from 196 ng g^{-1} and 386 ng g^{-1} in the whole body of *Oreochromis mossambicus* sampled in the Lezarde river in Martinique. Monti (2007) highlighted more impressive CLD bioaccumulation rates in aquatic organisms sampled in the Grande Anse river (Guadeloupe, French West Indies), contaminated at $1.715 \mu\text{g.L}^{-1}$ CLD: from 1568 ng g^{-1} to 4002 ng g^{-1} for the crustaceans *Atya innocuous* and *Xiphocaris elongata*, respectively, and up to $11,733 \text{ ng g}^{-1}$ for the freshwater fish *Eleotris perniger*. These higher CLD bioconcentrations, as compared to the present study, seem to be due to the fact that CLD analysis was carried out in the whole-body organisms and not only using the muscle as in our study. This assumption was confirmed by Lafontaine et al. (2017b) who investigated the CLD distribution in the prawn *M. rosenbergii*. The authors observed that the CLD was mainly distributed in the hepatopancreas (i.e. detoxification tissue) (between 50 and 65% of the total CLD amount) and less in the muscle (between 15 and 20% of the total CLD amount).

4.2. CLD behaviour under in-vitro conditions

The laboratory approach was carried out to better evaluate the CLD toxicokinetic mechanism in the invasive crayfish *C. quadricarinatus*. Results highlighted that although CLD concentration in control conditions was below the LOD, a low concentration of CLD was measured in the muscle ($1.47 \pm 1 \text{ ng g}^{-1}$), thus confirming a much higher BCF calculated for a lower CLD concentration exposure. The same result was observed in the CLD analysis in wild populations, where *C. quadricarinatus* sampled in Manzo (CLD concentration $<0.03 \mu\text{g/L}$) were contaminated by measurable CLD concentration. These results confirmed the fact that the analysis of xenobiotic bioconcentration in biota could reinforce the biomonitoring of aquatic ecosystem contaminations. Besides, a rapid CLD absorption in *C. quadricarinatus* muscle happened from the first exposure time (6 h), whatever the condition (i.e. $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $2 \mu\text{g.L}^{-1}$). This is consistent with the fact that the higher k_1 was estimated at the beginning of the bioconcentration phase, as also observed in the prawn *M. rosenbergii* (Lafontaine et al., 2017b). Even if these results are in accordance with other studies, they must be considered with cautious due to the fact that the steady-state, recommended for a BCF calculation, was not reached in our study.

The kinetic results showed a significant positive influence of exposure time and CLD concentration on the CLD bioaccumulated in the muscle. These findings are in accordance with other studies, such as Lafontaine et al. (2017a, 2017b) who highlighted a quick accumulation of CLD (measurable as early as 6 h), in the prawn *M. rosenbergii* whole body, and a slow-down after 4 days of exposure: the uptake rate is lower after this time (and so, the accumulation of pollutant) but the saturation (plateau phase) seems to be not reached (Lafontaine et al., 2017b), as for *C. quadricarinatus* in our study. These results could be explained by the fact that the muscle bioconcentrates CLD slower than other organs like the hepatopancreas. Even if the plateau seems not be reached, we reached CLD concentration close to those measured in the muscle of crayfish caught in the wild, exposed to CLD for longer. This leads us to believe that this accumulation occurs throughout life without reaching

stabilization or that this plateau phase would have been reached with a longer exposure. Relatively similar trends were found in terrestrial vertebrates: a great and quick assimilation of CLD was observed in goat and in cows matrices (Lastel et al., 2016; Fournier et al., 2017 and references therein). Concerning the depuration of goat matrices studied by Lastel et al. (2016), contaminated with CLD at 1 mg kg^{-1} body weight, a steady-state was observed after the accumulation phase and so, a delay before an efficient elimination of the CLD, fitting with our results. Interestingly, a relatively close half-life was found between our two experiments (20 days vs 23.1 days). Contrarily, for the muscle of beef, contaminated with CLD at 1 mg kg^{-1} body weight, the half-life of CLD reach 43 days. The accumulation and depuration were both linked to the physiological status and the metabolic capacities explaining why certain taxonomic groups accumulate more efficiently the CLD through their feeding habits and eliminate more or less efficiently the pollutants than other (via lactation or eggs laying for example) (Lastel et al., 2016 and references therein).

Interestingly, results obtained in the laboratory experiment highlighted a similar pattern to that of wild individuals, showing a dose-dependent accumulation of CLD (i.e. higher CLD concentration in muscles of crayfish sampled in rivers highly contaminated): $15.91 \pm 7.44 \text{ ng g}^{-1}$ for $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ treatment against $9.82 \pm 11.65 \text{ ng g}^{-1}$ for Coullisses river (mean $0.45 \mu\text{g.L}^{-1}$ all year) and $91.19 \pm 20.73 \text{ ng g}^{-1}$ for $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ treatment against $74.9 \pm 51.01 \text{ ng g}^{-1}$ for Lezarde river ($2.48 \mu\text{g.L}^{-1}$ of CLD concentration all year).

Higher levels of CLD contamination were expected in specimens caught *in-situ*. Indeed, absorption via both water and food, contaminated at a lower level, is known to be more efficient (Bahner et al., 1977). This is accentuated in the case of our study, as like the majority of invasive crayfish, *C. quadricarinatus* is omnivorous and opportunistic, capable of preying on macroinvertebrates, and therefore, placed quite high in the trophic chain (Johnston et al., 2011; Jackson et al., 2017) and so, becoming more contaminated than other species at a lower level. Hoekstra et al. (2003) highlighted that large mammals were more contaminated than fish, themselves more contaminated than copepods. Although laboratory experiments highlighting only CLD bioconcentration from water, the CLD concentration measured in crayfish caught *in-situ* seems to be more realistic. This slight difference, less contaminated individuals in the wild, can be explained by the fact that the toxicokinetic constants remains more difficult to estimate in the natural environment because it is necessary to take into account many environmental factors (season, temperature, dissolved oxygen, turbidity, predation, cocktail effect of different pollutants ...) (Rotchell and Ostrander, 2003).

Some studies highlighted the possibility for invertebrates to eliminate the CLD (more or less quickly) from their own body, partly via their faeces, moulting (Bahner et al., 1977) or other unknown mechanisms (Schimmel et al., 1977; Lafontaine et al., 2017a, 2017b). Here, we highlighted values of CLD concentration in the crayfish just below the MRL for individuals exposed to $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ for 20 days ($15.91 \pm 7.44 \text{ ng g}^{-1}$ at the end of the 20 days-absorption phase against 20 ng g^{-1} for the MRL). But those exposed to higher concentrations were contaminated above this value. Unfortunately, a very slow CLD decontamination was observed in the *C. quadricarinatus* muscle for the $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ treatment, or even an absence of decontamination for the $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ treatment. Based on the depuration constant k_2 determined in this work (0.03 days^{-1}), 50.57 days of depuration seem necessary to reach the MRL in muscle of crayfish exposed for 20 days at $2 \mu\text{g.L}^{-1}$. This can be explained by the fact that the muscle was not very efficient at eliminating the CLD. This time was not possible to be estimated in organisms exposed to $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ because CLD concentration at the end of the bioconcentration period was already below the MRL. Indeed, previous studies showing CLD depuration, used the entire body, including the hepatopancreas, known to play an important role in the accumulation, detoxification of pollutants in crustaceans (Lafontaine et al., 2017a, 2017b) and their elimination (Sreeram and Menon, 2005; Zeng et al., 2010). The depuration

observed in *M. rosenbergii* by Lafontaine et al. (2017a, 2017b) may be mainly due to the detoxification of CLD by the hepatopancreas. However, other detoxification system could explain this observation such as the MXR (e.g. multi-xenobiotics resistance mechanism) pump system, protecting aquatic species against pollutant molecules (Kurelec, 1992), as already investigated in other aquatic invertebrates (i.e. bivalves and crustaceans) (Pain and Parant, 2007; Horion et al., 2015). This MXR system could explain the fact that CLD concentration decreased in the organism and increased in the water over time during the depuration phase, until the renewal at day 3. This release of CLD into the depuration water reinforces the idea that it is not sufficient to simply place the organisms in clean water to allow them to be decontaminated within a defined period, but that it is necessary to renew the medium at least every three days, to avoid possible recontamination of exposed individuals. Another explanation can be a contamination due to traces of pollutant present on the crayfish cuticle after the accumulation period but all the precautions were taken (i.e. thorough washing of crayfish before the transfer in the CLD-free for the depuration period). However, this depuration system seems to be ineffective at quickly reaching the MRL in crayfish muscle. In fact, it cannot be excluded that the presence of CLD in the depuration water could lead to a recontamination of the organisms, especially because our results highlight that crayfish didn't reach the steady-state of bioconcentration, and we observed an increase of the CLD muscle concentration measured even during the first time of depuration. This suggests that CLD released in water, even if at a very low concentration, could be uptake again by organisms. This hypothesis is supported by the *in-situ* experiment showing a CLD bioconcentration in crayfishes sampled in the Manzo river, having a similar CLD concentration as the depuration water (i.e. 0.03 ng.L⁻¹). This could therefore also explain the low estimated k_2 after the depuration phase.

However, as our results doesn't really show a depuration, these theoretical calculations could be more accurate in the case of a longer depuration which could show a real decrease of CLD in the body. However, the muscle is not a detoxifying organ and so, we are not sur that a longer depuration time would result in a depuration of CLD from the muscle and the CLD concentration could remain the same in the long term.

4.3. Risks for consumers

This rapid and high CLD accumulation in combination with an inefficient CLD decontamination of the muscle could pose a human health problem: even if fishing in the Martinican rivers is prohibited, this recreational and ancestral practice remains very difficult to control. Many fishermen put traps in the rivers every day (*Personal observation*) to catch crustaceans for their personal consumption or to sell them on the markets. Moreover, this practice is also very lucrative: *C. quadricarinatus* can be sold for up to 25€/kg as it is considered a luxury gourmet product. This species is now found and fished in high densities in several martinican rivers (Baudry et al., 2021). The majority of rivers inhabit by *C. quadricarinatus* are polluted by CLD beyond the potability thresholds set by the Regional Health Agency (0.1 µg.L⁻¹) or even well above 0.2 µg.L⁻¹, which is an exposure concentration resulting in the MRL being exceeded in crayfish muscle, according to our study (Fig. 1).

Due to the transfer of CLD along the food chain, CLD can thus reach humans through the consumption of contaminated products. Even if a recent study, based on the analysis of CLD contamination before and after several cooking processes, highlighted a strike reduction of the amount of CLD in beef meat (Martin et al., 2020), exposure to CLD is now chronic and it is detectable in the blood of the majority of the Caribbean population (Multigner et al., 2007). This could generate a health problem since it has been shown that CLD could be responsible to the development of diseases, such as prostate cancer (Multigner et al., 2007). The possibility of cooking products previously decontaminated by a simple depuration period, as studied in this work, could have been

an interesting alternative to the consumption of crayfish. But the fact that the muscle of *C. quadricarinatus* is only slowly decontaminated in CLD-free water means that other methods must be tested to allow the safe consumption of these products: a decontamination period longer than 20 days, in a tank, with potential losses of specimens due to cannibalism or inconvenience in an artificial closed environment (leading to mortality), is likely not to be followed by fishermen. At the moment, the most efficient way of stopping the spread of this poison is to inform the population on the dangers of this wild fishery. This social aspect is important as the problem is likely to persist for a very long time as modelling analyses have predicted that CLD in soils would persist for at least 300 years in Martinique (Cabidoche et al., 2009).

5. Conclusion

This study aimed to investigate the level of CLD contamination in *C. quadricarinatus* muscle of wild populations and determine the CLD toxicokinetic (i.e. **bioconcentration** and depuration) through *in-vitro* experiments in order to investigate the processes and to communicate about an alternative to consume these fishery products. Here, we showed a clear positive correlation between the CLD concentration in water and the CLD concentration measured in the muscle of crayfish caught in the wild. These results were in accordance with *in-vitro* experiments: a quick (as early as 6 h of exposure) and efficient **bioconcentration** over time, reaching approximately 100 ng g⁻¹ of CLD for crayfish exposed to 2 µg.L⁻¹ of CLD and approximately 20 ng g⁻¹ (corresponding to the MRL) for crayfish exposed to 0.2 µg.L⁻¹ was observed. Worryingly, we were not able to decontaminate the muscle of contaminated *C. quadricarinatus*: almost 3 weeks of decontamination did not reduce the concentration of CLD below the MRL for crayfish exposed 2 µg.L⁻¹ CLD. The crayfish resource is inexhaustible in the natural environment as this invasive species seems not to be affected by this abiotic stressor, making the situation alarming: *C. quadricarinatus* is highly prized in Martinique and chlordecone, highly present in a majority of Martinique watersheds, is well known to cause significant health problems. Depuration experiments have shown that the muscle seems to decontaminate too slowly to propose this as an alternative for the consumption of products caught in the Martinique rivers.

Credit Author Statement

Thomas Baudry: Conceptualization, Methodology, Software, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Validation, Project administration, Funding acquisition; **Eric Gismond:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing – review & editing, Visualization, Validation; **Jean-Pierre Gout:** Supervision, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition; **Alexandre Arqué:** Supervision, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition; **Juliette Smith-Ravin:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition; **Frédéric Grandjean:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

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.

Acknowledgement

We thank the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) for welcoming us into their structure in order to carry out the experiments and the Laboratoire Territorial d'Analyses (LTA) de Martinique for having carried out the river water analyses. We also

thank Catherine Adam, technician at the Laboratory of Animal Ecology and Ecotoxicology (LEAE) of the University of Liege, for the CLD analyses in the crayfish tissues.

We thank Julian Reynolds for reading the article and correcting the English.

This project was funded by the Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Martinique (DEAL), the Office de l'Eau de Martinique (ODE), the Office Français de la Biodiversité (OFB) and the Collectivité Territoriale de Martinique (CTM).

References

- Azofeifa-Solano, J.C., Naranjo-Elizondo, B., Rojas-Carranza, A.H., Cedeño-Fonseca, M., 2017. Presence of the Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Parastacidae, Astacoidea) in a freshwater system in the Caribbean drainage of Costa Rica. *BioInvasions Records* 6, 351–355. <https://doi.org/10.3391/bir.2017.6.4.08>.
- Bahner, L.H., Wilson, A.J., Sheppard, J.M., Patrick, J.M., Goodman, L.R., Walsh, G.E., 1977. Kepone® bioconcentration, accumulation, loss, and transfer through estuarine food chains. *Chesap. Sci.* 18, 299. <https://doi.org/10.2307/1350804>.
- 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. In: *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, vol. 421. <https://doi.org/10.1051/kmae/2020041>.
- 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. *Ecol. Indic.* 126 <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107637>.
- Cabidoche, Y., Achar, R., Cattani, P., Clermont-dauphin, C., Massat, F., Sansoulet, J., 2009. Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies : a simple leaching model accounts for current residue. *Environ. Pollut.* 157, 1697–1705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.015>.
- Cabidoche, Y.M., Lesueur-Jannoyer, M., 2012. Contamination of harvested organs in root crops grown on. *Pedosphere: Int. J.* 22, 562–571. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60041-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60041-1).
- Cannon, S.B., Veazey, James M., Jackson, Robert S., Virlyn, W., Hayes, Carl, Straub, Wesley E., Landrigan, Philip J., Liddle, J.A., Cdc, S.B., Veazey, J.M., Jackson, R.S., Burse, V.W., Hayes, C., Straub, W.E., Landrigan, P.J., Liddle, J.A., 1978. Epidemic kepone poisoning in chemical workers. *Am. J. Epidemiol.* 107, 529–537.
- Coat, S., Bocquené, G., Godard, E., 2006. Contamination of some aquatic species with the organochlorine pesticide chlordecone in Martinique. *Aquat. Living Resour.* 19, 181–187. <https://doi.org/10.1051/alr:2006016>.
- Core Team, R Development, 2019. *R: a Language and Environment for Statistical Computing*.
- Crooks, J.A., Chang, A.L., Ruiz, G.M., 2011. Aquatic pollution increases the relative success of invasive species. *Biol. Invasions* 13, 165–176. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9799-3>.
- De Moor, I., 2002. Potential impacts of alien freshwater crayfish in South Africa. *Afr. J. Aquat. Sci.* 125–139. <https://doi.org/10.2989/16085914.2002.9626584>.
- FAO, 2016. *Fishery and Aquaculture Statistics 2016*.
- Fedorenkova, A., Vonk, J.A., Breure, A.M., Hendriks, A.J., Leuven, R.S.E.W., 2013. Tolerance of native and non-native fish species to chemical stress: a case study for the River Rhine. *Aquat. Invasions* 8, 231–241. <https://doi.org/10.3391/ai.2013.8.2.10>.
- Filipová, L., Petrušek, 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>.
- Fournier, A., Feidt, C., Lastel, M.L., Archimède, H., Thome, J.P., Mahieu, M., Rychen, G., 2017. Toxicokinetics of chlordecone in goats: implications for risk management in French West Indies. *Chemosphere* 171, 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.054>.
- Hansen, D.J., Goodman, L.R., Wilson, A.J., 1977. Kepone®: chronic effects on embryo, fry, juvenile, and adult sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Chesap. Sci.* 18, 227. <https://doi.org/10.2307/1350865>.
- Hoekstra, P.F., O'Hara, T.M., Fisk, A.T., Borgå, K., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. *Environ. Pollut.* 124, 509–522.
- Horion, S., Thomé, J.P., Gismondi, É., 2015. Changes in antitoxic defense systems of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* exposed to BDE-47 and BDE-99. *Ecotoxicology* 24, 959–966. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1438-4>.
- Jackson, M.C., Evangelista, C., Zhao, T., Lecerf, A., Britton, J.R., Cucherousset, J., 2017. Between-lake variation in the trophic ecology of an invasive crayfish. *Freshw. Biol.* 62, 1501–1510. <https://doi.org/10.1111/fwb.12957>.
- Johnston, K., Robson, B.J., Fairweather, P.G., 2011. Trophic positions of omnivores are not always flexible: evidence from four species of freshwater crayfish. *Austral Ecol.* <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2010.02147.x>.
- Jones, C., 1990. *The Biology and Aquaculture Potential of the Tropical Freshwater Crayfish, Cherax quadricarinatus*. Department of Primary Industries Queensland.
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology*. <https://doi.org/10.3109/10408449209145320>.
- Lafontaine, A., Baiwir, D., Joaquim-justo, C., Pauw, E. De, Lemoine, S., Boulangé-lecomte, C., Forget-leray, J., Thomé, J., 2017a. Proteomic response of *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas exposed to chlordecone : identification of endocrine disruption biomarkers ? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 141, 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.043>.
- Lafontaine, A., Gismondi, E., Dodet, N., Caupos, F., Lemoine, S., Lagadic, L., 2017b. Bioaccumulation, distribution and elimination of chlordecone in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: field and laboratory studies. *Chemosphere* 185, 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.099>.
- Lastel, M.L., Lerch, S., Fournier, A., Jurjanz, S., Mahieu, M., Archimède, H., Feidt, C., Rychen, G., 2016. Chlordecone disappearance in tissues of growing goats after a one month decontamination period—effect of body fatness on chlordecone retention. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 23, 3176–3183. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5833-4>.
- Martin, D., Lobo, F., Lavison-Bompard, G., Guérin, T., Parinet, J., 2020. Effect of home cooking processes on chlordecone content in beef and investigation of its by-products and metabolites by HPLC-HRMS/MS. *Environ. Int.* 144, 106077. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106077>.
- Merlin, C., Devers, M., Béguet, J., Boggio, B., Rouard, N., Martin-Laurent, F., 2016. Evaluation of the ecotoxicological impact of the organochlorine chlordecone on soil microbial community structure, abundance, and function. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 23, 4185–4198. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4758-2>.
- Monti, D., 2007. Evaluation de la biocontamination en Chlordecone , β -Hexachlorocyclohexane et Cadusaphos de Crustacés et Poissons d'eau douce en Guadeloupe. Ministère de l'Ecologie, du Développement et de l'Aménagement durables 1–35.
- Multigner, L., Cordier, S., Kadhel, P., Huc-Terki, F., Blanchet, P., Bataille, H., Janky, E., 2007. Pollution par le chlordécone aux Antilles. Quel impact sur la santé de la population? *Environnement. Risques et Sante* 6, 405–407. <https://doi.org/10.1684/ers.2007.0121>.
- Multigner, L., Ndong, J.R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., Jégou, B., Thome, J.P., Blanchet, P., 2010. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 3457–3462. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.2153>.
- Pain, S., Parant, M., 2007. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere* 67, 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.017>.
- 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>.
- Pedro, S., Fisk, A.T., Tomy, G.T., Ferguson, S.H., Hussey, N.E., Kessel, S.T., McKinney, M.A., 2017. Mercury and persistent organic pollutants in native and invading forage species of the Canadian Arctic: consequences for food web dynamics. *Environ. Pollut.* 229, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.085>.
- Rotchell, J.M., Ostrander, G.K., 2003. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* <https://doi.org/10.1080/10937400306476>.
- Schimmel, S.C., Wilson, A.J.J., 1977. *Acute Toxicity of Kepone to Four Estuarine Animals*, vol. 18. U.S. Environmental Protection Agency Environmental Research Laboratory, pp. 224–227.
- Serge, S., 1994. La lutte intégrée contre le charançon noir des bananiers, *Cosmopolites sordidus*. *Fruits* 49, 151–162.
- Snegaroff, J., 1977. Les résidus d'insecticides organochlorés dans les sols et les rivières de la région bananière de Guadeloupe. *Phytiatr. Phytopharm.* 26, 251–268.
- Sreeram, M., Menon, N., 2005. Histopathological changes in the hepatopancreas of the penaeid shrimp *Metapenaeus dobsoni* exposed to petroleum hydrocarbons. *J. Mar. Biol. Assoc. India*.
- Tropea, C., Piazza, Y., López, L.S., 2010. Effect of long-term exposure to high temperature on survival, growth and reproductive parameters of the 'redclaw' crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 302, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.027>.
- Weir, S.M., Salice, C.J., 2012. High tolerance to abiotic stressors and invasion success of the slow growing freshwater snail, *Melanoides tuberculatus*. *Biol. Invasions* 14, 385–394. <https://doi.org/10.1007/s10530-011-0084-x>.
- Zeng, H., Ye, H., Li, S., Wang, G., Huang, J., 2010. Hepatopancreas cell cultures from mud crab, *Scylla paramamosain*. In: *Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. <https://doi.org/10.1007/s11626-009-9259-5>.

A retenir :

- Cette étude a mis en évidence la contamination des produits de pêche en milieu naturel, à de fortes concentrations (jusqu'à 100 ng.g^{-1} de chair, dans la Lézarde).
 - Il existe une corrélation positive entre la concentration en CLD dans l'eau et celle retrouvée dans les muscles.
 - Le CLD est intégré très rapidement par *C. quadricarinatus* (dès 6 h) et aucun plateau n'est atteint au bout de 20 jours.
 - 20 jours de décontamination ne suffisent pas à descendre en dessous de la Limite Maximale Résiduelle (LMR)
- ⇒ Ne peut pas être utilisé comme alternative à la consommation des produits de pêche.
- ⇒ Consommation de *C. quadricarinatus* peut poser un problème de santé humaine en Martinique.

Discussion générale et perspectives



Ce travail de thèse a mis en évidence le caractère invasif de l'écrevisse australienne *C. quadricarinatus* au sein des hydrosystèmes de Martinique, montrant une colonisation sur l'ensemble du linéaire des bassins versants les plus importants, et des populations denses (Chapitre 2). L'analyse du pool génétique présent en Martinique a mis en évidence la présence d'une bonne diversité génétique avec plusieurs haplotypes (8 au total, dont 3 majoritaires), qui ne sont pas tous retrouvés dans la population d'élevage du Carbet, validant l'hypothèse de plusieurs événements d'introduction (Chapitre 2). De plus, *C. quadricarinatus* est une espèce très appréciée par la population locale : sa dispersion semble assistée par certaines personnes, qui relâchent des individus vivants dans le milieu, afin d'entretenir les stocks pour la pêche, afin de les revendre sur les marchés (jusqu'à 25€/kg) ou via des sites de vente sur internet (Chapitre 2). A cause de sa voracité et de son caractère omnivore, *C. quadricarinatus* impacte lourdement les espèces locales, et notamment les crevettes, avec qui elle entre en compétition pour la ressource alimentaire et les caches (Chapitre 3). Ces impacts pourraient même être bien plus profonds : notre étude intervient plusieurs années après le début de l'invasion et certains déclin populationnels en milieu naturel (mollusques *Thiaridae* notamment) ont déjà été observés depuis les premières détections de *C. quadricarinatus* en milieu naturel. Il semble donc établi qu'il sera impossible d'éradiquer cette espèce, d'autant plus que la consommation de l'écrevisse par l'Homme qui pourrait être un moyen de réguler les populations en milieu naturel n'est pas envisageable car elle pose un problème de santé humaine. En effet, la pratique de la pêche en rivière est interdite en Martinique, par arrêté préfectoral, due à la contamination des eaux par le chlordécone (Chapitre 4). Ce pesticide, largement utilisé dans les Antilles Françaises entre 1950 et 1993 pour lutter contre l'invasion du charançon du bananier (*C. sordidus*), est très persistant dans les sols volcaniques et se retrouve dans les rivières, près de 30 ans après, par lessivage des sols. Les concentrations retrouvées dans les tissus des écrevisses pêchées en milieu naturel dépassent largement les limites résiduelles maximales autorisées par l'Agence Régionale de Santé et leur décontamination semble beaucoup trop longue (plus de 50 jours) pour que cette pêche soit considérée comme un moyen de régulation des populations sauvages (Chapitre 4).

I. Une invasion susceptible d'évoluer

Notre étude a révélé que *C. quadricarinatus* est présente sur plus de 20 rivières permanentes, avec certains bassins versants totalement envahis, depuis une première caractérisation dans le milieu naturel en 2010. Cette colonisation rapide du linéaire par cette espèce d'écrevisse australienne a déjà été constatée dans le Sud de l'Afrique, où elle fut introduite volontairement, dans le Swaziland, dans un but aquacole, avant de s'échapper des bassins (Nunes et al., 2017). Cette zone est irriguée par de longs fleuves, comprenant chacun de nombreux affluents, traversant plusieurs pays, dont l'Afrique du Sud et le Mozambique (Nunes et al., 2017; Madzivanzira et al., 2020). Nunes et al. (2017) ont réalisé des captures sur près de 50 sites, sur tout le linéaire hydrologique afin d'établir un état des lieux de l'invasion de *C. quadricarinatus* dans cette zone : l'écrevisse a été retrouvée à 112 km en aval du point initial d'introduction et à 33 km en amont, soit un rythme d'expansion d'environ 8 km par an en aval et 4.7 km en amont. Les populations établies sont généralement abondantes, avec l'ensemble des cohortes. Dans cette étude, il semblerait que la dispersion serait plutôt effectuée par des individus juvéniles (Nunes et al., 2017). Grâce à ses capacités de dispersion et de reproduction impressionnantes, *C. quadricarinatus* semble être en mesure de coloniser la totalité du linéaire hydrographique, une fois introduite au sein d'un bassin versant. Ainsi, en Martinique, l'écrevisse est présente sur l'ensemble des cours d'eau et affluents des six bassins versants majeurs où elle a été introduite : Lézarde, Capot, Case Navire, Galion, Rivière Pilote, Rivière Salée (voir Chapitre 2).

Le passage d'un bassin versant à l'autre semble être impossible pour l'écrevisse, à cause du terrain très accidenté et sa présence dans des bassins indépendants est donc le résultat d'une dissémination par l'Homme, pour des raisons alimentaires. Une fois introduite, il devient difficile d'endiguer la colonisation d'un site, à moins de détecter sa présence précocement, ce qui est souvent difficile avec les méthodes traditionnelles. Lorsque les premiers individus sont observés, il est déjà trop tard (Krieg et al., 2020). Il convient donc d'anticiper, par des suivis de milieux réguliers, grâce à la technique ADNe développée, offrant une grande sensibilité. En cas de détection sur une zone non-envahie, une action rapide permettra d'augmenter les chances d'éradication de

l'espèce. En parallèle, il devient très important de communiquer auprès des locaux (pêcheurs, aquaculteurs et aquariophiles notamment) sur les dangers des espèces exotiques envahissantes et de l'écrevisse *C. quadricarinatus*, pour la faune locale. En effet, malgré son attrait commercial, cette espèce a certainement participé au déclin des populations de « z'habitant ». Cette espèce emblématique était autrefois très appréciée par la population locale (Figure VI.1), mais elle se retrouve maintenant en forte régression au sein des hydrosystèmes de l'île.

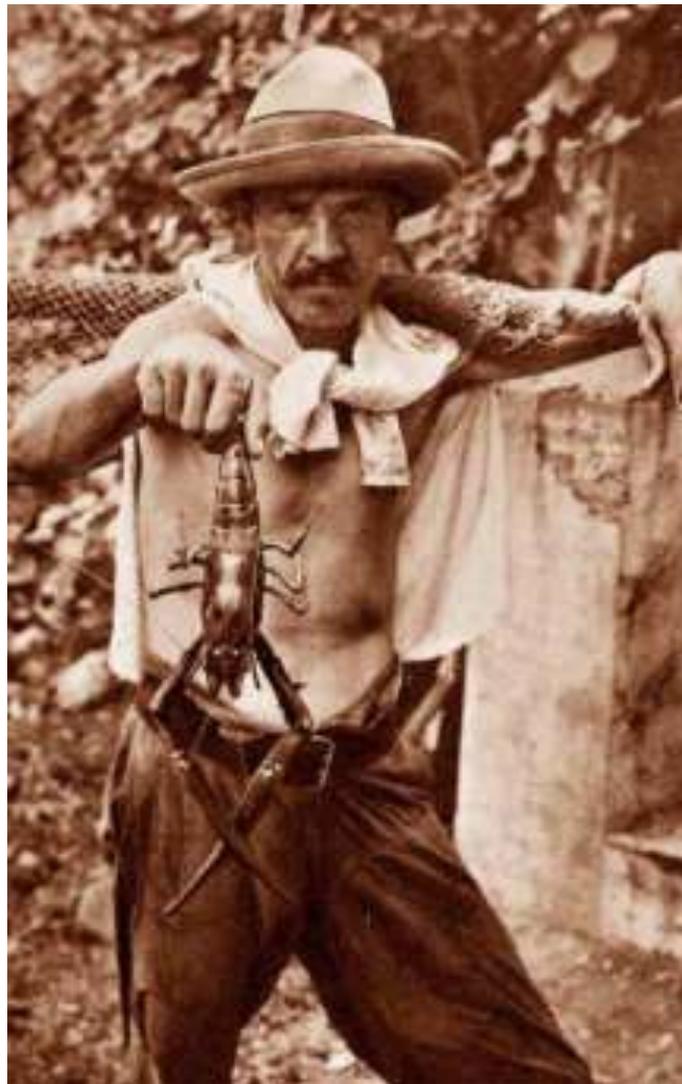


Figure VI.1 : Photographie d'un Martiniquais revenant de la pêche en rivière, à Rivière Salée (sud de la Martinique) dans les années 1930, avec un « z'habitant » (*Macrobrachium carcinus*) de belle taille dans les mains (photo tirée de l'article de Morandi et al. (2018))

Mes travaux de thèse ont pu démontrer les capacités de colonisation impressionnantes de *C. quadricarinatus*, ainsi que ses impacts réels sur les communautés locales. La Martinique pourrait mettre en place des mesures de contrôle vis-à-vis de cette espèce et ainsi devenir un exemple de mise en garde, pour les autres pays en zone tropicale, au même titre que Madagascar (autre territoire insulaire), qui a subi un évènement similaire avec l'écrevisse marbrée (*P. virginialis*) (Andriantsoa et al., 2020). Grâce à nos travaux menés sur le terrain et en laboratoire, un outil de détection précoce efficace, spécifique à *C. quadricarinatus*, et réutilisable a été développé et optimisé. Il pourra être appliqué sur d'autres territoires en zone tropicale, comme la Guadeloupe, considérée comme « l'île sœur » de la Martinique, notamment à cause de leurs similitudes en termes de compositions faunistiques et floristiques. La présence de *Cherax quadricarinatus* n'a pas été signalée dans les hydrosystèmes de Guadeloupe, mais les risques d'introduction sont élevés car elle était observée à la vente dans les animaleries jusqu'en 2018.

II. Des impacts sous-estimés

Les écrevisses en général sont bien connues pour être des espèces opportunistes, qui vont privilégier les proies facilement accessibles, voire non-mobiles, telles que les mollusques ou les macrophytes (Hofkin et al., 1992; Renai and Gherardi, 2004; Souty-Grosset et al., 2016). Les impacts de *C. quadricarinatus* sur les communautés de mollusques, et notamment de *Thiaridae*, ont déjà été démontrés auparavant (Monde et al., 2017) et ont été confirmés dans le cadre de nos travaux. Ils s'avèrent être des proies très nutritives, avec des coquilles enrichies en calcium, élément nécessaire à la croissance des écrevisses, durant le processus de mue (Jones, 1990). Dans les zones non-envahies, les mollusques de la famille des *Thiaridae* deviennent très rapidement la biomasse majoritaire du cours d'eau, pouvant atteindre des densités impressionnantes (jusqu'à 10000 individus par mètre carré) (Jarne, Com. Pers.). La sélection des proies penche évidemment vers les éléments les plus riches en énergie et les fortes densités d'écrevisses peuvent rapidement épuiser les ressources préférées : les éléments abondants et peu mobiles (voire immobiles), tels que les végétaux et les mollusques,

vont donc être les plus consommés (Alcorlo et al., 2004). Dans le cas des macrophytes, leur consommation en grande quantité compense leur qualité moindre et ceci pourrait expliquer la prédominance des matières végétales dans le régime alimentaire des écrevisses (Momot, 1995; Parkyn et al., 2001). En Martinique, les observations réalisées *in-situ* semblent indiquer une diminution de la population de ces mollusques dans les zones envahies par l'écrevisse (Jarne, Com. Pers.), tout comme les macrophytes immergées (Obs. pers.). Même si la coïncidence est très forte, la méthode isotopique ne peut prouver que *C. quadricarinatus* soit l'unique facteur responsable de ces déclin populationnels. Les expériences en milieu contrôlé sont également de bons indices des impacts de l'écrevisse sur ces communautés, mais le contact facilité entre les proies et le prédateur, sans cache, et l'absence de proie alternative accentuent probablement les résultats.

Les zones étudiées sont envahies par *C. quadricarinatus* depuis plusieurs années déjà (Baudry et al., 2020; 2021) et notre étude isotopique intervient bien après le début de l'invasion, avec ces déclin populationnels observés depuis 10 ans (de mollusques *Thiaridae* notamment ; Jarne, Com. Pers.). Ceci nous laisse penser que les impacts de l'écrevisse sur les communautés autochtones pourraient bien être sous-estimés. Par exemple, une étude de la chaîne trophique, en Chine, menée par Wang et al. (2021) a montré un fort chevauchement de niche écologique entre l'écrevisse de Louisiane envahissante (*P. clarkii*) et le bouquet nippon (*Macrobrachium nipponense*), avec une supériorité compétitive de *P. clarkii*. Au Portugal, Banha and Anastácio (2011) ont mis en avant les impacts négatifs de cette même espèce sur les populations natives de caridines (*Atyaephyra desmarestii*). De chutes de populations ont été observées sur le terrain et des expériences en condition contrôlée ont permis de corréler le déclin des crevettes par de la prédation, avec une capacité des écrevisses à consommer en moyenne une crevette par jour (Banha and Anastácio, 2011). Les écrevisses exotiques envahissantes sont plus compétitives dans l'acquisition des ressources que les crevettes autochtones et des comportements agressifs, lors de ces interactions interspécifiques, peuvent être observés (Reynolds, 2011). L'espèce exotique envahissante devient alors dominante dans l'écosystème et peut entraîner, par exclusion compétitive, des déplacements, voire des disparitions de populations natives. Dans

notre étude, la comparaison des structures de chaînes trophiques en zone envahie et en zone non-envahie, grâce à l'analyse des isotopes stables, a permis de mettre en évidence les impacts négatifs de *C. quadricarinatus* sur les communautés locales de crevettes. La présence de l'écrevisse a provoqué une exclusion compétitive, avec une baisse de position trophique chez la majorité des espèces de crevettes (*Atyidae*, *M. carcinus* et *Macrobrachium* juvéniles), de façon significative pour les deux dernières citées (voir Chapitre 3). Même si la méthode choisie permet d'investiguer les impacts sur le long terme, de nombreuses études mettent en évidence des changements de signature isotopique d'une saison à l'autre, mais aussi suivant la disponibilité et la diversité des proies présentes (Jennings and Cogan, 2015). Ainsi, une ressource absente du milieu, pour une raison naturelle (comme les migrations saisonnières) ou par surexploitation (par l'Homme ou à cause d'une invasion biologique), ne pourra pas être assimilée par les prédateurs et les résultats d'une consommation remontant à plusieurs mois, voire plusieurs années, ne seront pas retrouvés grâce à la méthode isotopique.

L'analyse de contenu gastrique notamment par une approche de métabarcoding pourrait être intéressante pour apprécier l'impact par prédation (du dernier repas) de cette espèce dans le milieu naturel, dès les premiers stades de l'invasion. En effet, le comportement de prédation va évoluer en fonction de l'avancée de l'invasion et notamment de la disponibilité des ressources, ainsi que de la densité de population. Cette approche moléculaire est apparue récemment avec la mise en place des barcodes ADN (Gissi et al., 2008) (voir Chapitre 1) et l'essor des NGS (Next-Generation Sequencing), capables de produire des millions de séquences ADN, à des coûts en constante diminution (Shendure and Ji, 2008). Elle a été employée initialement avec succès dans le cadre d'analyse des régimes alimentaires (voir référence dans Pompanon et al., 2012). En fonction de l'étendue du régime alimentaire de l'organisme étudié, le protocole de séquençage peut nécessiter quelques ajustements, comme par exemple l'utilisation de plusieurs jeux d'amorces généralistes vertébrés, invertébrés et végétaux si l'on s'intéresse à une espèce omnivore (da Silva et al., 2019). Bien que le nombre de séquences génétiques de référence ne cesse de croître, l'apport de bases de données personnalisées, par le séquençage de portions du gène mitochondrial de

référence, peut être nécessaire afin d'identifier l'ensemble des séquences obtenues (Joly et al., 2014). C'est notamment le cas pour les études concernant certaines zones géographiques, comme la Martinique, où les recherches en milieux aquatiques d'eau douce restent à développer : par exemple, pour le poisson gale (*Anablepsoides cryptocallus*), endémique strict de Martinique, pour lequel les données restent à compléter (voir Annexe 6). Grâce au métabarcoding, Pereira (2019) a pu analyser la dernière prise alimentaire de deux écrevisses exotiques envahissantes, l'écrevisse de Louisiane (*P. clarkii*) et l'écrevisse signal (*P. leniusculus*), dans les cours d'eau du Nord-Est du Portugal. En raison de leur régime alimentaire omnivores, cet auteur a utilisé des amorces généralistes ciblant les plantes (*g-h* pour le gène *trnL* et *UniPlant* pour le gène *ITS2*), les vertébrés (*12SV5.1* pour le gène mitochondrial *12S*), les macroalgues (*SSU3'*) et les macroinvertébrés (*Leray-XT* pour les EPTO - Éphéméroptères, Plécoptères, Trichoptères et Odonates). A partir d'un grand nombre d'individus analysés pour chacune des espèces (250 *P. clarkii* et 346 *P. leniusculus*), cette étude a révélé la présence de 256 taxons différents dans les contenus stomacaux : 65 taxons animaux, majoritairement des larves d'insectes aquatiques, incluant également des poissons (Salmonidae et Cyprinidae) et des amphibiens, 103 taxons de plantes et 88 d'algues. L'identification s'est avérée être fiable jusqu'au niveau de la famille (70%) et très fiable au niveau de l'ordre (91%). Des fragments de plantes et d'algues ont été identifiés dans 97.1% et 91.3% des estomacs, alors que les taxons animaux ont été retrouvés dans 83.2% des échantillons. Aucun individu carnivore strict n'a été caractérisé. La haute précision de cette méthode a permis de discriminer la contribution des plantes allochtones et des plantes autochtones au régime alimentaire de ces écrevisses, mais aussi les taxons animaux jusqu'au niveau du genre, voire de l'espèce, suivant le niveau de dégradation des séquences obtenues (Pereira, 2019).

Une étude des impacts de *C. quadricarinatus*, toujours à une échelle communautaire, pourrait venir compléter l'approche isotopique, en comparant des indices de diversité fonctionnelle entre zone envahie et non-envahie. La présence de l'écrevisse semble induire une forte pression compétition, provoquant le déplacement, voire l'extinction de certaines espèces autochtones. Ceci a pour effet d'homogénéiser l'écosystème, en l'appauvrissant, impactant nécessairement de manière négative les indices de diversité

fonctionnelle. Parmi ces indices, la diversité α correspond au nombre d'espèces présentes dans un habitat, à un temps donné (Renault et al., 2022), et pourrait être calculée en appliquant la méthodologie métabarcoding sur des échantillons d'eau. Cantera et al. (2019) ont développé un protocole afin d'étudier les assemblages de poissons d'eau douce, dans les rivières et fleuves de Guyane : en filtrant entre 30 et 60 litres d'eau, ils ont été capables de détecter plus de 70% des taxons attendus, jusqu'au niveau de l'espèce. Le protocole n'est pas encore suffisamment optimisé pour obtenir une quantification fiable du nombre d'individus (Cantera et al., 2019) mais, avec une améliorations des rendements, il pourrait être suffisant pour calculer l'indice de diversité α , basé uniquement sur le nombre d'espèces (sans nécessité d'intégrer de données d'abondance) (Renault et al., 2022). L'indice de Shannon pourrait également être utilisé. Il se base sur le nombre d'espèces présentes dans le milieu (richesse spécifique), ainsi que l'abondance des individus au sein de ces espèces (Renault et al., 2022). Pour cette mesure d'abondance individuelle, il est nécessaire d'intervenir directement sur le terrain, en pratiquant des suivis IBMA (Indice Biologique Macroinvertébrés adapté aux Antilles).

III. Des perspectives de lutte mitigées

Depuis de nombreuses années, un grand nombre d'études se sont intéressées à l'éradication d'espèces d'écrevisses exotiques envahissantes (Manfrin et al. 2019). Les techniques initialement privilégiées ont été les **méthodes dites physiques**, comme les chocs électriques ou les piégeages massifs (Manfrin et al. 2019). Peay et al. (2015) ont testé l'efficacité des **chocs électriques** dans le but d'éradiquer l'écrevisse signal (*P. leniusculus*), envahissante en Angleterre. Le principe consistait à envoyer des décharges à haute intensité (96 kW, 1600 volts) durant 2 minutes et répétées ainsi pendant 98 minutes. La méthode a entraîné la mort de 86% des individus mais a également provoqué une grande perte de biodiversité autochtones (poissons, crevettes et écrevisses native notamment) (Peay et al., 2015). Cette méthode a été jugé efficace pour une régulation des populations exotiques envahissantes, mais ne semble pas être la méthode adaptée, à cause de son impact destructeur sur les communautés autochtones (Peay et al., 2015; Manfrin et al., 2019).

Pour beaucoup d'espèces d'écrevisses exotiques envahissantes, Sibley (2000) a décrit le **piégeage massif** comme une méthode relativement efficace pour la régulation des populations d'écrevisses exotiques envahissantes. Elle s'avère être taille-sélective, avec les individus adultes, de grande taille, majoritairement piégés, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les écrevisses adultes ont un comportement dominant et agressif envers les juvéniles, qui seront moins attirées par l'appât à l'intérieur du piège, où elles risquent de se faire attaquer (voir référence dans Kirjavainen and Westman, 1999). Ensuite, le choix de la taille des mailles de la nasse joue un rôle dans l'efficacité de capture (Paillisson et al., 2011) : de petites mailles permettront la capture d'une large gamme de taille d'écrevisses, mais sera peu sélective des espèces capturées, biaisant ainsi les efficacités de capture. Au contraire, une taille de mailles trop grande permettra l'échappée des écrevisses juvéniles. Néanmoins, même avec des pièges adaptés, l'éradication d'une population d'écrevisse exotique envahissante bien établie semble impossible, même en renouvelant régulièrement l'opération (Sibley, 2000; Manfrin et al., 2019). Coignet et al. (2012) ont expérimenté cette méthode, dans les eaux closes de la Brenne, afin d'éradiquer la population d'écrevisse de Louisiane (*P. clarkii*). Même après une capture et trois événements de recapture, l'effort d'échantillonnage semblait insuffisant, avec des milliers d'individus capturés à chaque fois. Ce piégeage est, de toute manière, inenvisageable en Martinique où la pêche en rivière (ainsi que la consommation de ces produits de pêche) est interdite, par arrêté préfectoral, à cause de la contamination au chlordécone. Cette pratique ancestrale reste néanmoins très lucrative pour les pêcheurs locaux, qui continuent de faire perdurer l'activité illégalement, même si, en attendant les résultats approfondis de l'effet de la cuisson sur les matrices musculaires d'écrevisses (Martin et al., 2020), aucune alternative pour leur consommation n'a été trouvée (voir Chapitre 4). Ces méthodes physiques s'avèrent donc être peu efficace pour lutter contre une espèce d'écrevisse envahissante, en plus d'être coûteuses et non-sélectives, impactant beaucoup d'autres espèces animales autochtones (Manfrin et al., 2019).

Des **méthodes chimiques** basées principalement sur des insecticides ont été testées notamment au Royaume-Uni, pour préserver les sites en faveur de l'écrevisse à pattes blanche (*A. pallipes*) (Peay et al., 2006). Le roténone, insecticide naturel, dérivé

d'espèces botaniques de Leguminosae, est couramment employé comme piscicide (Peay et al., 2006). Il a été utilisé afin d'éradiquer l'écrevisse signal envahissante (*P. leniusculus*) sur cinq étendues d'eaux closes en Ecosse (une sablière isolée, trois étangs de retenue d'eau et un étang perméable) (Peay et al., 2006). Pour s'assurer de l'efficacité de la méthode, des écrevisses ont été encagées. La mortalité s'est avérée très élevée, proche d'une éradication totale, avec 100% de mortalité pour les individus tests/encagés. Cependant, l'écrevisse, en creusant des galeries au niveau des berges, a pu réduire son exposition à la roténone et des survivants ont été observés cinq jours après le traitement, remettant en cause l'efficacité du traitement. Cette méthode est également très destructrice, non sélective, occasionnant de lourdes pertes chez les autres taxons aquatiques invertébrés comme vertébrés (référence dans Manfrin et al., 2019). En effet, des études ont mis en avant la toxicité de la roténone pour des espèces aquatiques telle que la truite arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*) (Finlayson et al., 2010), les amphibiens (la grenouille maculée de Columbia *Rana luteiventris*) (Billman et al., 2012) et autres invertébrés (*Aeshnidae*, *Belostomatids*, *Ephemeroptera*, *Pulmonata*, *Daphnia*) (Finlayson et al., 2010; Dalu et al., 2015). L'ensemble de ces taxons s'est révélée sensible à des doses inférieures aux concentrations nécessaires pour tuer les crustacés (Manfrin et al., 2019). Une telle pratique pourrait être mise en place à condition que l'échappée des écrevisses hors de l'eau soit contrôlée au moyen de barrières physiques et que des pêches de sauvetage des communautés autochtones, de tous les taxons, soient organisées. Une réflexion est à mener sur (1) l'efficacité de la roténone en milieu lotique, où l'insecticide sera probablement moins efficace au fur et à mesure de l'éloignement de la source d'émission de l'insecticide et (2) les impacts à court terme, localisés et récupérables de ce biocide, comparé aux impacts étendus et à long terme d'une population envahissante d'écrevisses exotiques.

D'autres méthodes beaucoup moins destructrices pour l'environnement ont été testées afin d'éradiquer les populations d'écrevisses exotiques envahissantes (Manfrin et al., 2019). Ces nouvelles techniques, dites émergentes s'appuient notamment sur la **stérilisation des mâles**, qui sont ensuite libérés dans le milieu (SMRT : Sterile Male Release Technique) (Manfrin et al., 2019). Le principe de cette technique consiste à établir une compétition entre mâles pour la reproduction (Lodge et al., 2006). La

stérilisation des mâles s'effectue en exposant les individus à des doses de rayons X de 40 Gray (Gy), soit quatre fois la dose létale pour l'Homme (Piazza et al., 2015). Ces mâles voient alors leur fertilité réduite de 50%, sans entrainer leur mort (Piazza et al., 2015). Cette technique SMRT a pour avantage d'être 100% sélective de l'espèce d'écrevisse exotique envahissante ciblée et n'impacte ni la santé humaine, ni les communautés autochtones (Lodge et al., 2006). Aquiloni et Zanetti (2014) ont testé cette technique, en association avec un piégeage massif, en Italie, sur une population d'écrevisse de Louisiane envahissante (*P. clarkii*), installée dans un petit lac (Casette Lake, Pordenone) : même si les résultats étaient encourageants (87% de la population éliminée en deux ans d'action), une éradication totale n'a pas été atteinte (Aquiloni and Zanetti, 2014).

La lutte biologique, même si elle est maintenant moins utilisée à cause de certaines expériences passées, peut être mise en œuvre pour tenter d'éradiquer des espèces envahissantes. Celle-ci consiste à relâcher dans l'environnement des antagonistes, prédateur, parasite ou pathogène auxquels les populations envahissantes seront susceptibles (Grønvold et al., 1996). Dans le cadre des invasions biologiques par les écrevisses, l'anguille est un **prédateur naturel** efficace : Aquiloni et al. (2010) ont mis en évidence le potentiel de l'anguille européenne (*A. anguilla*) pour la régulation des écrevisses exotiques envahissantes (en l'occurrence, l'écrevisse de Louisiane *P. clarkii*). D'après leurs expériences, en milieu contrôlé puis en milieu naturel, l'anguille impacterait le recrutement des juvéniles, avec une consommation orientée plutôt vers les individus de petite taille ou les adultes vulnérables, pendant la période de mue. De plus, la présence des anguilles dans le milieu ralentirait l'activité trophique des écrevisses, qui passeraient plus de temps à l'abri du prédateur. L'espèce d'anguille américaine (*A. rostrata*) est naturellement présente au sein des hydrosystèmes de l'île (Lim et al., 2002). Cependant, comme dans de nombreuses zones du monde (Itakura et al., 2020), l'anguille est en forte régression dans les eaux de Martinique (Lim et al., 2002). Ces poissons sont des espèces catadromes : elles effectuent la majorité de leur cycle de vie dans les rivières, en eau douce, puis dévalent les cours d'eau, afin de rejoindre le milieu marin pour se reproduire (Lim et al., 2002). Cependant, en Martinique, leur remontée en eau douce est bien souvent compliquée par une rupture

de la continuité écologique, provoquée par les ouvrages anthropiques, tels que les gués ou les chaussées (voir Chapitre 1) (Figure VI.2). Ceci a pour effet de bloquer les individus dans les parties aval des cours d'eau, où elles sont soumises à de fortes pressions de pêche et ne trouvent pas de ressources alimentaires suffisantes pour se maintenir. Un repeuplement de l'espèce locale (*A. rostrata*) pourrait être envisagée, à condition que la continuité écologique soit restaurée, via la création de passes à poissons par exemple. Cependant il s'agit d'un projet d'une grande ampleur (financière et humaine), qui ne semble pas réalisable dans l'immédiat, à cause du nombre impressionnant de gués recensés en Martinique (Figure VI.2).



Figure VI.2 : Photographie prise en Martinique, sur la rivière Blanche, présentant (A) un passage à gué, ouvrage en béton, d'origine anthropique, permettant le passage des véhicules d'une rive à l'autre du cours d'eau, ainsi que (B) un ouvrage identique, aménagé avec une passe à poissons, permettant de rétablir la continuité écologique entre l'aval et l'amont des cours d'eau.

Toujours dans le cadre de la lutte biologique contre *C. quadricarinatus*, une introduction du pathogène *A. astaci* pourrait être un moyen efficace de réguler les populations d'écrevisses au sein des hydrosystèmes de Martinique. En effet, il semblerait que *C. quadricarinatus* soit susceptible à cet oomycète, au même titre que les écrevisses européennes. Pour preuve, la production aquacole de cinq fermes Taiwanaïses a été décimée, en 2013, à la suite d'une contamination des écrevisses par *A. astaci* (quatre exploitations avec 100% de mortalité et une avec 25% de mortalité) (Hsieh et al., 2016). Ces auteurs ont analysé les souches de pathogène et ont découvert 99.8% de similarité avec les souches européennes, retrouvées notamment en Espagne et en Finlande. Ces résultats sont intéressants car ils mettent en évidence le haut potentiel du pathogène dans la lutte contre *C. quadricarinatus*, mais également l'importance du choix de la souche dans cette lutte : en effet, le plus faible taux de mortalité d'écrevisse enregistré (25%) avec cette souche européenne, intervient dans des eaux à des températures proches de 25°C (contre des températures inférieures à 20°C pour les autres fermes) (Hsieh et al., 2016). Or, cette température correspond à ce que l'on peut retrouver dans les eaux de Martinique (Baudry et al., 2021). Il faudrait alors sélectionner une souche de *A. astaci* résistante à ces hautes températures. Même si ce pathogène semble être spécialiste du groupe des écrevisses (Becking et al., 2021) et que *C. quadricarinatus* en est l'unique représentant, il serait également nécessaire de s'assurer que les communautés locales, et notamment les autres crustacés, n'y soient pas susceptibles. En effet, ce pathogène a malgré tout déjà été observé chez une espèce de crabe (*Eriocheir sinensis*), invasive en Allemagne et vectrice de l'oomycète (Schrimpf et al., 2014). Des expérimentations de contamination *in-vitro*, de la même manière que celles réalisées par Svoboda et al. (2014) (Figure VI.3), pourraient être mises en place avec les espèces locales de Martinique.

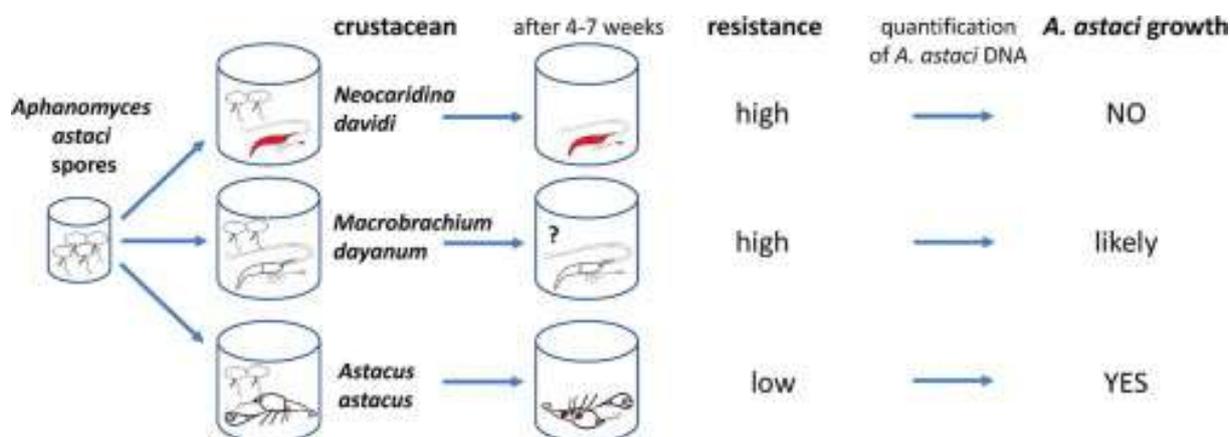


Figure VI.3 : Schéma du protocole expérimental de contamination in-vitro de deux espèces de crevettes (*Neocaridina davidi* et *Macrobrachium dayanum*) et une espèce d'écrevisse (*Astacus astacus*), mis en place dans l'étude de Svoboda et al. (2014)

IV. Conclusion générale

Notre étude montre que l'invasion de l'écrevisse *C. quadricarinatus* en Martinique semble avoir déjà atteint une certaine ampleur. Elle a colonisé l'ensemble des bassins versants majeurs de l'île, montrant de fortes densités sur une majorité de stations où l'écrevisse est présente et devenant la biomasse majoritaire. Son caractère omnivore opportuniste lui permet d'exploiter toutes les ressources de la chaîne trophique et d'entrer en compétition avec les espèces proches morphologiquement et fonctionnellement, telles que les crevettes. Moins efficaces que l'écrevisse pour l'acquisition des ressources alimentaires et des caches, celles-ci se retrouvent alors exclues et obligées de se nourrir à un échelon trophique inférieur ou migrer vers une autre zone, non-envahie. Cependant, des déclin populationnels, notamment chez les mollusques, ont déjà été observés, avec une forte probabilité pour que l'écrevisse en soit responsable, et on ne peut exclure que ces impacts soient beaucoup plus importants que ce que nous avons démontré au cours de ces années de thèse. Néanmoins, aucune méthode viable ne semble efficace pour envisager une éradication de l'espèce sur le territoire et il convient donc d'agir au mieux pour réguler les populations en présence, tout en préservant les zones non-envahies, en intervenant de manière précoce et en communiquant auprès des acteurs locaux.

Nous pourrions espérer que les populations bien établies suivent un schéma démographique de type « boom-bust » (Strayer et al., 2017) (Figure VI.4). Ce concept récent a été décrit dans le cadre des invasions biologiques et se définit en plusieurs étapes : une étape dite « pré-boom », avec l'arrivée de la propagule et un temps de latence, d'acclimatation au nouvel environnement, du « boom », caractérisé par une explosion de la densité de population, du « bust », avec une chute du nombre d'individus, avant la stabilisation de la population, appelée « post-bust » (Strayer et al., 2017). Au moment de ces travaux de thèse et depuis 2018, il semblerait que *C. quadricarinatus* soit dans la phase « boom », avec une colonisation de la majorité des cours d'eau de l'île et des taux de reproduction très élevés, sans affaiblissement visible des populations (voir Chapitre 2). Néanmoins, l'appauvrissement des ressources alimentaires en milieu naturel et l'adaptation des espèces locales à ce nouveau prédateur pourraient mener à une régulation des populations d'écrevisses. Celles-ci pourraient alors prendre une place laissée vide dans la chaîne trophique, en tant qu'espèce naturalisée, de la même manière que le guppy (*Poecilia reticulata*) (voir Chapitre 1) (Figure VI.4).

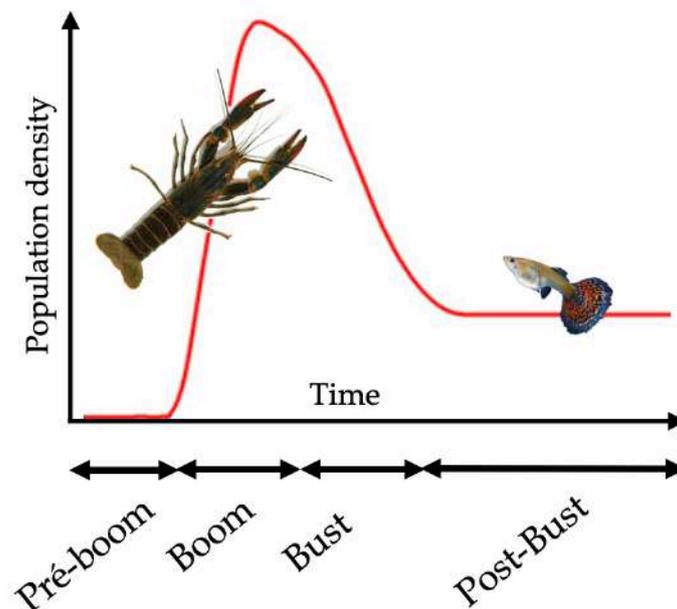


Figure VI.4 : Schématisation de la dynamique « boom-bust », décrite dans le cadre des invasions biologiques, avec ses différentes phases : pré-boom, boom, bust et post-bust. L'écrevisse *Cherax quadricarinatus*, introduite au début des années 2000 en Martinique, semble être dans une phase « boom », alors que le Guppy (*Poecilia reticulata*), introduit bien plus tôt et maintenant naturalisé, est dans une phase « post-bust » stable.

Références bibliographiques

- Ahyong, S.T., Yeo, Æ.D.C.J., 2007. Feral populations of the Australian Red-Claw crayfish (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in water supply catchments of Singapore. *Biological Invasions* 9, 943–946. <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9094-0>
- Alcorlo, P., Geiger, W., Otero, M., Alcorlo, P., Geiger, W., Otero, M., 2004. Feeding Preferences and Food Selection of the Red Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*, in Habitats Differing in Food Item Diversity <http://www.jstor.org/stable/20105729>
- Alexander, J.E., Covich, A.P., 1991. Predator avoidance by the freshwater snail *Physella virgata* in response to the crayfish *Procambarus simulans*. *Oecologia* 87, 435–442. <https://doi.org/10.1007/BF00634603>
- Alharbi, O.M.L., Basheer, A.A., Khattab, R.A., Ali, I., 2018. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *Journal of Molecular Liquids* 263, 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.029>
- Alp, M., Cucherousset, J., Buoro, M., Lecerf, A., 2016. Phenological response of a key ecosystem function to biological invasion. *Ecology Letters* 19, 519–527. <https://doi.org/10.1111/ele.12585>
- Aluko, O.A., Osei Opoku, E.E., Ibrahim, M., 2021. Investigating the environmental effect of globalization: Insights from selected industrialized countries. *Journal of Environmental Management* 281, 111892. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111892>
- Anastacio, P.M., Marques, J.C., 1997. Crayfish, *Procambarus clarkii*, effects on initial stages of rice growth in the lower Mondego River valley (Portugal). *Freshwater Crayfish* 11, 608–617.
- Andriantsoa, R., Jones, J.P.G., Achimescu, V., Randrianarison, H., Raselimanana, M., Andriatsitohaina, M., Rasamy, J., Lyko, F., 2020. Perceived socio-economic impacts of the marbled crayfish invasion in Madagascar. *PLoS ONE* 15, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231773>
- Andriantsoa, R., Tönges, 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 Ecology* 19, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12898-019-0224-1>
- Anson, K.J., Rouse, D.B., 1994. Effects of salinity on hatching and post-hatch survival of the Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of the World*

Aquaculture Society 25, 277–280.

- Aquiloni, L., Brusconi, S., Cecchinelli, E., Tricarico, E., Mazza, G., Paglianti, A., Gherardi, F., 2010. Biological control of invasive populations of crayfish: The European eel (*Anguilla anguilla*) as a predator of *Procambarus clarkii*. *Biological Invasions* 12, 3817–3824. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9774-z>
- Aquiloni, L., Zanetti, M., 2014. Integrated Intensive Trapping ANS SMRT Approach for the Control of *Procambarus clarkii*: The Casette Case Study; European Commission: Luxembourg 113–116.
- Arzola-Gonzalez, J.F., Maya de la Cruz, E., Verde Osuna, L.I., Burgueño, García, E., Miguel, L., Campaña, Flores, L.M., Rubio Gutiérrez, Y., 2012. Crecimiento, densidad y rentabilidad del cultivo de langosta de agua dulce (Decapoda: *Cherax quadricarinatus*) en Sinaloa, Mexico. *Ra Ximhai* 8, 17–26.
- 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>
- Azofeifa-Solano, J.C., Naranjo-Elizondo, B., Rojas-Carranza, A.H., Cedeño-Fonseca, M., 2017. Presence of the Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Parastacidae, Astacoidea) in a freshwater system in the Caribbean drainage of Costa Rica. *BioInvasions Records* 6, 351–355. <https://doi.org/10.3391/bir.2017.6.4.08>
- Bahner, L.H., Wilson, A.J., Sheppard, J.M., Patrick, J.M., Goodman, L.R., Walsh, G.E., 1977. Kepone® Bioconcentration, Accumulation, Loss, and Transfer Through Estuarine Food Chains. *Chesapeake Science* 18, 299. <https://doi.org/10.2307/1350804>
- Banha, F., Anastácio, P.M., 2011. Interactions between invasive crayfish and native river shrimp. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 1–12. <https://doi.org/10.1051/kmae/2011033>
- Banha, F., Gama, M., Anastácio, P.M., 2017. The effect of reproductive occurrences and human descriptors on invasive pet distribution modelling: *Trachemys scripta elegans* in the Iberian Peninsula. *Ecological Modelling* 360, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2017.06.026>
- 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. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 421. <https://doi.org/10.1051/kmae/2020041>
- 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. <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* 0, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.08.001>
- Belle, C.C., Yeo, D.C.J., 2010. New observation of the exotic australian red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (crustacea : decapoda : parastacidae) in Singapore. *Nature in Singapore* 3, 99–102.
- Bernoux, M., Blanchart, E., Venkatapen, C., Noronha, N.C., Burac, M., Colmet-Daage, F., Scherer, C., 2004. Evolution de l'occupation des sols en Martinique.
- Billman, H.G., Kruse, C.G., St-Hilaire, S., Koel, T.M., Arnold, J.L., Peterson, C.R., 2012. Effects of rotenone on Columbia spotted frogs *Rana luteiventris* during field applications in lentic habitats of south western Montana. *North American Journal of Fisheries Management* 32, 781–789.
- Bishop, M.J., Mayer-Pinto, M., Airoidi, L., Firth, L.B., Morris, R.L., Loke, L.H.L., Hawkins, S.J., Naylor, L.A., Coleman, R.A., Chee, S.Y., Dafforn, K.A., 2017. Effects of ocean sprawl on ecological connectivity: impacts and solutions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 492, 7–30. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.01.021>
- 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 and Evolution* 26, 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023>
- Bocquené, G., Franco, A., 2005. Pesticide contamination of the coastline of Martinique. *Marine Pollution Bulletin* 51, 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.06.026>
- Bodey, T.W., Bearhop, S., McDonald, R., 2011. Invasions and stable isotope analysis—informing ecology and management, in: *Island Invasives: Eradication and Management*. pp. 148–151.
- Bondar, C.A., Bottriell, K., Zeron, K., Richardson, J.S., 2005. Does trophic position of the omnivorous signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in a stream food web vary with life history stage or density? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 2632–2639.
- Bortolini, L., Alvarez, F., Rodriguez-Almaraz, G., 2007. On the presence of the Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Mexico. *Biological Invasions* 9, 615–620. <https://doi.org/10.1007/s10530-006-9054-0>

- Boucher, O., Simard, M.N., Muckle, G., Rouget, F., Kadhel, P., Bataille, H., Chajès, V., Dallaire, R., Monfort, C., Thomé, J.P., Multigner, L., Cordier, S., 2013. Exposure to an organochlorine pesticide (chlordecone) and development of 18-month-old infants. *NeuroToxicology* 35, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.01.007>
- Brown, N., Diaz, D., Angarita, I., Boodram, N., Bunting, G., Cadiz-Hadeed, A., Fardin, F., Wege, D., 2019. Le hotspot de biodiversité des îles des Caraïbes.
- Cabidoche, Y., Achard, R., Cattan, P., Clermont-dauphin, C., Massat, F., Sansoulet, J., 2009. Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: A simple leaching model accounts for current residue. *Environmental Pollution* 157, 1697–1705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.015>
- Cabidoche, Y.M., Lesueur-Jannoyer, M., 2012. Contamination of Harvested Organs in Root Crops Grown on Chlordecone-Polluted soils. *Pedosphere* 22, 562–571. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60041-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60041-1)
- Cadi, A., Joly, P., 2003. Competition for basking places between the endangered European pond turtle (*Emys orbicularis galloitalica*) and the introduced red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Canadian Journal of Zoology* 81, 1392–1398.
- Cannon, S.B., Veazey, James M, Jackson, Robert S, Virlyn, W., Hayes, Carl, Straub, Wesley E, Landrigan, Philip J, Liddle, J.A., Cdc, S.B., Veazey, J M, Jackson, R S, Burse, V.W., Hayes, C, Straub, W E, Landrigan, P J, Liddle, J.A., 1978. Epidemic kepone poisoning in chemical workers. *American Journal of Epidemiology* 107, 529–537.
- Cantera, I., Cilleros, K., Valentini, A., Cerdan, A., Dejean, T., Iribar, A., Taberlet, P., Vigouroux, R., Brosse, S., 2019. Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers. *Scientific Reports* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39399-5>
- Capps, K.A., Flecker, A.S., 2013a. Invasive Fishes Generate Biogeochemical Hotspots in a Nutrient-Limited System. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054093>
- Capps, K.A., Flecker, A.S., 2013b. Invasive aquarium fish transform ecosystem nutrient dynamics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1520>
- Chabrierie, O., Massol, F., Facon, B., Thevenoux, R., Hess, M., Ulmer, R., Pantel, J., Braschi, J., Amsellem, L., Baltora-Rosset, S., Tasiemski, A., Grandjean, F., Gibert, P., Chauvat, M., Affre, L., Thiébaud, G., Viard, F., Forey, E., Folcher, L., Boivin, T., Buisson, E., Richardson, D., Renault, D., 2019. Biological Invasion Theories: Merging Perspectives from Population, Community and Ecosystem Scales.

Biological Reviews. <https://doi.org/10.20944/preprints201910.0327.v1>

- Chucholl, 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>
- Chucholl, F., Chucholl, C., 2021. Differences in the functional responses of four invasive and one native crayfish species suggest invader-specific ecological impacts. *Freshwater Biology* 66, 2051–2063. <https://doi.org/10.1111/fwb.13813>
- Coignet, A., Pinet, F., Souty-Grosset, C., 2012. Estimating population size of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in fish-ponds (Brenne, Central France) . *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 02. <https://doi.org/10.1051/kmae/2012019>
- 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>
- Connor, S.E., van Leeuwen, J.F.N., Rittenour, T.M., van der Knaap, W.O., Ammann, B., Björck, S., 2012. The ecological impact of oceanic island colonization - a palaeoecological perspective from the Azores. *Journal of Biogeography* 39, 1007–1023. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02671.x>
- Core Team R Development, 2019. R: a language and environment for statistical computing.
- Cortes-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Cruz-Suarez, L.E., Civera-Cerecedo, R., Nolasco-Soria, H., Hernandez-Llamas, A., 2005. Effect of different dietary protein and lipid levels on growth and survival of juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Aquaculture Nutrition* 283–291.
- Costa, A.C., Balibrea, A., Raposeiro, P.M., Santos, S., Souto, M., Gonçalves, V., 2021. Non-indigenous and Invasive Freshwater Species on the Atlantic Islands of the Azores Archipelago. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.631214>
- Crandall, K.A., 2006. Applications of phylogenetics to issues in freshwater crayfish biology. *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture* 380-391, 953–964.
- Crandall, K.A., Buhay, Æ.J.E., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae , and Parastacidae - Decapoda) in freshwater 295–301. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9120-3>
- Crandall, K.A., De Grave, S., 2017. An updated classification of the freshwater crayfishes (Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list.

- Crawley, M.J., Brown, S.L., Heard, M.S., Edwards, G.R., 1999. Invasion-resistance in experimental grassland communities: Species richness or species identity? *Ecology Letters* 2, 140–148. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.1999.00056.x>
- Cruz, M.J., Rebelo, R., G. Crespo, E., 2006. Effects of an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, on the distribution of south-western Iberian amphibians in their breeding habitats. *Ecography* 29, 329–338. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0906-7590.04333.x>
- Cucherousset, J., Bouletreau, S., Martino, A., Roussel, J.M., Santoul, F., 2012. Using stable isotope analyses to determine the ecological effects of non-native fishes. *Fisheries Management and Ecology* 19, 111–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2011.00824.x>
- Curtis, M., Jones, C., 1995. Overview of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, farming practices in northern Australia. *Freshwater Crayfish* 10, 447–455.
- 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.
- Cuttelod, A., Seddon, M., Neubert, E., 2011. European Red List of Non-marine Molluscs. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- da Silva, L.P., Mata, V.A., Lopes, P., Pereira, P., Jarman, S.N., Lopes, R.J., Beja, P., 2019. Advancing the integration of multi-marker metabarcoding data in dietary analysis of trophic generalists. *Molecular Ecology Resources* 19, 1420–1432. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1755-0998.13060>
- Dalu, T., Wasserman, R.J., Jordaan, M., Froneman, W.P., Weyl, O.L.F., 2015. An assessment of the effect of rotenone on selected non-target aquatic fauna. *PLoS ONE* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142140>
- Davis, M.A., Grime, J.P., Thompson, K., 2000. Fluctuating resources in plant communities: A general theory of invasibility. *Journal of Ecology* 88, 528–534. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00473.x>
- de Moor, I., 2002. Potential impacts of alien freshwater crayfish in South Africa. *African Journal of Aquatic Science* 27, 125–139. <https://doi.org/10.2989/16085914.2002.9626584>
- 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>
- Delannoye, R., Charles, L., Pointier, J.-P., Massemin, D., 2015. Mollusques continentaux de la Martinique / Non-Marine Molluscs of Martinique, Lesser Antilles.
- di Castri, F., 1989. A Global Perspective, in: Drake, J.A. (Ed.), *Biological Invasions*. pp. 1–30.
- 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. *Scientific Data* 7, 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41597-020-00586-z>
- Diagne, C., Leroy, B., Vaissière, A.C., Gozlan, R.E., Roiz, D., Jarić, I., Salles, J.M., Bradshaw, C.J.A., Courchamp, F., 2021. High and rising economic costs of biological invasions worldwide. *Nature* 592, 571–576.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03405-6>
- Diehl, S., Kornijow, R., 1998. Influence of Submerged Macrophytes on Trophic Interactions Among Fish and Macroinvertebrates, in: *The Structuring Role of Submerged Macrophytes in Lakes*. pp. 24–46.
- 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>
- Dobler, A.H., Geist, J. 2021. Impacts of native and invasive crayfish on three native and one invasive freshwater mussel species. *Freshwater biology* 1–15.
<https://doi.org/10.1111/fwb.13849>
- Dorn, N.J., 2013. Consumptive effects of crayfish limit snail populations. *Freshwater Science* 32, 1298–1308. <https://doi.org/10.1899/12-157.1>
- Elton, C.S., 1958. *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*.
- Engman, A., Ramirez, A., 2012. Fish assemblage structure in urban streams of Puerto Rico: the importance of reach-and catchment-scale abiotic factors. *Hydrobiologia* 693, 141–155.
- Epstein, S., 1978. Kepone--hazard evaluation. *Science of the Total Environment* 9, 1–62.
- Ercoli, F., Ruokonen, T., Hamalainen, H., 2014. Does the introduced signal crayfish occupy an equivalent trophic niche to the lost native noble crayfish in boreal

lakes? *Biological Invasions* 16, 2025–2036.

- Ercoli, F., Ruokonen, T.J., Koistinen, S., Jones, R.I., Hämäläinen, H., 2015. The introduced signal crayfish and native noble crayfish have different effects on sublittoral macroinvertebrate assemblages in boreal lakes. *Freshwater Biology* 60, 1688–1698. <https://doi.org/10.1111/fwb.12601>
- Estoup, A., Ravigné, V., Hufbauer, R., Vitalis, R., Gautier, M., Facon, B., 2016. Is There a Genetic Paradox of Biological Invasion? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 47, 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415-032116>
- Falguière, J.-C., Buchet, V., 2002. L'aquaculture marine aux Antilles in : La pêche aux Antilles, IRD Editio. ed.
- Fenner, F., 2010. Deliberate introduction of the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, into Australia. *OIE Revue Scientifique et Technique* 29, 103–111. <https://doi.org/10.20506/rst.29.1.1964>
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters* 4, 423–5. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Ficetola, G.F., Siesa, M.E., Manenti, R., Bottoni, L., De Bernardi, F., Padoa-Schioppa, E., 2011. Early assessment of the impact of alien species: Differential consequences of an invasive crayfish on adult and larval amphibians. *Diversity and Distributions* 17, 1141–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00797.x>
- Ficetola, G.F., Siesa, M.E., Padoa-Schioppa, E., De Bernard, F., 2012. Wetland features, amphibian communities and distribution of the alien crayfish, *Procambarus clarkii*. *Alytes* 29, 75–87.
- Figueiredo, B.R.S., Mormul, R.P., Thomaz, S.M., 2015. Swimming and hiding regardless of the habitat: prey fish do not choose between a native and a non-native macrophyte species as a refuge. *Hydrobiologia* 746, 285–290. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2096-x>
- Filipová, L., Grandjean, F., Chucholl, C., Soes, D., Petrusek, A., 2011. Identification of exotic North American crayfish in Europe by DNA barcoding. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* 401.
- Filipová, Lenka, Lieb, D.A., Grandjean, F., Petrusek, A., 2011. Haplotype variation in the spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus*: colonization of Europe and genetic diversity of native stocks. *Freshwater Science* 30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1899/10-130.1>
- Finenko, G., Romanova, Z., Abolmasova, G., Anninsky, B., Pavlovskava, T., et al., 2006. Ctenophores - invaders and their role in the trophic dynamics of the planktonic

- community in the coastal regions of the Crimean coasts of the Black Sea (Sevastopol Bay). *Okeanologiya* 46, 507–517.
- Finlayson, B.J., Somer, W.L., Vinson, M.R., 2010. Rotenone toxicity to rainbow trout and several mountain stream insects. *North American Journal of Fisheries Management* 30, 102–111.
- Fintz, M., 2010. L'autorisation du chlordécone en France, 1968-1981: Éléments historiques sur l'arrivée du chlordécone en France. <hal-00584031>.
- Fisher, M.C., Garner, T.W.J., Walker, S., 2009. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual Review of Microbiology* 63, 291–310.
- Flitcroft, R., Cooperman, M.S., Harrison, I.J., Juffe-Bignoli, D., Boon, P.J., 2019. Theory and practice to conserve freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 29, 1013–1021. <https://doi.org/10.1002/aqc.3187>
- Fry, B., 2006. *Stable Isotopes Ecology*. Springer, New York, NY. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/0-387-33745-8>
- García-Guerrero, M., Hendrickx, M.E., Villarreal, H., 2003. Description of the embryonic development of *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae), based on the staging method. *Crustaceana*. <https://doi.org/10.1163/156854003765911676>
- Gatzmann, F., 2019. DNA methylation in the marbled crayfish *Procambarus virginalis*. <https://doi.org/https://doi.org/10.11588/heidok.00026426>
- Gherardi, F., Acquistapace, P., 2007. Invasive crayfish in Europe: The impact of *Procambarus clarkii* on the littoral community of a Mediterranean lake. *Freshwater Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01760.x>
- Gherardi, F., Bertolino, S., Bodon, M., Casellato, S., Cianfanelli, S., Ferraguti, M., Lori, E., Mura, G., Nocita, A., Riccardi, N., Rossetti, G., Rota, E., Scalera, R., Zerunian, S., Tricarico, E., 2008. Animal xenodiversity in Italian inland waters: Distribution, modes of arrival, and pathways. *Biological Invasions* 10, 435–454. <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9142-9>
- Gissi, C., Iannelli, F., Pesole, G., 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* 101, 301–320. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.62>
- Goudswaard, K., Witte, F., Katunzi, E.F.B., 2008. The invasion of an introduced predator, Nile perch (*Lates niloticus*) in Lake Victoria (East Africa): Chronology and causes. *Environmental Biology of Fishes* 81, 127–139. <https://doi.org/10.1007/s10641-006-9180-7>

- Gouin, N., Grandjean, F., Bouchon, D., Reynolds, J.D., Souty-Grosset, C., 2001. Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*, assessed using RAPD markers. *Heredity* 87, 80–87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00909.x>
- 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>
- Grandjean, F., Gouin, N., Frelon, M., Souty-Grosset, C., 1998. Genetic and Morphological Systematic Studies on the Crayfish *Austropotamobius Pallipes* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* 18, 549–555.
- 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>
- Grey, J., 2006. The use of stable isotope analyses in freshwater ecology: Current awareness. *Polish Journal of Ecology* 54, 563–584.
- Grønvold, J., Henriksen, S.A., Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J., 1996. Biological control. Aspects of biological control - with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Veterinary Parasitology* 64, 47–64. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(96\)00967-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(96)00967-3)
- Guan, R., Wiles, P.R., 1998. Feeding ecology of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in a British lowland river. *Aquaculture* 169, 177–193.
- Guo, W., Kubec, J., Veselý, L., Hossain, M.S., Buřič, M., McClain, R., Kouba, A., 2019. High air humidity is sufficient for successful egg incubation and early post-embryonic development in the marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). *Freshwater Biology* 64, 1603–1612. <https://doi.org/10.1111/fwb.13357>
- Haubrock, P.J., Oficialdegui, F.J., Zeng, Y., Patoka, J., Yeo, D.C.J., Kouba, A., 2021. The redclaw crayfish: A prominent aquaculture species with invasive potential in tropical and subtropical biodiversity hotspots. *Reviews in Aquaculture* 13, 1488–1530. <https://doi.org/10.1111/raq.12531>
- Haury, J., Pattee, E., 1997. Conséquences écologiques des introductions dans les hydrosystèmes: essai de synthèse. *Bulletin Français De La Pêche Et De La Pisciculture* 344/345, 455–470.
- Herrmann, A., Grabow, K., Martens, A., 2022. The invasive crayfish *Faxonius immunis* causes the collapse of macroinvertebrate communities in Central European ponds. *Aquatic Ecology* 5. <https://doi.org/10.1007/s10452-021-09935-5>

- Hoekstra, P.F., O'Hara, T.M., Fisk, A.T., Borgå, K., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. *Environmental Pollution* 124, 509–522. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00482-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00482-7)
- Hoffmann, B.D., Broadhurst, L.M., 2016. The economic cost of managing invasive species in Australia. *NeoBiota* 31, 1–18. <https://doi.org/10.3897/neobiota.31.6960>
- Hofkin, B. V., Hofinger, D.M., Koech, D.K., Loker, E.S., 1992. Predation of *Biomphalaria* and non-target molluscs by the crayfish *Procambarus clarkii*: implications for the biological control of schistosomiasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 86, 663–670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00034983.1992.11812723>
- Hoover, J.J., Murphy, C.E., Killgore, J., 2014. Ecological impacts of Suckermouth catfishes (*Loricariidae*) in North America: a conceptual model. *Aquatic Nuisance Species Research Program* 14, 1–20.
- Hopkins, G.W., Freckleton, R.P., 2002. Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: implications for conservation. *Animal Conservation* 5, 245–249. <https://doi.org/10.1017/S1367943002002299>
- Hossain, M.S., Kouba, A., Buřič, M., 2019. Morphometry, size at maturity, and fecundity of marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). *Zoologischer Anzeiger* 281, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2019.06.005>
- Houghton, R.J., Wood, C., Lambin, X., 2017. Size-mediated, density-dependent cannibalism in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) (Decapoda, Astacidea), an invasive crayfish in Britain. *Crustaceana* 90, 417–435. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003653>
- Hsieh, C., Huang, C., Pan, Y., 2016. Crayfish plague *Aphanomyces astaci* detected in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology* 136, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.03.015>
- Huber, J., 1963. Some physiological effects of the insecticide Kepone in the laboratory mouse. The Ohio State University.
- Hughes, S.J., 2006. Temporal and spatial distribution patterns of larval trichoptera in Madeiran streams. *Hydrobiologia* 553, 27–41. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-0627-1>
- Hulme, P.E., 2015. Resolving whether botanic gardens are on the road to conservation or a pathway for plant invasions. *Conservation Biology* 29, 816–824.
- ICMBio-MMA, 2018. Livro Vermelho da fauna Brasileira ameaçada de extinção, Volume V, anfíbios. Brasília.

- Itakura, K., Wakiya, R., Sakata, M.K., Hsu, H.-Y., Chen, S.-C., Yang, C.-C., Huang, Y.-C., Han, Y.-S., Yamamoto, S., Minamoto, T., 2020. Although populations of anguillid eels have declined remarkably in recent decades, monitoring data on the spatial and temporal variation in their dynamics are often limited, particularly for tropical eel. *Zoological Studies* 59.
- IUCN, 2020. The IUCN Red List of Threatened Species [WWW Document]. Version 2020-2.
- Jackson, A.L., Inger, R., Parnell, A.C., Bearhop, S., 2011. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER- stable isotope Bayesian ellipses in R. *J. Anim. Ecol.* 80, 595–602.
- Jackson, M.C., Evangelista, C., Zhao, T., Lecerf, A., Britton, J.R., Cucherousset, J., 2017. Between-lake variation in the trophic ecology of an invasive crayfish. *Freshwater Biology* 62, 1501–1510. <https://doi.org/10.1111/fwb.12957>
- Jennings, S., Cogan, S.M., 2015. Nitrogen and carbon stable isotope variation in northeast Atlantic fishes and squids. *Ecology* 96, 2568.
- Jo, T., Takao, K., Minamoto, T., 2022. Linking the state of environmental DNA to its application for biomonitoring and stock assessment: Targeting mitochondrial/nuclear genes, and different DNA fragment lengths and particle sizes. *Environmental DNA* 4, 271–283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/edn3.253>
- Joly, S., Davies, T.J., Archambault, A., Bruneau, A., Derry, A., Kembel, S.W., Peres-Neto, P., Vamosi, J., Wheeler, T.A., 2014. Ecology in the age of DNA barcoding: The resource, the promise and the challenges ahead. *Molecular Ecology Resources* 14, 221–232.
- Jones, C., 1990. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Department of Primary Industries Queensland.
- Jones, C., Lawton, J., Shachak, M., 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78, 1946–1957. [https://doi.org/https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1997\)078\[1946:PANEOO\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1890/0012-9658(1997)078[1946:PANEOO]2.0.CO;2)
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.
- Jones, K., de Voogt, P., 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution* 100, 209–221.
- Kaňuch, P., Berggren, Å., Cassel-Lundhagen, A., 2021. A clue to invasion success: genetic diversity quickly rebounds after introduction bottlenecks. *Biological Invasions* 23, 1141–1156. <https://doi.org/10.1007/s10530-020-02426-y>

- 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>
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Morin, A.E., Gobas, F.A.P.C., 2007. Food web-specific biomagnification of persistent organic pollutants. *Science* 317, 236–239. <https://doi.org/10.1126/science.1138275>
- Kerr, P.J., 2012. Myxomatosis in Australia and Europe: A model for emerging infectious diseases. *Antiviral Research* 93, 387–415. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.01.009>
- Kettunen, M., Genovesi, P., Gollasch, S., Pagad, S., Starfinger, U., Ten Brink, P., Shine, C., 2009. Technical Support to EU Strategy on Invasive Species (IAS) - Assessment of the Impacts of IAS in Europe and the EU (Final Module Report for the European Commission) Brussels, Belgium.
- Kilpatrick, A.M., Briggs, C.J., Daszak, P., 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution* 25, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.07.011>
- King, C., 1993. Potential fecundity of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* von Martens, in culture. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90299-E](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90299-E)
- King, C.R., 1994. Growth and survival of redclaw crayfish hatchlings (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in relation to temperature, with comments on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland. *Aquaculture* 122, 75–80. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90335-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90335-2)
- Kirjavainen, J., Westman, K., 1999. Natural history and development of the introduced signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in a small, isolated Finnish lake, from 1968 to 1993. *Aquatic Living Resources* 12, 387–401. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(99\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)00110-2)
- Konishi, M., Takata, K., 2004. Impact of asymmetrical hybridization followed by sterile F-1 hybrids on species replacement in *Pseudorasbora*. *Conservation Genetics* 5, 463–474.
- 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., Petrušek, A., Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish

- species in Europe: Update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014007>
- Kraus, F., 2009. Alien reptiles and amphibians, in: *Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology*. pp. 133–369.
- Krieg, R., King, A., Zenker, A., 2020. Measures to Control Invasive Crayfish Species in Switzerland: A Success Story? *Frontiers in Environmental Science* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.609129>
- Krist, A.C., 2002. Crayfish induce a defensive shell shape in a freshwater snail. *Invertebrate Biology* 121, 235–242. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2002.tb00063.x>
- Lafontaine, A., 2017. Effets du chlordécone chez *Macrobrachium rosenbergii*: Bioaccumulation, élimination et perturbation des processus biologiques liés au système endocrinien.
- Lafontaine, A., Gismondi, E., Boulangé-lecomte, C., Geraudie, P., Dodet, N., Caupos, F., Lemoine, S., Lagadic, L., Thomé, J., Forget-leray, J., 2016a. Effects of chlordecone on 20-hydroxyecdysone concentration and chitobiase activity in a decapod crustacean, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic Toxicology* 176, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.006>
- Lafontaine, A., Gismondi, E., Dodet, N., Caupos, F., Lemoine, S., Lagadic, L., 2017. Bioaccumulation, distribution and elimination of chlordecone in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Field and laboratory studies. *Chemosphere* 185, 888–898. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.099>
- Lafontaine, A., Hanikenne, M., Boulangé-Lecomte, C., Forget-Leray, J., Thomé, J.P., Gismondi, E., 2016b. Vitellogenin and vitellogenin receptor gene expression and 20-hydroxyecdysone concentration in *Macrobrachium rosenbergii* exposed to chlordecone. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 20661–20671. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7273-1>
- Landi, M., Piazzini, S., Saveri, C., 2014. The response of amphibian communities to fish and habitat features in Mediterranean permanent ponds. *Biologia* 69, 806–810.
- Lang, I., Evangelista, C., Everts, R.M., Loot, G., Cucherousset, J., 2020. Stable resource polymorphism along the benthic littoral–pelagic axis in an invasive crayfish. *Ecology and Evolution* 10, 2650–2660. <https://doi.org/10.1002/ece3.6095>
- Lawrence, C., Jones, C., 2002. *Cherax*, in: *Biology of Freshwater Crayfish*.
- 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>
- Lawton, J.H., May, R.M., 1996. Extinction rates. *Journal of Evolutionary Biology* 9, 124–126.
- LeBlanc, G.A., 2007. Crustacean endocrine toxicology: A review. *Ecotoxicology* 16, 61–81. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0115-z>
- Liebhold, A.M., MacDonald, W.L., Bergdahl, D., Mastro, V.C., 1995. Invasion by Exotic Forest Pests: A Threat to Forest Ecosystems. *Forest Science* 41, a0001-z0001. <https://doi.org/10.1093/forestscience/41.s1.a0001>
- Lim, P., Meunier, F.J., Keith, P.A., Noël, P.Y., 2002. Atlas des poissons et des crustacés d'eau douce de la Martinique, Collection patrimoines naturels.
- Linzmaier, S.M., Musseau, C., Matern, S., Jeschke, J.M., 2020. Trophic ecology of invasive marbled and spiny-cheek crayfish populations. *Biological Invasions* 22, 3339–3356. <https://doi.org/10.1007/s10530-020-02328-z>
- Lipták, B., Veselý, L., Ercoli, F., Bláha, M., Buřič, M., Ruokonen, T., Kouba, A., 2019. Trophic role of marbled crayfish in a lentic freshwater ecosystem Boris. *Aquatic Invasions* 14, 299–309. <https://doi.org/https://doi.org/10.3391/ai.2019.14.2.09>
- Lodge, David M, Deines, A., Gherardi, F., Yeo, D.C.J., Arcella, T., Baldrige, A.K., Barnes, M.A., Chadderton, W.L., Feder, J.L., Gantz, C.A., Howard, G.W., Jerde, C.L., Peters, B.W., Peters, J.A., Sargent, L.W., Turner, C.R., Wittmann, M.E., Zeng, Y., 2012. Global Introductions of Crayfishes: Evaluating the Impact of Species Invasions on Ecosystem Services. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 449–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-111511-103919>
- Lodge, D.M., Williams, S., MacIsaac, H.J., Hayes, K.R., Leung, B., Reichard, S., Mack, R.N., Moyle, P.B., Smith, M., Andow, D.A., Al, E., 2006. Biological invasions: Recommendations for U.S. policy and management. *Ecological Applications* 16, 2035–2054.
- Longshaw, M., 2011. Diseases of crayfish: A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106, 54–70.
- Loureiro, T.G., Anastácio, P.S.M.G., Souty-Grosset, C., Araujo, P.B., Almerão, M.P., 2015. Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion - an overview. *Nauplius* 23, 1–19.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M., 2000. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A selection from the global Invasive Species Database. *Aliens* 12, 12.
- Lukhaup, C., 2001. *Procambarus* sp. The Marbled crayfish. *Aquaristik Aktuell* 7–8, 48–

- Mack, R.N., 2003. Phylogenetic Constraint , Absent Life Forms , and Preadapted Alien Plants : A Prescription for Biological Invasions Author (s): Richard N . Mack Reviewed work (s): Source : International Journal of Plant Sciences , Vol . 164 , No . S3 , Evolution of F. International Journal of Plant Science 164, 185–196.
- Maddi, F.A., 2014. Contribution à l’inventaire de la flore dulçaquicole de la Martinique : les « espèces exotiques envahissantes ». Bilan des prospections.
- Madzivanzira, T.C., South, J., Wood, L.E., Nunes, A.L., Madzivanzira, T.C., South, J., Wood, L.E., Nunes, A.L., 2020. A Review of Freshwater Crayfish Introductions in Africa. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 0, 1–24. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1802405>
- Magurran, A.E., 2009. Threats to freshwater fish. *Science* 325, 1215.
- 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>
- Major, P., Claude, J.-P., 2021. Les milieux humides dans le paysage des Petites Antilles : étude des mares de la Martinique. *VertigO - la revue électronique en sciences de l’environnement* 21.
- Manchester, S.J., Bullock, J.M., 2000. The impacts of non-native species on UK biodiversity and the effectiveness of control. *Journal of Applied Ecology* 37, 845–864. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2000.00538.x>
- Manfrin, C., Souty-Grosset, C., Anastácio, P.M., Reynolds, J., Giulianini, P.G., 2019. Detection and control of invasive freshwater crayfish: From traditional to innovative methods. *Diversity* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3390/d11010005>
- Marques, L., Renesto, E., 2017. Genetic variability and evidence of founder effect in *Hemiodus orthonops* (Characiformes: Hemiodontidae) from the upper Paraná River basin, Brazil. *Biological Sciences* 39, 53–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v39i1.31793>
- Martín-Torrijos, L., Martínez-Ríos, M., Casabella-Herrero, G., Adams, S.B., Jackson, C.R., Diéguez-Uribeondo, J., 2021. Tracing the origin of the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, to the Southeastern United States. *Scientific Reports* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88704-8>
- Martin, C.W., Valentine, M.M., Valentine, J.F., 2010. Competitive interactions between invasive nile tilapia and native fish: The potential for altered trophic exchange and modification of food webs. *PLoS ONE* 5, 57–59. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014395>

- Martin, D., Lobo, F., Lavison-Bompard, G., Guérin, T., Parinet, J., 2020. Effect of home cooking processes on chlordecone content in beef and investigation of its by-products and metabolites by HPLC-HRMS/MS. *Environment International* 144, 106077. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106077>
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorokrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften* 94, 843–846.
- Marufu, L., Barson, M., Chifamba, P., Tiki, M., Nhiwatiwa, T., 2018a. The Population Dynamics of a Recently Introduced Crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868), in the Sanyati Basin of Lake Kariba, Zimbabwe. *African Zoology* 53, 17–22. <https://doi.org/10.1080/15627020.2018.1448719>
- Marufu, L., Dalu, T., Crispen, P., Barson, M., Simango, R., Utete, B., Nhiwatiwa, T., 2018b. The diet of an invasive crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868), in Lake Kariba, inferred using stomach content and stable isotope analyses. *BioInvasions Records* 7, 121–132. <https://doi.org/10.3391/bir.2018.7.2.03>
- Mascaro, J., Harris, J.A., Lach, L., Thompson, A., Perring, M., Richardson, D.M., Ellis, E.C., 2013. Origins of the novel ecosystems concept in: *Novel Ecosystems: Intervening in the New Ecological World Order*.
- McCutchan Jr, J.H., Lewis Jr, W.M., Kendall, C., McGrath, C.C., 2003. Variation in Trophic Shift for Stable Isotope Ratios of Carbon, Nitrogen, and Sulfur. *Oikos* 102, 378–390.
- McMahon, B., 2002. Physiological adaptation to environment., in: Holdich D.M. (Ed) *Biology of Freshwater Crayfish*. pp. 327– 376.
- McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1235–1244. <https://doi.org/10.1139/f02-105>
- Mcquaid, C.D., Arenas, F., 2009. Climate change and the loss of marine ecosystem engineers. *Journal of Marine Research* 309–320. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-92704-4>
- Medeiros, E.L., Henry-Silva, G.G., 2017. Evaluation of the feeding preference between the aquatic macrophytes *Egeria densa* and *Chara indica* by the invasive mollusk *Melanoides tuberculata*. *Brazilian Journal of Biology* 77, 234–239. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.08415>
- Meira, A., Lopes-Lima, M., Varandas, S., Teixeira, A., Arenas, F., Sousa, R., 2019. Invasive crayfishes as a threat to freshwater bivalves: Interspecific differences and conservation implications. *Science of the Total Environment* 649, 938–948. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.341>

- Michelet, P., 2017. La biodiversité des milieux aquatiques continentaux en France métropolitaine: état des lieux et menaces. *Annales des Mines-Responsabilité et environnement* 2, 36–39.
- Miller-Rushing, A.J., Lloyd-Evans, T.L., Primack, R.B., Satzinger, P., 2008. Bird migration times, climate change, and changing population sizes. *Global Change Biology* 14, 1959–1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01619.x>
- Momot, W.T., 1995. Reviews in Fisheries Science Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems Redefining the Role of Crayfish in Aquatic Ecosystems, Reviews in Fisheries Science. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/10641269509388566>
- Monde, C., Syampungani, S., Rico, A., van den Brink, P.J., 2017. The potential for using red claw crayfish and hybrid African catfish as biological control agents for *Schistosoma* host snails. *African Journal of Aquatic Science* 42, 235–243. <https://doi.org/10.2989/16085914.2017.1373245>
- Montes, C., Bravo-Utrera, M., Baltanás, A., Duarte, C., Gutiérrez-Yurrita, P., 1993. Bases ecológicas para la gestión del cangrejo rojo de las marismas en el Parque Nacional de Donana. ICONA, Ministerio de Agricultura y Pesca, Madrid, Spain.
- Moodley, D., Angulo, E., Cuthbert, R.N., Leung, B., Turbelin, A., Novoa, A., Kourantidou, M., Heringer, G., Haubrock, P.J., Renault, D., Robuchon, M., Fantle-Lepczyk, J., Courchamp, F., Diagne, C., 2022. Surprisingly high economic costs of biological invasions in protected areas. *Biological Invasions*. <https://doi.org/10.1007/s10530-022-02732-7>
- Mooney, H.A., Cleland, E.E., 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5446–5451. <https://doi.org/10.1073/pnas.091093398>
- Morandi, B., Rivière-Honegger, A., Cottet, M., 2018. La pêche en rivière en Martinique : quels sont les enjeux d’une patrimonialisation socio-environnementale ? *Etudes caribéennes* 41. <https://doi.org/https://doi.org/10.4000/etudescaribeennes.13857>
- Multigner, L., Ndong, J.R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., Jégou, B., Thome, J.P., Blanchet, P., 2010. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, 3457–3462. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.2153>
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nagasawa, K., Kim, Y., Hirose, H., 1994. *Anguillicola crassus* and *A. globiceps* (Nematoda: Dracunculoidea) parasitic in the swimbladder of eels (*Anguilla*

- japonica* and *A. anguilla*) in East Asia: a review. *Folia Parasit* 41, 87–93.
- Nivet, C., Mc Key, D., Legris, C., 2010. Connaissance et gestion des écosystèmes tropicaux. Résultats du programme de recherche « écosystèmes Tropicaux » 2005 - 2010. Paris.
- Nunes, A.L., Tricarico, E., Panov, V.E., Cardoso, A.C., Katsanevakis, S., 2015. Pathways and gateways of freshwater invasions in Europe. *Aquatic Invasions* 10, 359–370. <https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.4.01>
- Nunes, A.L., Zengeya, T.A., Hoffman, A.C., John Measey, G., Weyl, O.L.F., 2017. Distribution and establishment of the alien australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in South Africa and Swaziland. *PeerJ* 2017. <https://doi.org/10.7717/peerj.3135>
- 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/https://doi.org/10.1163/20021975-99990099>
- Nyström, P., Pérez, J.R., 1998. Crayfish predation on the common pond snail (*Lymnaea stagnalis*): The effect of habitat complexity and snail size on foraging efficiency. *Hydrobiologia* 368, 201–208. <https://doi.org/10.1023/a:1003266603371>
- Nyström, P., Strand, J.A., 1996. Grazing by a native and an exotic crayfish on aquatic macrophytes. *Freshwater Biology* 36, 673–682. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1996.d01-508.x>
- Oficialdegui, F.J., Clavero, M., Sánchez, M.I., Green, A.J., Boyero, L., Michot, T.C., Klose, K., Kawai, T., Lejeusne, C., 2019. 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., Lejeusne, C., Pacini, N., Clavero, M., 2020. Brought more than twice: the complex introduction history of the red swamp crayfish into Europe. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*. <https://doi.org/10.1051/kmae/2019044>
- Ogutu-Ohwayo, R., 1993. The Effects of Predation by Nile Perch, *Lates niloticus* L., on the Fish of Lake Nabugabo, with Suggestions for Conservation of Endangered Endemic Cichlids. *Conservation Biology* 7, 701–711. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1993.07030701.x>
- Okolle, J.N., Fansi, G.H., Lombi, F.M., Lang, P.S., Loubana, P.M., 2009. Banana Entomological Research in Cameroon: How Far and What Next? *The African Journal of Plant Science and biotechnology* 3, 1–19.
- Olsson, K., Stenroth, P., Nystrom, P., 2009. Invasions and niche width: does niche

- width of an introduced crayfish differ from a native crayfish? *Freshwater Biology* 54, 1731–1740.
- Orfinger, A.B., Goodding, D.D., 2018. The global invasion of the suckermouth armored catfish genus *pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae): Annotated list of species, distributional summary, and assessment of impacts. *Zoological Studies* 57. <https://doi.org/10.6620/ZS.2018.57-07>
- Pacioglu, O., Zubrod, J.P., Schulz, R., Jones, J.I., Pârvulescu, L., 2019. Two is better than one: combining gut content and stable isotope analyses to infer trophic interactions between native and invasive species. *Hydrobiologia* 839, 25–35. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-03990-8>
- Paillisson, J.M., Soudieux, A., Damien, J.P., 2011. Capture efficiency and size selectivity of sampling gears targeting red-swamp crayfish in several freshwater habitats. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. <https://doi.org/10.1051/kmae/2011015>
- Papavasopoulou, I., Perdikaris, C., Vardakas, L., Paschos, I., 2014. Enemy at the gates: Introduction potential of non-indigenous freshwater crayfish in Greece via the aquarium trade. *Central European Journal of Biology* 9, 11–18. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0120-6>
- Parkyn, S.M., Collier, K.J., Hicks, B.J., 2001. New Zealand stream crayfish: functional omnivores but trophic predators? *Freshwater Biology* 46, 641–652. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00702.x>.
- Patel, S., 2012. Threats, management and envisaged utilizations of aquatic weed *Eichhornia crassipes*: an overview. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 11, 249–259.
- Pears, N., 1982. Familiar aliens: the acclimatisation societies' role in New Zealand's biogeography. *Scottish Geographical Magazine* 98, 23–34.
- Peay, S., Dunn, A.M., Kunin, W.E., McKimm, R., Harrod, C., 2015. A method test of the use of electric shock treatment to control invasive signal crayfish in streams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 25, 874–880.
- Peay, S., Guthrie, N., Spees, J., Nilsson, E., Bradley, P., 2009. The impact of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) on the recruitment of salmonid fish in a headwater stream in Yorkshire, England . *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 12. <https://doi.org/10.1051/kmae/2010003>
- Peay, S., Hiley, P.D., Collen, P., Martin, I., 2006. Biocide treatment of ponds in Scotland to eradicate signal crayfish, in: *BFPP - Bulletin Francais de La Peche et de La Protection Des Milieux Aquatiques*. <https://doi.org/10.1051/kmae:2006041>
- Pereira, G.B., 2019. Trophic ecology of two aquatic invaders , the red swamp and the

- signal crayfish , in North-eastern Portugal. Porto.
- Petrusek, A., Filipová, L., Kozubíková-Balcarová, E., Grandjean, F., 2017. High genetic variation of invasive signal crayfish in Europe reflects multiple introductions and secondary translocations. *Freshwater Science*. <https://doi.org/10.1086/694866>
- Phillips, B.L., 2009. The evolution of growth rates on an expanding range edge. *Biology Letters* 5, 802–804. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0367>
- Phillips, D., Inger, R., Bearhop, S., 2014. Best practices for use of stable isotope mixing models in food-web studies. *Canadian Journal of Zoology* 92, 823–835.
- Piazza, F., Aquiloni, L., Peruzza, L., Manfrin, C., Simi, S., Marson, L., Edomi, P., Giulianini, P.G., 2015. Managing of *Procambarus clarkii* by X-ray sterilisation of males: Cytological damage to gonads. *Micron* 77, 32–40.
- Pimentel, D., Lach, L., Zuniga, R., Morrison, D., 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *BioScience* 50, 53–65. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0053:EAECON\]2.3.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0053:EAECON]2.3.CO;2)
- Pimentel, D., Zuniga, R., Morrison, D., 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52, 273–288. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2004.10.002>
- Polo-Cavia, N., López, P., Martín, J., 2011. Aggressive interactions during feeding between native and invasive freshwater turtles. *Biological Invasions* 13, 1387–1396. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9897-2>
- Pompanon, F., Deagle, B., Symondson, W., 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* 21, 1931–1950.
- Post, D., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83, 703–718.
- Post, D.M., Pace, M.L., Hairston Jr, N.G., 2000. Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature* 405, 1047–1049.
- Poulin, R., Paterson, R.A., Townsend, C.R., Tompkins, D.M., Kelly, D.W., 2011. Biological invasions and the dynamics of endemic diseases in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* 56, 676–688. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02425.x>
- Prabu, E., Rajagopalsamy, C.B.T., Ahilan, B., Jegan Michael Andro Jeevagan, I., Renuhadevi, M., 2019. Tilapia - An excellent candidate species for world aquaculture: A review. *Annual Research and Review in Biology* 31, 1–14.
- Rabalais, M.R., Magoulick, D.D., 2006. Is competition with the invasive crayfish

- Orconectes neglectus chaenodactylus* responsible for the displacement of the native crayfish *Orconectes eupunctus*? *Biological Invasions* 8, 1039–1048. <https://doi.org/10.1007/s10530-005-4649-4>
- Raposeiro, P.M., Cruz, A.M., Hughes, S.J., Costa, A.C., 2012. Azorean freshwater invertebrates: status, threats and biogeographic notes. *Limnetica* 31, 13–22.
- Raposeiro, P.M., Ramos, J.C., Costa, A.C., 2009. First record of *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892 (Oligochaeta: Tubificidae) in Azores. *Aquatic Invasions* 4, 487–490. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.3.8>
- Raposeiro, P.M., Rubio, M.J., González, A., Hernández, A., Sánchez-López, G., Vázquez-Loureiro, D., Rull, V., Bao, R., Costa, A.C., Gonçalves, V., Sáez, A., Giralt, S., 2017. Impact of the historical introduction of exotic fishes on the chironomid community of Lake Azul (Azores Islands). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 466, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2016.11.015>
- Renai, B., Gherardi, F., 2004. Predatory efficiency of crayfish: Comparison between indigenous and non-indigenous species. *Biological Invasions* 6, 89–99. <https://doi.org/10.1023/B:BINV.0000010126.94675.50>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155102>
- Renault, D., Laparie, M., McCauley, S.J., Bonte, D., 2018. Environmental Adaptations, Ecological Filtering, and Dispersal Central to Insect Invasions. *Annual Review of Entomology* 63, 345–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043315>
- Reynolds, J., Souty-Grosset, C., Richardson, A., 2013. Ecological roles of crayfish in freshwater and terrestrial habitats. *Freshwater Crayfish* 19, 197–218. <https://doi.org/10.5869/fc.2013.v19-2.197>
- Reynolds, J.D., 2011. A review of ecological interactions between crayfish and fish, indigenous and introduced. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 1–21. <https://doi.org/10.1051/kmae/2011024>
- Rodríguez-Barreras, R., Zapata-Arroyo, C., Falcón L, W., Olmeda, M.D.L., 2020. An island invaded by exotics: a review of freshwater fish in Puerto Rico. *Neotropical Biodiversity* 6, 42–59. <https://doi.org/10.1080/23766808.2020.1729303>
- Romanuk, T.N., Zhou, Y., Brose, U., Berlow, E.L., Williams, R.J., Martinez, N.D., 2009. Predicting invasion success in complex ecological networks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 1743–1754. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0286>

- Rong, Y., Tang, Y., Ren, L., Taylor, W.D., Razlutskiy, V., Naselli-Flores, L., Liu, Z., Zhang, X., 2021. Effects of the filter-feeding benthic bivalve *Corbicula fluminea* on plankton community and water quality in aquatic ecosystems: A mesocosm study. *Water (Switzerland)* 13, 1–12. <https://doi.org/10.3390/w13131827>
- Rubio, V.Y., Gibbs, M.A., Work, K.A., Bryan, C.E., 2016. Abundant feces from an exotic armored Catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus* (Weber, 1991), create nutrient hotspots and promote algal growth in a Florida Spring. *Aquatic Invasions* 11, 337–350. <https://doi.org/10.3391/ai.2016.11.3.11>
- Ruokonen, T.J., Karjalainen, J., Hämäläinen, H., 2013. Effects of an invasive crayfish on the littoral macroinvertebrates of large boreal lakes are habitat specific. *Freshwater Biology* 59, 12–25.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L.R., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H., 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287, 1770–1774. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1770>
- Schloegel, L.M., Toledo, L.F., Longcore, J.E., Greenspan, S.E., Vieira, C.A., Lee, M., Zhao, S., Wangen, C., Ferreira, C.M., Hipolito, M., Davies, A.J., Cuomo, C.A., Daszak, P., James, T.Y., 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology* 21, 5162–5177.
- Schrimpf, A., Schmidt, T., Schulz, R., 2014. Invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) transmits crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *Aquatic Invasions* 9, 203–209. <https://doi.org/10.3391/ai.2014.9.2.09>
- Secondi, J., Dejean, T., Valentini, A., Audebaud, B., Miaud, C., 2016. Detection of a global aquatic invasive amphibian, *Xenopus laevis*, using environmental DNA. *Amphibia Reptilia* 37, 131–136. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003036>
- Seebens, H., 2015. Global trade will accelerate plant invasions in emerging economies under climate change. *Global Change Biology* 21, 4128–4140.
- Seebens, H., Blackburn, T.M., Dyer, E.E., Genovesi, P., Hulme, P.E., Jeschke, J.M., Pagad, S., Pyšek, P., Winter, M., Arianoutsou, M., Bacher, S., Blasius, B., Brundu, G., Capinha, C., Celesti-Grapow, L., Dawson, W., Dullinger, S., Fuentes, N., Jäger, H., Kartesz, J., Kenis, M., Kreft, H., Kühn, I., Lenzner, B., Liebhold, A., Mosena, A., Moser, D., Nishino, M., Pearman, D., Pergl, J., Rabitsch, W., Rojas-Sandoval, J., Roques, A., Rorke, S., Rossinelli, S., Roy, H.E., Scalera, R., Schindler, S., Štajerová, K., Tokarska-Guzik, B., Van Kleunen, M., Walker, K., Weigelt, P., Yamanaka, T., Essl, F., 2017. No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nature Communications* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms14435>
- Serge, S., 1994. La lutte intégrée contre le charançon noir des bananiers, *Cosmopolites*

- sordidus*. *Fruits* 49, 151–162.
- Shea, K., Chesson, P., 2002. Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 17, 170–176. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02495-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02495-3)
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26, 1135–1145.
- Sibley, P., 2000. Signal crayfish management in the River Wreake catchment, in: *Proceedings of the Crayfish Conference, Leeds, UK, 26-27 April 2000*. pp. 95–108.
- Šidagytė, E., Razlutskiy, V., Alekhnovich, A., Rybakovas, A., Moroz, M., Šniaukštaitė, V., Vaitonis, G., Arbačiauskas, K., 2017. Predatory diet and potential effects of *Orconectes limosus* on river macroinvertebrate assemblages of the Southeastern Baltic Sea Basin: Implication for ecological assessment. *Aquatic Invasions* 12, 523–540. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.4.09>
- Simberloff, D., 2009. The Role of Propagule Pressure in Biological Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40, 81–102.
- Simberloff, D., Stiling, P., 1996. Risks of species introduced for biological control. *Biological Conservation* 78, 185–192.
- 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., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P., 2006. Atlas of crayfish in Europe. *Collection Patrimoines naturels* 64, 187.
- Stachowicz, J.J., Byrnes, J.E., 2006. Species diversity, invasion success, and ecosystem functioning: Disentangling the influence of resource competition, facilitation, and extrinsic factors. *Marine Ecology Progress Series* 311, 251–262. <https://doi.org/10.3354/meps311251>
- Stansfield, J.H., Perrow, M.R., Tench, L.D., Jowitt, A.J.D., Taylor, A.A.L., 1997. Submerged macrophytes as refuges for grazing *Cladocera* against fish predation: observations on seasonal changes in relation to macrophyte cover and predation pressure. *Hydrobiologia* 342/343, 229–240.
- Stein, R.A., 1976. Sexual dimorphism in crayfish chelae: functional significance linked to reproductive activities. *Canadian Journal of Zoology* 54, 220–227. <https://doi.org/10.1139/z76-024>
- Stock, B.C., Semmens, B.X., 2016. MixSIAR GUI User Manual. Version 3.1. <https://github.com/brianstock/MixSIAR/>.

<https://doi.org/doi:10.5281/zenodo.47719>.

- Strayer, D.L., D'Antonio, C.M., Essl, F., Fowler, M.S., Geist, J., Hilt, S., Jarić, I., Jöhnk, K., Jones, C.G., Lambin, X., Latzka, A.W., Pergl, J., Pyšek, P., Robertson, P., von Schmalensee, M., Stefansson, R.A., Wright, J., Jeschke, J.M., 2017. Boom-bust dynamics in biological invasions: towards an improved application of the concept. *Ecology Letters* 20, 1337–1350. <https://doi.org/10.1111/ele.12822>
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., et al, 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783–1786.
- Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Kouba, A., Diéguez-Uribeondo, 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, 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. *Freshwater Biology* 59, 918–929. <https://doi.org/10.1111/fwb.12315>
- Swahn, J.-O., 2004. The Cultural History Of Crayfish. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 372–373.
- Tilman, D., 1997. Community Invasibility, Recruitment Limitation, and Grassland Biodiversity. *Ecology* 78, 81. <https://doi.org/10.2307/2265980>
- Tricarico, E., Vilizzi, L., Gherardi, F., Copp, G.H., 2010. Calibration of FI-ISK , an Invasiveness Screening Tool for Nonnative Freshwater Invertebrates 30. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2009.01255.x>
- Tropea, C., Piazza, Y., López, L.S., 2010. Effect of Long-Term Exposure to High Temperature on Survival, Growth and Reproductive Parameters of the 'Redclaw' Crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 302, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.027>
- 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>
- Tyler, M.J., 1989. Australian frogs.
- Tyler, M.J., 1976. Frogs.
- Uller, T., Leimu, R., 2011. Founder events predict changes in genetic diversity during human-mediated range expansions. *Global Change Biology* 17, 3478–3485.
- van Kessel, N., Dorenbosch, M., de Boer, M.R.M., Leuven, R.S.E.W., van der Velde, G.,

2011. Competition for shelter between four invasive gobiids and two native benthic fish species. *Current Zoology* 57, 844–851. <https://doi.org/10.1093/czoolo/57.6.844>
- Vander Zanden, M., Rasmussen, J., 1999. Primary consumer d13C and d15N and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* 80, 1395–1404.
- Vander Zanden, M.J., Rasmussen, J.B., 2001. Variation in deltaN-15 and delta C-13 trophic fractionation: Implication for aquatic food web studies. *Limnol. Oceanogr.* 46, 2061–2066.
- Vermeij, G.J., 1978. Coevolution of freshwater gastropods and their predators. *The American Naturalist* 112, 833–843.
- Vilcinskas, A., 2015. Pathogens as Biological Weapons of Invasive Species. *PLoS Pathogens* 11, 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004714>
- Vitousek, P.M., Loope, L.L., Westbrooks, R., 1996. Biological invasions as global environmental change. *American Scientist* 218–229.
- Wang, Y., Tan, W., Li, B., Wen, L., Lei, G., 2021. Habitat alteration facilitates the dominance of invasive species through disrupting niche partitioning in floodplain wetlands. *Diversity and Distributions* 27, 1861–1871. <https://doi.org/10.1111/ddi.13376>
- Wania, F., Mackay, D., 1996. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Technology* 30. [https://doi.org/10.1016/s0926-3373\(97\)80026-4](https://doi.org/10.1016/s0926-3373(97)80026-4)
- Weber, M.J., Brown, M.L., 2011. Relationships among invasive common carp, native fishes and physicochemical characteristics in upper Midwest (USA) lakes. *Ecology of Freshwater Fish* 20, 270–278. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2011.00493.x>
- Weis, J.S., 2011. Invasion and predation in aquatic ecosystems. *Current Zoology* 57, 613–624. <https://doi.org/10.1093/czoolo/57.5.613>
- Wheeler, Q.D., Raven, P.H., Wilson, E.O., 2004. Taxonomy: impediment or expedient? *Science* 303, 285. <https://doi.org/10.1126/science.303.5656.285>
- Whitledge, G.W., Rabeni, C.F., 1997. Energy Sources and Ecological Role of Crayfishes in an Ozark Stream: insights from stable isotopes and gut analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 2555–2563. <https://doi.org/10.1139/cjfas-54-11-2555>
- Wingfield, M., 2002. An overview of the Australian freshwater crayfish farming industry. *Freshwater Crayfish* 13, 177–184.

- 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. 164 p.
- Yalçın Özdilek, Ş., Partal, N., Jones, R.I., 2019. An invasive species, *Carassius gibelio*, alters the native fish community through trophic niche competition. *Aquatic Sciences* 81, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00027-019-0623-6>
- Yamamoto, Y., 2010. Contribution of bioturbation by the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* to the recruitment of bloom-forming cyanobacteria from sediment. *Journal of Limnology* 69, 9. <https://doi.org/10.3274/JL10-69-1-09>
- Zenetos, A., Gofas, S., Morri, C., Rosso, A., Violanti, D., García Raso, J.E., Çinar, M.E., Almogi-Labin, A., Ates, A.S., Azzurro, E., Ballesteros, E., Bianchi, C.N., Bilecenoglu, M., Gambi, M.C., Giangrande, A., Gravili, C., Hyams-Kaphzan, O., Karachle, P.K., Katsanevakis, S., Lipej, L., Mastrototaro, F., Mineur, F., Pancucci-Papadopoulou, M.A., Ramos Esplá, A., Salas, C., San Martín, G., Sfriso, A., Streftaris, N., Verlaque, M., 2012. Alien species in the Mediterranean Sea by 2012. A contribution to the application of European Union's Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part 2. Introduction trends and pathways. *Mediterranean Marine Science* 13, 328-352. <https://doi.org/10.12681/mms.327>
- Zhang, X., Mei, X., Gulati, R.D., 2017. Effects of omnivorous tilapia on water turbidity and primary production dynamics in shallow lakes: implications for ecosystem management. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 27, 245-254. <https://doi.org/10.1007/s11160-016-9458-6>
- Zhang, Y., Qin, B., Zhu, G., Shi, K., Zhou, Y., 2018. Profound Changes in the Physical Environment of Lake Taihu From 25 Years of Long-Term Observations: Implications for Algal Bloom Outbreaks and Aquatic Macrophyte Loss. *Water Resources Research* 54, 4319-4331. <https://doi.org/10.1029/2017WR022401>

Annexes

Annexe 1

Planche illustrée des espèces majoritairement retrouvées dans les hydrosystèmes d'eau douce de Martinique, ainsi que leurs caractéristiques écologiques : de gauche à droite, les crustacés, les poissons et les mollusques.

Illustration	Informations relatives à l'espèce
	<i>Guinotia dentata</i> ; Cirrique des rivières Famille des <i>Pseudothelphusidae</i> Cours d'eau supérieurs et moyens, en zone calme ; creuse les berges. Omnivore
	<i>Macrobrachium faustinum</i> ; « Alexis, Gros mordant » Famille des <i>Palaemonidae</i> Milieux calmes et peu profonds Statut migratoire amphidrome Omnivore Endémique des Antilles
	<i>Macrobrachium crenulatum</i> ; « Queue rouge » Famille des <i>Palaemonidae</i> Aussi bien les milieux rapides de type radier que les fosses profondes et calmes Statut migratoire amphidrome Omnivore
	<i>Macrobrachium acanthurus</i> ; « Grand bras » Famille des <i>Palaemonidae</i> Occupe les zones calmes de basse altitude, près des berges végétalisées Statut migratoire amphidrome
	<i>Macrobrachium carcinus</i> ; « Z'habitant » Famille des <i>Palaemonidae</i> Occupe aussi bien les milieux rapides que ceux à faciès lent Statut migratoire amphidrome
	<i>Xiphocaris elongata</i> ; « Pissette » Famille des <i>Xiphocarididae</i> Statut migratoire amphidrome Zones calmes, près des berges végétalisées Endémique des Antilles
	<i>Micratoryx poeyi</i> ; « Petit bouc » Famille des <i>Atyidae</i> Statut migratoire amphidrome Affectionne les faciès d'écoulement rapide Endémique des Antilles
	<i>Atya scabra</i> ; « Grand bouc » Famille des <i>Atyidae</i> Statut migratoire amphidrome Affectionne les zones turbulentes, de type cascade, radier.
	<i>Neocaridina davidi</i> ; « Red Cherry » Famille des <i>Atyidae</i> Introduite en Martinique (aquariophilie) Présence avérée sur 2 sites, en zone calme, en basse altitude.

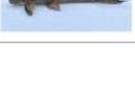
Illustration	Informations relatives à l'espèce
	<i>Sicydium plumieri</i> ; « Colle-roche » Famille des <i>Gobiidae</i> Statut migratoire amphidrome Affectionne les faciès d'écoulement rapide
	<i>Sicydium punctatum</i> ; « Colle-roche » Famille des <i>Gobiidae</i> Statut migratoire amphidrome Affectionne les faciès d'écoulement rapide
	<i>Agonostomus monticola</i> ; « Mulet des montagnes » Famille des <i>Mugilidae</i> Statut migratoire catadrome Faciès d'écoulement lent à rapide, suivant le stade de vie
	<i>Eleotris perniger</i> ; « Flèche » Famille des <i>Eleotridae</i> Statut migratoire amphidrome Affectionne les faciès plats courants, le long des berges végétalisées Endémique des Antilles
	<i>Anguilla rostrata</i> ; « Anguille » Famille des <i>Anguillidae</i> Statut migratoire catadrome Occupe les milieux profonds (fosses) où elle va rechercher des abris tels que les cavités et les enrochements
	<i>Poecilia reticulata</i> ; « Guppy » Famille des <i>Poeciliidae</i> Largement présent en Martinique, dans les eaux calmes préférentiellement Introduit en Martinique (aquariophilie)
	<i>Anablepsoides cryptocallus</i> Famille des <i>Rivulidae</i> Occupe les bras morts de rivière ou les zones humides, semi-connectées aux cours d'eau Endémique strict de Martinique
	<i>Hypostomus robinii</i> ; « Pléco » Famille des <i>Loricaridae</i> Occupe toutes les faciès d'écoulement, avec une préférence pour les zones calmes. Introduit en Martinique (aquariophilie)

Illustration	Informations relatives à l'espèce
	<i>Melanoides tuberculata</i> Famille des <i>Thiaridae</i> Espèce parthénogénétique Affectionne les zones calmes, où il va occuper les fonds sablonneux, plutôt en zone aval. Introduit et naturalisé en Martinique
	<i>Tarebia granifera</i> Famille des <i>Thiaridae</i> Espèce parthénogénétique Affectionne les zones calmes, où ils vont occuper les substrats rocheux, en zone aval. Introduit et naturalisé en Martinique
	Famille des <i>Neritidae</i> Statut migratoire amphidrome Affectionne les zones basses et moyennes (jusqu'à 400m d'altitude) des rivières, occupant principalement les substrats rocheux en zone turbulente.

Annexe 2

“ The development of early monitoring tools to detect aquatic invasive species: eDNA assay development and the case of the armored catfish *Hypostomus robinii* ” valorisé dans le cadre du stage de Thomas Dubreuil, sur l'espèce exotique envahissante de poisson *Hypostomus robinii* et publié dans *Environmental DNA*.



Received: 6 May 2021 | Revised: 13 October 2021 | Accepted: 15 October 2021

DOI: 10.1002/edn3.260

ORIGINAL ARTICLE

Environmental DNA
WILEY

The development of early monitoring tools to detect aquatic invasive species: eDNA assay development and the case of the armored catfish *Hypostomus robinii*

Thomas Dubreuil^{1,2,3} | Thomas Baudry^{1,2,4} | Quentin Mauvisseau^{5,6} |
Alexandre Arqué² | Clarisse Courty¹ | Carine Delaunay⁴ | Michael Sweet⁶ |
Frédéric Grandjean⁴

¹DEAL Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, Schoelcher, Martinique

²ODE Office De l'Eau, Fort-de-France, Martinique

³ISTOM Ecole Supérieure d'agro-Développement International, Angers, France

⁴Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, Poitiers Cedex, France

⁵Natural History Museum, University of Oslo, Oslo, Norway

⁶Aquatic Research Facility, Environmental Sustainability Research Centre, University of Derby, Derby, UK

Correspondence

Frédéric Grandjean, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose, Poitiers Cedex, France.

Email: frederic.grandjean@univ-poitiers.fr

Quentin Mauvisseau, Natural History Museum, University of Oslo, Oslo, Norway.

Email: quentin.mauvisseau@nhm.uio.no

Funding information

Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Martinique (DEAL); Office de l'Eau (ODE)

Abstract

Introductions of invasive non-native species (and their subsequent impacts) are recognized as a major threat to native flora and fauna. This is especially true in island ecosystems such as the tropical island of Martinique. In 2018, one such aquatic invasive species, the suckermouth catfish *Hypostomus robinii* (Loricariidae), was reported for the first time in two of the islands rivers. *H. robinii* is a popular freshwater aquarium fish and native to tropical and sub-tropical South America. Since its initial discovery, a growing number of populations have been found, suggesting a larger distribution of this species through Martinique's hydrographic network. Here, we developed a novel survey technique (utilizing environmental DNA) and conducted a widespread survey across the island to assess the distribution of this invasive species. We were able to detect *H. robinii* in 22% of sites surveyed (18 out of 83) via our eDNA-based assay. The presence of these fish was confirmed using traditional trapping at 14 of these sites. Additionally, we used occupancy modeling to investigate the impact of different environmental covariates on the detection efficiency of the novel assay and the potential impacts of false positives and negatives. We highlight a decrease in the detection probability when water volume filtered increases. That said, the eDNA-based method proves a useful tool for the detection of this invasive fish species and monitoring its spread for management purposes.

KEYWORDS

biodiversity hotspot, eDNA detection, *Hypostomus robinii*, invasive species, Martinique

Thomas Dubreuil and Thomas Baudry are co-first authors.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Environmental DNA* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

Although they occupy <0.8% of the total Earth surface, freshwater ecosystems provide habitat for at least 6% of known species, with many more likely still to be discovered (Michelet, 2017). Almost one-third of this freshwater biodiversity faces extinction, largely due to habitat loss, introduction of aquatic invasive species (AIS), pollution and over-harvesting (IUCN, 2020; Muralidharan, 2017). The main introductory pathway for AIS is arguably shipping (and the discharge of ballast water in particular); however, releases from aquaculture, and/or the pet trade have also shown to be sources of invasive species in specific cases (Molnar et al., 2008; Strecker et al., 2011). Regardless of the pathway of introduction, AIS often facilitates profound negative impacts on native biodiversity due to predation, competition and/or the spread of pathogens (Grandjean et al., 2017; Momot, 1995; Remon et al., 2016). They have even been accredited as likely sources of spreading human zoonotic diseases such as the West Nile Virus, Dengue Fever, Chikungunya Virus, and Dirofilariasis (Conn, 2014). Therefore, understanding AIS can have direct implications in human health and should stand at the forefront of policy meaning they are well suited to being applied to the 'One Health' concept which is being explored in recent years (Conn, 2014). The impacts of AIS are even more important in island ecosystems which often harbor more vulnerable native populations due to their isolation (Townsend et al., 2006). As a first step to even attempt to assess, manage, mitigate and contain these invasions, the early detection of AIS is indispensable (Ficetola et al., 2008; Harper et al., 2018).

One such AIS, originally from the islands of Trinidad and Tobago (Boeseman, 1960), is *Hypostomus robinii*. Belonging to the Loricariidae family (Order Siluriformes), *H. robinii* can reach more than 320 mm in size with a weight of almost 350 g (Figure 1). The species is also often referred to as the 'armored catfish,' due to its

body coverage of bony plates (Nico et al., 2009). Despite its distinct appearance, genetic analysis is often required to confirm species identification due to the sheer diversity associated with this family (Brandão et al., 2018; Matamoros et al., 2016). This particular species is, however, extremely popular in the aquarium trade, and as such, there have been many documented releases into wild river systems (Cook-Hildreth et al., 2016; Matamoros et al., 2016). Some studies have even documented the ecological and economic impacts this species has had in regions outside of the fish's native home range (Orfinger & Gooding, 2018; Pound et al., 2011). The species is known to breed extensively in many of these new habitats, with females releasing upwards of 200 eggs during a spawning event (Deacon, 2015). Further, these eggs hatch after only 10 days. Together, these traits make *H. robinii* an ideal invader, able to quickly colonize entire watersheds in short time periods (Deacon, 2015).

In Martinique, the armored catfish (*H. robinii*) was introduced through the pet trade via releases from aquarists, as the species was sold in pet shops until its recent classification as a level two order of invasive alien species in 2019 (NOR: TREL1934054A). The species was initially observed to inhabit two rivers in 2018, when a large-scale study targeting the Australian red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus* was undertaken (Baudry et al., 2020). Following this first record, the presence of *H. robinii* has been confirmed upstream in these same rivers following electrofishing surveys led by the Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DEAL), and the Office De l'Eau of Martinique (ODE). Locally, its presence is considered as a critical threat for the native biodiversity, particularly for native fish species such as *Sicydium* sp, which are suspected to share the same or similar diet. However, the true spread of *H. robinii* remains unknown, and without such baseline data, any attempts of management and mitigation would likely not work from the onset. Traditional survey methods (e.g., electrofishing campaigns,

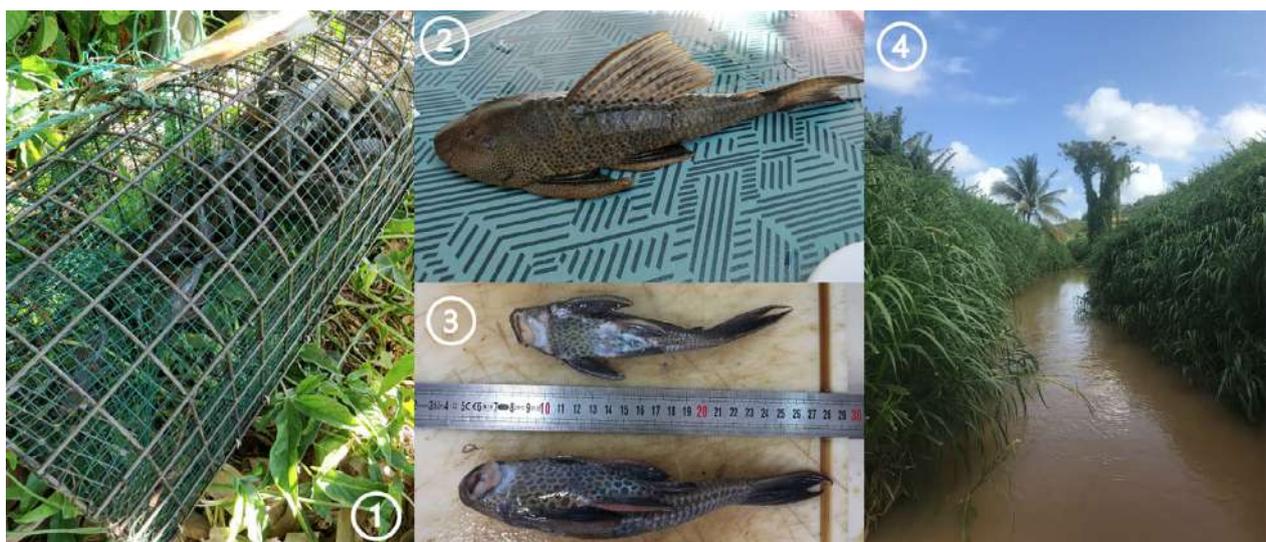


FIGURE 1 Highlighting (1) The trap used for sampling, (2 and 3) Pictures of *Hypostomus robinii* occurring in Martinique and (4) "Brasserie Lorraine" sampling site

kick sampling, and the use of nets) are very useful to ascertain the general trends of many fish species in river systems; however, they are not without their own shares of problems (Radinger et al., 2019). For example, they require large sampling efforts are time consuming, ecologically invasive, and often lead to an underestimation of species distribution, especially when population densities are low (Hänfiling et al., 2016; Manfrin et al., 2019; Robinson et al., 2018). In recent years, the use of environmental DNA (eDNA) has become increasingly popular as it is often reported as being equally if not more reliable, faster, and cheaper when attempting to monitor the distribution of a wide range of aquatic organisms (Baudry et al., 2021; Troth et al., 2020; Wang et al., 2021).

In this study, we developed and validated a species-specific eDNA-based detection protocol to monitor *H. robinii* through real-time quantitative PCR (qPCR). Following *in silico*, *in vitro*, and *in situ* validations of our assay, a large-scale monitoring campaign combining both eDNA detection and traditional fishing was performed at 83 sites across Martinique island. Here we present the most accurate and up-to-date occurrence data for this AIS in the river systems across Martinique and compare our novel eDNA-based monitoring approach to more conventional methods to assess reliability. Finally, we discuss the impacts, the armored catfish may have on local biodiversity and the scope for the possibility of eradicating the species from this biodiversity hotspot.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Sampling protocol

Sampling was performed at 83 sites, across 53 streams on Martinique Island, and two closed water systems. Sampling was performed on sites where fish were known to be present or absent, and at unknown locations. All 83 sites were sampled following a standardized eDNA protocol (see below and Baudry et al., 2021) and further assessed using trapping to compare the efficiency of both methods.

For environmental DNA, a 4 L water sample was collected from the river using a Nalgene™ plastic bottle. A surveyor would walk a transect from one side of the bank to the other collecting as they went. This sample was then immediately filtered using a filtration unit (Nalgene™) and vacuum pump (Nalgene™ Repairable Hand-Operated PVC Vacuum Pumps with Gauge, 10 inHg vacuum; Cowart et al., 2018). Water samples were filtered until saturation using nitrocellulose filters (Sartorius 47 mm diameter and 0.45 µm pore size) and the volume filtered was recorded. The filter was then removed and stored (folded in quarters) in 1.5 ml microcentrifuge tubes with 1 ml of absolute ethanol as conservation buffer. Three biological replicates (i.e. three independent filters) were collected at each sampling site. For each sample, a fresh pair of powder-free nitrile gloves were worn and the equipment (tweezers) was decontaminated between each sampling site with 50% bleach and autoclaved after each sampling day. A field blank was also collected at each sampling site, allowing us to assess for any potential cross-contamination between

locations. For this, 1000 ml of distilled water was filtered and stored as described above. All samples were kept in a cooler box until they were returned to the laboratory and placed at -20°C until DNA extraction (Appendix S1A).

2.2 | DNA sequencing

Due to the morphological similarities associated with members of the *Hypostomus* genus, species identification was confirmed via DNA sequencing prior to the development of the assay (Jardim de Queiroz et al., 2019). Two specimens, captured in two different sites in Martinique, were analyzed. DNA was extracted using the DNeasy® Blood & Tissue Kit following the manufacturer's recommendations. A fragment of the cytochrome c oxidase I (COI) was amplified by PCR using universal primers (H15149/L14841) previously designed by Kocher et al. (1989). The protocol followed was as in Chucholl et al. (2015): 2 min 30 s at 95°C for the initial denaturing step, followed by 35 cycles of 45 s at 95°C; 1 min at 48°C and 1 min at 72°C. The final elongation step was 10 min at 72°C. Amplified products were sequenced on an ABI PRISM 3130xl automated sequencer (PE Applied BioSystems). Both the forward and reverse primers were utilized for sequencing, and the resulting fragments aligned and edited with Sequencher® (version 5.4, 2016). The taxonomic assignment was then assessed with BLASTn 2.10.1 (Madden, 2002) comparing COI sequences to the non-redundant database of NCBI (Version August 2020). The newly generated sequences were deposited on NCBI GenBank under the accession numbers MZ066382 and MZ066383.

2.3 | qPCR assays

After confirmation of the species (see Results), species-specific primers and probe, targeting an 88 bp fragment within the COI region were designed for *H. robinii*. The forward primer 5'-CTCAGGGGTTGAAGCGGGA-3', reverse primer 5'-GTCAACTGAAGCTCCTGCA-3' and a specific 6-FAM MGB labeled probe 5'-ACCCACCCCTCGCTGGAAATTTA-3' were constructed using sequences generated from specimens collected by the authors and from sequences previously deposited on GenBank (Appendix S1B). The species-specific assay was designed using the Geneious Pro R10 Software (<https://www.geneious.com>; Kearse et al., 2012) and following the method outlined in Brys et al. (2020). Sequences from the targeted species (*H. robinii*), along with closely related species, and an exhaustive list of co-occurring fish species also present in Martinique were used to increase the assays specificity *in silico* (Appendix S1B) via the primer-blast tool from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Furthermore, *in vitro* testing, aimed at confirming primer specificity was also undertaken using DNA extracted from *H. plecostomus* and *Ancistrus sp.* (both belonging to the Loricaridae family), *Poecilia reticulata* (a fish occupying the same ecological niche in Martinique), and

Phoxinus phoxinus, a European fish species. Despite all efforts to ensure a single species target, the Loricariidae genus includes many subspecies, which are genetically very close. Although we found that our assay was specific to *H. robinii* (see results below), there may well be cross amplification with a closely related species not tested against in this study. That said, any Loricariidae would be classified as an AIS in Martinique, so this was not deemed as a major issue.

2.4 | qPCR protocol

The eDNA samples were extracted from filters following the method outlined in Baudry et al. (2021) (Appendix S1A). qPCR was then undertaken on all samples as follows. Optimization of the qPCR assay was initially undertaken utilizing a temperature gradient from 59°C to 63°C to determine the optimal annealing temperature. Similarly, different primers and probe concentrations, ranging from 0.5 µM to 10 µM of final concentration were investigated. qPCR reactions were as follows: 12.5 µl of TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies, Applied Biosystems), 2.5 µl of the forward primer (final concentration of 5 µM), 2.5 µl of the reverse primer, 1 µl of probe (final concentration of 5 µM), 1.5 µl of DNA-free water and 5 µl of DNA template (extracted from either individuals, eDNA samples or DNA-free water). Amplifications were run on a Roche LightCycler® 480 II quantitative thermocycler as follows: activation at 95°C for 10 min, then a repetition of 55 cycles of 1 min 15 s including 15 s at 95°C and 1 min at 61°C.

To determine potential contamination and assess the efficiency of qPCRs, four negative controls and four standards (i.e., DNA extracted from the targeted species with a known concentration) were added to each plate alongside the eDNA samples. These dilution standards, ranging from 4.25 to 2.59.10⁻⁴ ng/µl, were obtained doing a serial dilution from an initial concentration (17 ng/µl) following the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines (Bustin et al., 2009). This further allowed us to calculate the relative DNA concentration in positive eDNA samples. For each site, six technical replicates were performed (using two technical replicates per filter). If one replicate showed a signal with a Ct below 42 the site was considered as positive for this AIS (Bedwell & Goldberg, 2020). Any signal higher than 42 was considered as a 'false positive' (Agersnap et al., 2017).

2.5 | Limit of detection and limit of quantification

Due to the variability in eDNA concentration across each of the samples (and following the MIQE guidelines), it was necessary to determine the LOD (limit of detection) and LOQ (limit of quantification) (Bustin et al., 2009). According to Mauvisseau et al. (2019),

LOD corresponds to the concentration when one replicate out of 10 is positive with a signal below 45 Ct and LOQ is the concentration when nine replicates out of 10 are positive with signal below 45 Ct. Dilution series of known concentration using DNA extracted from *H. robinii* from Martinique was then performed. LOQ and LOD were determined using 10 replicates of standards, from 4.15.10⁻³ to 2.53.10⁻⁷ ng/µl.

2.6 | Trapping

Trapping consisted of the deployment of two large fish traps at each site (80 cm length × 25 cm width × 25 cm height with mesh of 1 cm × 1 cm and a single cone-shaped inlet; Figure 1). The traps were baited with mango to maximize fish capture after a prospection alongside the riverbank to find an index of presence (Culp & Glozier, 1989; Merilä, 2015). Traps were placed in flat streams or pits in the afternoon and collected the next morning after approximately 16 h of deployment. Each site was sampled three times. The AIS captured were measured to the nearest mm, weighed to the nearest g, and anesthetized using pure alcohol and clove oil following the protocol described by CQEEE (2015). Catch Per Unit Effort (CPUE) was calculated by dividing the number of fish caught by all traps by the number of fishing replicates. Results are reported in Table 1.

2.7 | Statistical analysis

To illustrate species distribution, QGIS 3.4.15 was used to generate maps (QGIS Team Development, 2016). The Martinique map was retrieved on the IGN© database and the streams on BDCarthage® and BD Topo®. Occupancy modeling using a Bayesian approach developed in Griffin et al. (2019) was used to assess potential false negative and false-positive errors (i.e., due to sample collection, laboratory experiments, biotic and abiotic factors). First, the presence or absence probability of the species was randomly set by the model as covariates. The random parameters, implemented in the model, allow for the determination of the following probabilities from both our field and lab data: probability of eDNA presence in the sample (defined as θ_{11} , for true positive, and θ_{10} , for false positive) and probability of positive qPCR replicate, identified as p_{11} , for true positive, thus species eDNA presence, and p_{10} , for false positive. This analysis was run using the following R Shiny application (<https://seak.shinyapps.io/eDNA/>; Griffin et al., 2019).

To quantify observation errors during the sampling plan and to allow for an estimate of the impact of environmental factors on *H. robinii* eDNA detection, Bayesian Monte Carlo Markov Chain (MCMC) algorithm was utilized (Dorazio & Erickson, 2018). pH, oxygen concentration, temperature, altitude, oxygen saturation, conductivity, and volume of water filtered were tested. This analysis was run with R 4.0.2 with the R package ednaoccupancy, designed to be used in MCMC algorithm (Dorazio & Erickson, 2018). The model was

TABLE 1 Sampling location with field information (altitude, coordinates, river name, and total volume filtered), eDNA detection results (qPCR positive proportion considering the six technical replicates and the mean cycle threshold (Ct) for positive samples)

Sampling location	Altitude (m)	Coordinates (° ' ")	Stream	Total volume filtered (ml)	qPCR positive proportion	Mean Ct	Catch Per Unit Effort (CPUE)	
							2018 (Baudry, unpublished data)	This study
Pont de Bassignac	120	14°43'54"N; 60°59'4"O	Galion	1150	0	A.D	0	0
Fonds Galion - Sainte Luce	160	14°44'7"N; 61°0'57"O	Galion	2400	0	A.D		0
Usine du Galion	20	14°43'7"N; 60°57'15"O	Galion	600	1	38.28		0.50
Vauclin Pont N6	7	14°32'56"N; 60°50'42"O	Vauclin	300	0	A.D		0
Pacquemar Pont N6	10	14°31'21"N; 60°50'16"O	Pacquemar	450	0	A.D		0
Dormante	20	14°29'9"N; 60°57'42"O	Oman	800	0	A.D	0	0
Station Epuration Marin	20	14°28'12"N; 60°51'17"O	Mastor	600	0	A.D		0
Ponton Savane	10	14°23'50"N; 60°51'57"O	-	900	0	A.D		0
Fontane	20	14°35'1"N; 60°52'27"O	Simon	450	0	A.D		0
Pont Madeleine	10	14°29'46"N; 60°54'18"O	Petite Rivière Pilote	950	0	A.D	0	0
Desmartinières	180	14°31'15"N; 60°54'41"O	Petite Rivière Pilote	1000	0	A.D	0	0
Domaine La Mauny	30	14°30'12"N; 60°54'20"O	La Mauny	1000	0	A.D		0
Guénot - Rivière Pilote	20	14°29'36"N; 60°53'44"O	Grande Rivière Pilote	1000	0	A.D	0	0
Lowinski	40	14°31'0"N; 60°52'55"O	Grande Rivière Pilote	1200	0	A.D	0	0
Jossaud	50	14°31'31"N; 60°52'52"O	Grande Rivière Pilote	800	0	A.D		0
Petit Bourg	10	14°32'51"N; 60°57'36"O	Coulisses	1600	0	A.D	0	0
Parcours Sportif Saint-Esprit	70	14°33'29"N; 60°56'24"O	Coulisses x Cacaos	1550	0	A.D	0	0
Duchâtel Cacaos	40	14°34'26"N; 60°55'58"O	les Cacaos	650	0	A.D		0
Pont D17 Saint-Esprit	30	14°33'34"N; 60°56'4"O	Roussane	1750	0	A.D		0
La Favorite	80	14°37'59"N; 61°2'6"O	Jambette	1000	0	A.D		0
Haut Case Navire	20	14°37'17"N; 61°6'5"O	Case Navire	2100	0	A.D	0	0

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Sampling location	Altitude (m)	Coordinates (° ' ")	Stream	Total volume filtered (ml)	qPCR positive proportion	Mean Ct	Catch Per Unit Effort (CPUE)	
							2018 (Baudry, unpublished data)	This study
Ecole Fond Lahaye	20	14°37'52"N; 61°6'33"O	Fond Lahaye	2250	0	A.D		0
Maison de la Canne	10	14°32'2"N; 61°1'10"O	Vatable	1800	0	A.D		0
Trenelle 1 - Trenelle	0	14°31'51"N; 60°57'56"O	Trenelle	1200	0	A.D		0
Trenelle 2 - Abandon	0	14°31'39"N; 60°58'11"O	Abandon	1000	0	A.D		0
Didier - Après tunnel	260	14°39'38"N; 61°5'52"O	Duclos	3600	0	A.D		0
Didier - Avant tunnel	150	14°38'45"N; 61°5'37"O	Dumauzé	3350	0	A.D		0
Ozanam Maniba	30	14°38'55"N; 61°8'6"O	Case Pilote	2400	0	A.D		0
AMEP Moutte	60	14°38'12"N; 61°2'42"O	Monsieur	2400	0	A.D		0
Quartier Rivière l'Or	200	14°39'58"N; 61°3'42"O	Monsieur	1400	0	A.D		0
Balheu	30	14°38'56"N; 61°0'59"O	Longvilliers	850	0.66	35.93		10.66
Pont N8	10	14°33'53"N; 60°57'55"O	Manche	1000	0.16	38.21		0
Quartier Rivière Lézarde 2	180	14°42'31"N; 61°1'58"O	Lézarde	3800	0.75	35.01		0.83
Habitation Saint-Etienne	110	14°41'32"N; 61°0'57"O	Lézarde	2700	0.83	34.87	0	3.33
Route des Gués	130	14°40'42"N; 61°1'19"O	Blanche	1200	0.83	38.20	0	12.66
Quartier Hotel Plaisir	220	14°41'12"N; 61°3'2"O	Blanche	1400	0	A.D		0
Gué de la Désirade	40	14°39'58"N; 60°59'45"O	Lézarde	1100	0.66	34.83	1.2	7.00
Soudon / Nasse Caraïbes	30	14°38'54"N; 60°59'24"O	Lézarde	1500	0.66	34.34	2.11	6.83
Ressource	0	14°36'17"N; 60°59'53"O	Lézarde	1500	0.50	33.35		2.83
Moulin à eau	30	14°39'47"N; 60°58'8"O	Petite Rivière	950	0.66	33.70		13.33
Rivière Caleçon	30	14°36'49"N; 60°57'49"O	Caleçon	1700	0.66	33.73		0
Brasserie Lorraine	10	14°37'12"N; 60°58'28"O	Petite Rivière	1100	0.66	33.94	4.5	19.00
Saint Maurice	60	14°40'11"N; 61°0'1"O	Petite Lézarde	900	0.66	34.18	0	1.16
Denel	130	14°43'7"N; 60°59'47"O	Tracée	1800	0	A.D		0
Fonds Desforts	20	14°42'48"N; 60°58'3"O	Tracée	1800	0.16	38.83		0.83
Case Dujon	10	14°48'30"N; 61°0'6"O	Sainte-Marie	1400	0.83	35.57		7.00
Marigot D15c	60	14°49'11"N; 61°2'9"O	Marigot	1150	0	A.D		0

Continues

TABLE 1 (Continued)

Sampling location	Altitude (m)	Coordinates (° ' ")	Stream	Total volume filtered (ml)	qPCR positive proportion	Mean Ct	Catch Per Unit Effort (CPUE)	
							2018 (Baudry, unpublished data)	This study
Habitation Charpentier	30	14°48'13"N; 62°1'40"O	Charpentier	800	0	A.D		0
Seguineau	0	14°49'31"N; 61°2'35"O	Lorrain	2900	0	A.D	0	0
Ravine Lorrain	50	14°48'9"N; 61°3'3"O	Lorrain	1700	0	A.D	0	0
Fonds Gens Libres	30	14°49'39"N; 61°4'12"O	Grande Anse	1200	0	A.D		0
Amont Mangatal	10	14°42'54"N; 61°10'7"O	Carbet	2100	0	A.D	0	0
Campbeilh	80	14°43'1"N; 61°9'41"O	Carbet	1800	0	A.D	0	0
Cascade du Carbet	140	14°42'48"N; 61°9'4"O	Carbet	2700	0	A.D	0	0
Maison Rousse	200	14°43'46"N; 61°8'28"O	Carbet	3850	0	A.D		0
Grand Fond	390	14°43'35"N; 61°6'59"O	Carbet	5800	0	A.D		0
Canal Beaugard	180	14°43'10"N; 61°9'49"O	Carbet	1800	0	A.D		0
Rivière Céron	10	14°50'19"N; 61°13'29"O	Céron	3700	0	A.D	0	0
Case Petit	112	14°48'31"N; 61°13'2"O	Prêcheur	1200	0	A.D		0
Route de Depaz	120	14°45'27"N; 61°9'49"O	Roxelane	2300	0	A.D		0
Trois Ponts	60	14°45'25"N; 61°9'43"O	Clitandre	1000	0	A.D		0
Renault Saint-Pierre	70	14°45'15"N; 61°9'50"O	Rivières des écrevisses	1200	0	A.D		0
Cœur Bouliki	300	14°42'0"N; 61°4'8"O	Rivière Blanche	2650	0	A.D	0	0
Fond Marie-Reine	320	14°45'52"N; 61°7'12"O	Capot	2350	0	A.D		0
Mackintosh	350	14°46'41"N; 61°7'0"O	Capot	2400	0	A.D	0	0
Fond Labour	290	14°48'24"N; 61°5'55"O	Capot	2800	0	A.D		0
Vallée Capot	20	14°50'18"N; 61°5'28"O	Capot	3000	0	A.D		0
Stade Grand'Rivière	80	14°52'30"N; 61°8'52"O	Grande Rivière	6300	0	A.D	0	0
Route de Macouba	90	14°52'21"N; 61°8'53"O	Rivière de Macouba	5900	0	A.D		0
Bourg Basse Pointe	20	14°52'7"N; 61°6'54"O	Basse Pointe	4400	0	A.D		0
Fonds Saint-Jacques	70	14°47'50"N; 61°0'27"O	Saint-Jacques	2700	0	A.D		0
Trace des Jésuites	314	14°44'47"N; 61°5'9"O	Lorrain	4800	0	A.D		0
Saut Babin	200	14°48'43"N; 61°7'18"O	Capot	4500	0	A.D		0
EPLEFPA Robert	0	14°39'24"N; 60°56'2"O	Cacao	1500	0	A.D		0
Beauséjour	60	14°33'5"N; 60°55'18"O	Beauséjour	900	0	A.D		0
Duchatel St Pierre	40	14°34'44"N; 60°56'30"O	Saint Pierre	600	0.33	37.86		1.33

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Sampling location	Altitude (m)	Coordinates (° ' ")	Stream	Total volume filtered (ml)	qPCR positive proportion	Mean Ct	Catch Per Unit Effort (CPUE)	
							2018 (Baudry, unpublished data)	This study
Monnerot	20	14°36'36"N; 60°52'59"O	Beauregard	2700	0	A.D	0	0
Grands Fonds - François	12	14°36'50"N; 60°55'18"O	Desroses	1500	0	A.D	0	0
Trois Bras	-	14°50'46"N; 61°11'51"O	Trois Bras	7500	0	A.D	0	0
Anse Couleuvre	-	14°50'30"N; 61°12'17"O	Couleuvre	5400	0	A.D	0	0
Rue Jambette	10	14°37'9"N; 61°2'10"O	Jambette	750	0	A.D	0	0
EM Anse Madame	10	14°37'9"N; 61°6'1"O	Case Navire	3300	0	A.D	0	0
Manzo	40	14°35'41"N; 60°56'20"O	-	1000	0	A.D	0	0

Note: A.D. in 'Mean Ct' column represents an absence of detection. CPUE represents the number of specimens caught per event per trap as a confirmation of *Hypostomus robinii* presence. CPUE was highlighted for 2018 (Baudry, unpublished data), the first observation of *Hypostomus robinii* in traps, targeting originally another aquatic invasive species, and for this study. All present sites have not prospected during 2018.

fitted as described by the authors and MCMC chains were run for 10,000 iterations.

3 | RESULTS

3.1 | Sequencing to confirm species identification

From the two fishes caught at the two different sites, sequences of respectively 320 bp length (Brasserie Lorraine) and 312 bp (Soudon) from a fragment of the COI gene were obtained. Both returned matches to *Hypostomus robinii* with 99.6% similarity (closest Accession Number: DQ133770.1).

3.2 | Validation and specificity of eDNA assay using qPCR

The primers and probes designed in this study were found to be species-specific to the invasive *H. robinii* collected in Martinique rivers. DNA from non-target species, *H. plecostomus*, *Poecilia reticulata*, *Ancistrus* sp. and *Phoxinus phoxinus*, was not amplified. In situ positive and negative controls performed as expected during the study: samples collected at sites where *H. robinii* was known to occur showed an efficient amplification and inversely, samples collected where this AIS is known to be absent did not amplify. Optimum qPCR yields were observed when running qPCR protocol under the following setting: 5 µM of probe and primers final concentration and 61°C of temperature annealing. Following Mauvisseau et al. (2019), the LOD corresponds to $3.24 \cdot 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ at 37.53 Ct and the LOQ to $2.59 \cdot 10^{-4} \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ at 37.24 ± 0.66 Ct.

3.3 | Distribution of *Hypostomus robinii*

No amplification occurred in any of the control samples (i.e. distilled water filtered before any of the eDNA samples were taken at each site). This indicates, no cross-contamination occurred between our sampling locations.

Via the use of eDNA, *H. robinii* was detected at 18 of the sites surveyed, corresponding to one closed water system (an ornamental pond) and 12 different rivers (Figure 2). The AIS presence was further confirmed using traditional trapping in 14 of these 18 sites (Figure 2). All sites that showed a negative signal with eDNA-based monitoring were also negative using traditional trapping. Interestingly, we were not able to trap these fish in some of the eDNA positive sites, despite previous visual observation of the AIS. For example, in the river La Manche (Pont N8 site), no *H. robinii* were trapped while the site was positive by eDNA detection. However, the AIS has been seen during a previous observation in other fishers traps and collected upstream (Duchâtel Saint-Pierre site; Figure 2). In the Lézarde watershed, where nine sites were eDNA positive, 403 fishes were collected, with sizes ranging from 71 to 312 mm.

3.4 | Modeling

Results of the eDNA occupancy model, which was undertaken following the protocols from Griffin et al. (2019), are reported in Table 2. The probability of occurrence (ψ) was 0.185, which is below the expected value set by the model of 0.5. False-positive probability for each sample (θ_{10}), and for each qPCR replicate (p_{10}), were 0.0650 and 0.0133, respectively, which again are below the expected values, i.e., 0.11 and 0.1. At the same time, the true-positive probability for each sample (θ_{11}) was equal to 0.999 which was overestimated (expected value 0.88). However, for each qPCR replicate, the true-positive probability (p_{11}) was 0.723, which is below the expected value (0.9).

None of the environmental covariates assessed were found to have a significant effect on *H. robinii* presence or detection. This may highlight the high tolerance of this fish to various environmental conditions. However, the total volume filtered was found to be at the margin of statistical significance ($F = 3.38$, $p = 0.06$). In fact, the highest probability of detection was found when the total filtered volume was comprised between 600 and 2000 ml, 600 ml corresponding to the lowest volume filtered and 75% of detection probability. After 2000 ml filtered, detection probability rapidly decreased below 70% (Figure 3). Other parameters (conductivity, pH, oxygen concentration and saturation, altitude, and temperature) showed no impact on the fish presence, maybe again indicating the species' high tolerance regarding water quality in the streams (Figure 3).

4 | DISCUSSION

The first record of the aquatic invasive species *H. robinii* in Martinique Island was in 2018, inhabiting only two river systems. However after a more extensive survey effort, further 12 rivers have been shown to be positive for this species (along with one closed water system on the island). To ensure our findings were accurate, we designed the novel eDNA-based survey tool following the 'gold standard' validation steps recently outlined by Thalinger et al. (2021). Indeed, the assay was found to be species-specific following *in silico*, *in vitro* and *in situ* validation. Additionally, we had no amplification occurring at sites where *H. robinii* was known to be absent and, inversely, a positive detection was observed where the species were fished, highlighting the reliability of our assay *in situ*. Finally, our designed assay showed a high sensitivity with relatively low *Limits of Detection* and *Limits of Quantification*, in accordance with other studies on fish eDNA. For example with the Topmouth Gudgeon (*Pseudorasbora parva*) (Davison et al., 2019) and/or for *Pseudobarbus swartzi* and *Sandelia capensis* (Castañeda et al., 2020).

To compare the new eDNA-based method with more traditional survey techniques, trapping sessions were performed in tandem with water filtration at all sites. The eDNA-based assay appeared to be a more sensitive tool. For example, across the 83 sites surveyed, 18 were positive using eDNA and only 14 with trapping (77% of the positive eDNA sites). There were no instances where sites were positive with trapping only. Such results are comparable to an

increasing number of similar studies for other targeted fish species. For example, Schmelzle and Kinziger (2016) found that when using an eDNA-based method, 72% of sampling sites showed the presence of *Eucyclogobius newberryi* while only 39% showed presence with trapping. Further, Hinlo et al. (2017) showed the presence of *Cyprinus carpio*, *Misgurnus anguillicaudatus*, and *Perca fluviatilis* in 73% of its sampling sites when utilizing eDNA, while only on average 40% of them when using fyke nets. However, such a marked difference between methods is not surprising. Indeed, trapping by its nature will only capture species close to the survey site specifically, while eDNA will detect the presence of species upstream—sometimes at very large distances (Deiner & Altermatt, 2014; Schumer et al., 2019). Further, the efficiency of more traditional survey methods (such as trapping) is based on fish activity, food availability, turbidity, predation pressure, breeding, and/or intra-interspecific competition (Prchalová et al., 2010 and references therein). eDNA-based methods in contrast appear to be more universal in their detection capabilities—for example being efficient and applicable all year round (Troth et al., 2021).

Measuring the environmental parameters when sampling the eDNA meant we were also able to apply occupancy modeling to assess the covariates impacts on the presence/occurrence of *H. robinii* at specific sites. Interestingly, the results highlighted that there were no ecological preferences apparent for this species, a result likely due to the AIS adaptability and its low requirements regarding water quality. However, we did highlight that the eDNA-based method efficiency and reliability were impacted slightly by the total water volume filtered. Higher probabilities of detection were observed at lower volumes. This is in contrast to some studies which have found the opposite to more commonly occur i.e. detection probabilities associated with eDNA sampling increased with the volume sampled (Cantera et al., 2019; Sepulveda et al., 2019). For example, Cantera et al. (2019) highlights optimal detection rates between 34 and 340 L, while our optimal detection rates are far lower (600–2000 ml giving above 75% of likelihood to detect *H. robinii*). That said, we are not suggesting eDNA assays should filter smaller volumes in general—this may well be a species-specific finding. For example, the result may be explained if we look at the habitat preference of *H. robinii* and catfish more generally. Catfish often prefer deeper, slow-flowing water, which by their nature also tend to be turbid and loaded with suspended matter. Such water has been known to clog filters and explains our lower volumes able to be filtered in this study. Turbidity is further amplified by the behavior of this AIS in particular as they erode the banks of the rivers during nesting (Orfinger & Goodding, 2018).

That said, the behavior and habitat preferences of this species were known before we undertook this survey effort and assay development and so our protocol was optimized to obtain the best yields possible when working in environments with high levels of suspended solids. For example, we utilized 0.45 μm pore size nitrocellulose filters to reduce filter clogging (Hunter et al., 2019). Further, we ensured we filtered the water in the field directly after sampling to avoid any possible degradation of DNA, due to the high

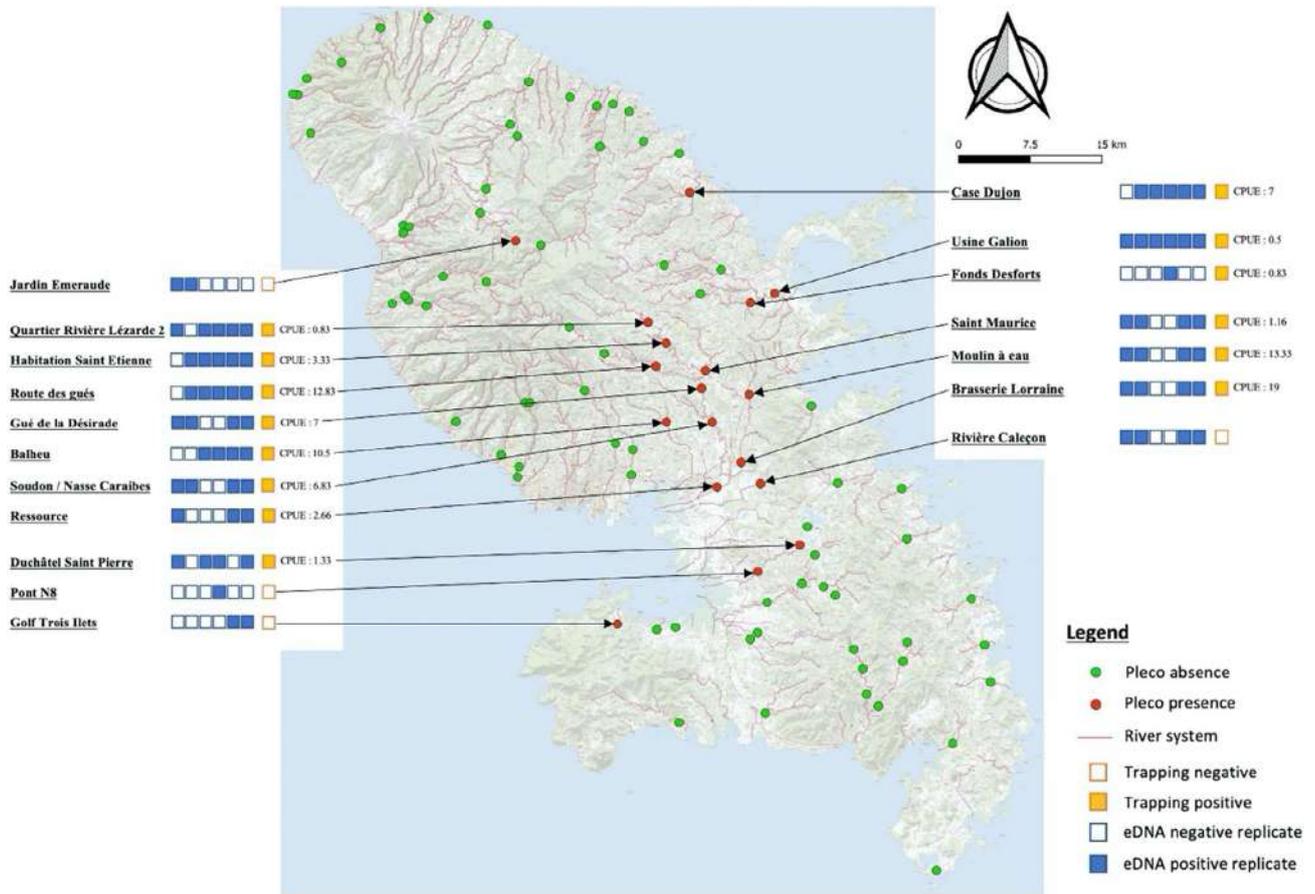


FIGURE 2 FIGURE *Hypostomus robinii* site presence among the 83 sampling sites surveyed through Martinique using our novel species-specific eDNA-based method. Presence of the armored catfish is noted with a red point (for eDNA tested sites) and positive qPCR replicates (among the six qPCR replicates performed) by site are represented with blue-framed blue squares (blue-framed white square corresponding to negative qPCR replicate). Each sampling site was additionally surveyed by a more traditional trapping method and results are highlighted by an orange-framed orange square (if *H. robinii* was captured), with the associated Catch Per Unit Effort (CPUE), or orange-framed orange square (if no capture)

Covariates	2.5 credible interval	Mean	97.5 credible interval	Expected value
Occurrence probability (ψ)	0.108	0.185	0.276	0.5
Sample true-positive probability (θ_{11})	0.862	0.975	0.999	0.88
Sample false-positive probability (θ_{10})	0.0001	0.0160	0.0650	0.11
qPCR replicate true-positive probability (p_{11})	0.525	0.626	0.723	0.9
qPCR replicate false-positive probability (p_{10})	0.0001	0.003	0.0133	0.1

TABLE 2 Observed and expected values of the different covariates' probability using Griffin et al. (2019) model

temperature and UV (Goldberg et al., 2011). This is particularly the case in tropical ecosystems where such parameters are higher than in temperate regions.

That said, despite our attempts to ensure the assay was validated to the highest degree, our models indicated that the probability of false positives for each sample was above the expected value. The high levels of suspended solids witnessed at the survey sites may also help explain this result. Increased suspended soils

have been linked to increased inhibition in qPCR assays (Hunter et al., 2019). Although this issue is likely inherent for all eDNA assays, we cannot ignore this result and as such care should always be taken when interpreting the data without the physical sighting of the specimen in question. Further, the models also rely on the catch data presented which can be skewed by the randomness of the AIS activity. For example, catfish are nocturnal (Celestino et al., 2017; Mazzoni et al., 2015; Rodriguez-Santiano et al., 2002) hence why

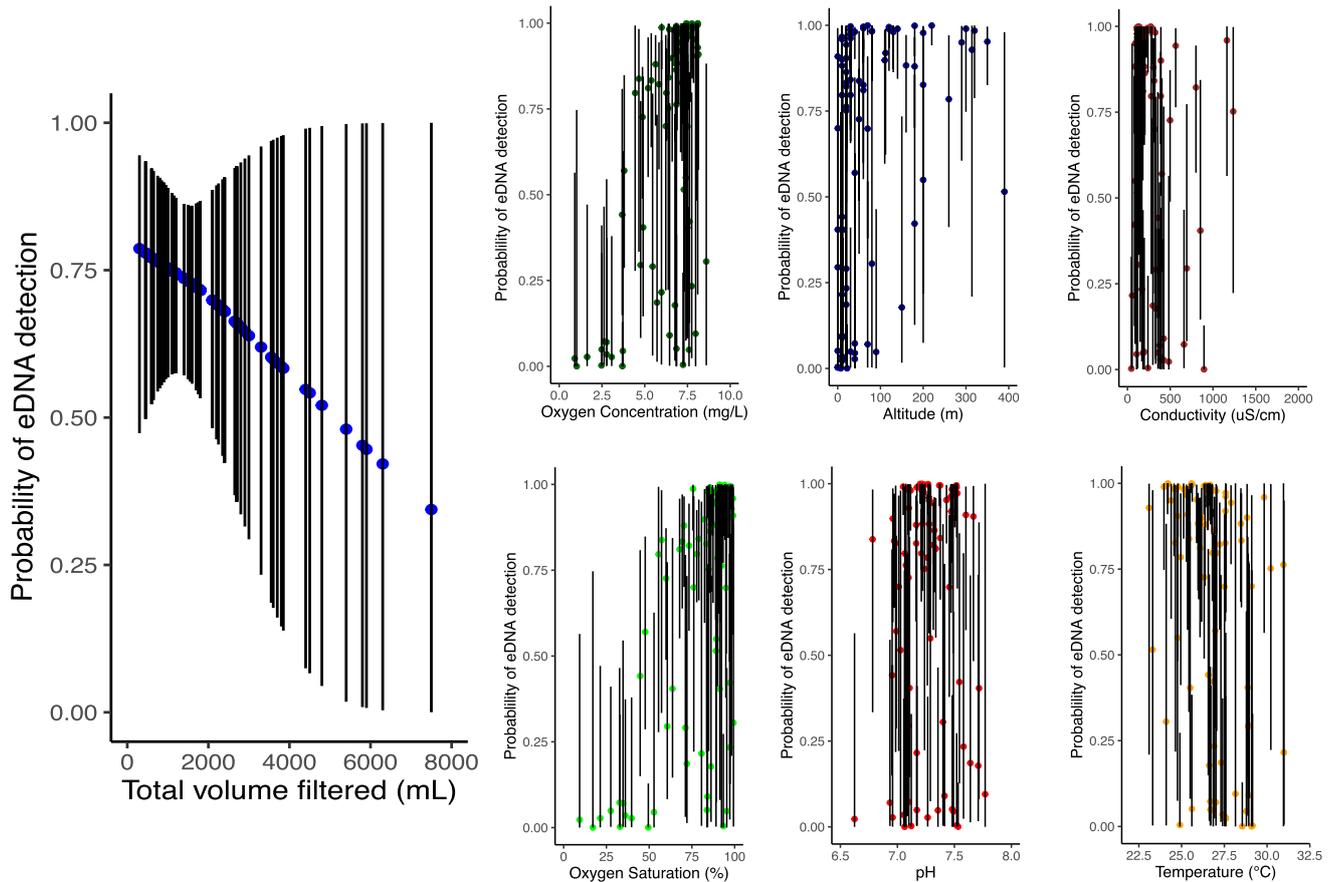


FIGURE 3 Influence of total volume filtered, oxygen concentration and saturation, altitude, conductivity, pH and temperature on the detection probability of *Hypostomus robinii* by our eDNA-based assay in Martinique, following the site occupancy modelling treatment. The colored dots represent the mean values of the dataset, for each station, and the bars represent the confidence intervals

we left the traps overnight. However, in future surveys, physical torch surveys might also be employed to ascertain the abundances of these fish at the sites identified via our eDNA surveys.

Our results now highlight that *H. robinii* is widespread across Martinique. Specifically, an entire watershed, the Lezarde, appears almost completely colonized by *H. robinii*, with nine out of 11 sites showing positive for the species—further 403 fish were collected at these same sites via trapping. Sadly, such a high density was not an outlier, with the catch per unit effort indicated above 10 for four sites including one where it was closer to a mean of 20 individuals caught by trap per night (Table 1). Such widespread occurrence and high densities are alarming as this AIS is known to compete for food with local species such as *Eleotris perniger* and *Sicydium sp.* (Lim et al., 2002). As well as impacting the environment via increased bank erosion (Hoover et al., 2014), increased turbidity, impacts on the biogeochemical cycles (Coat et al., 2009) and introduction of non-native parasites. Indeed, two specific parasites, *Trinigyryus hypostomatis* (Hanek et al., 1974) and *Unilatus unilatus* (Mizelle & Kritsky, 1967) have been shown to be present in the same species across Trinidad and Tobago and so will likely be present in Martinique to. Interestingly, as *H. robinii* was detected in more eutrophic areas, it can be assumed that this AIS is becoming acclimatized to polluted environments in Martinique, due

to its oligophagous character. High densities of individuals could then also possibly lead to phosphorus sequestration and a phase shift occurring to algal-dominated river systems (Capps & Flecker, 2013a, 2013b; Rubio et al., 2016)—a state which would likely be hard to recover from. Such a dramatic change in the ecosystem would certainly result in a rapid decline in the abundance of native flora and fauna, possibly as they are more sensitive to eutrophication and biogeochemical cycles. Further, although this AIS is known to be territorial in nature, the species has been known to migrate upriver by as much as 150 m a year (Mazzoni et al., 2018). This gives us an indication of how *H. robinii* can colonize a new environment at such a rapid rate.

With the detrimental impacts of the AIS clear, eradication efforts should be scaled up, along with continued monitoring of the current population and effectiveness of management and mitigation strategies aimed at removing this species from Martinican river systems. Our new eDNA-based assay will hopefully help in this effort and facilitate early detection of the species in otherwise pristine environments. However, to date, only one successful eradication effort has been documented for a member of the Locariidae family, that of *Pterygoplichthys disjunctivus*, and this was undertaken by hand with a spear with the removal of 28 fish (Hill & Sowards, 2015). Here we caught more than 400 at some of our sites and it is unlikely

we caught them all. Therefore, focus may have to be on limiting the spread of *H. robinii*, rather than eradication. The use of our assay could certainly assist in the monitoring stages of this management strategy. Further stopping new invasions will also be key to minimize the impact this species has on this valuable and vulnerable ecosystem. Indeed, a first step in this direction is already underway with the ban on the sale of fish from the Loricariidae family in pet shops, following their classification in the level two order of invasive alien species (NOR: TREL1934054A).

5 | CONCLUSION

Here, we developed and optimized a promising species-specific molecular tool, with great ease of implementation in the field (even if laboratory treatments require some expertise) making it a more efficient method than conventional ones, for the early detection of *H. robinii* in Martinique. Even if the impacts of this species are not well documented, the AIS certainly appears to compete with native species and possibly also alter the biochemical nature of the ecosystem directly. Early identification and monitoring of *H. robinii* will be essential to control the impact this species has on Martinique's fragile ecosystem, with the goal of preserving native species where at all possible. Finally, this study has made it possible to develop an effective species-specific detection tool for *H. robinii*, applicable in Martinique, but also in all tropical zones where this invasive species finds ecological niches favorable to its establishment.

ACKNOWLEDGMENTS

We wanted to thank the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Poitiers for authorizing us to use their facilities and all the equipment necessary to carry out these experiments. Thanks to Jonathan W. Armbruster for the help with sexual identification and to the IFREMER of Martinique for having lent us their laboratory to carry out the dissections. The study was funded by the Office de l'Eau (ODE) and the Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Martinique (DEAL).

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study design: TD, TB, and FG. Fieldwork, sampling collection, and trapping: TD and TB. Primers design: QM. Laboratory work: TD, TB, and CD. Data analyses: TD, TB, QM, and FG. Manuscript writing: TD, TB, QM, MS, and FG. Funding acquisition: AA, CC, and FG. All co-authors provided comments and helped to revise the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Appendix A: Protocol for eDNA extraction from filters. Appendix B: List of closely related and/or co-occurring species and related GenBank accession numbers utilized during the in silico design and validation steps of the assay.

ORCID

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

Quentin Mauvisseau  <https://orcid.org/0000-0003-1215-2987>

Frédéric Grandjean  <https://orcid.org/0000-0002-8494-0985>

REFERENCES

- Agersnap, S., Larsen, W. B., Knudsen, S. W., Strand, D., Thomsen, P. F., Hesselsoe, 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*, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179261>
- 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. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, *421*, 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.ecoli.2021.107637>
- Bedwell, M. E., & Goldberg, C. S. (2020). Spatial and temporal patterns of environmental DNA detection to inform sampling protocols in lentic and lotic systems. *Ecology and Evolution*, *10*, 1602–1612. <https://doi.org/10.1002/ece3.6014>
- Boeseman, M. (1960). The fresh-water fishes of the island of Trinidad. *Studies on the Fauna of Curaçao and Other Caribbean Islands*, *10*, 72–153.
- Brandão, K. D. O., Rocha-Reis, D. A., Garcia, C., Pazza, R., De Almeida-Toledo, L. F., & Kavalco, K. F. (2018). Studies in two allopatric populations of *Hypostomus affinis* (Steindachner, 1877): The role of mapping the ribosomal genes to understand the chromosome evolution of the group. *Comparative Cytogenetics*, *12*, 1–12. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v12i1.22052>
- Brys, R., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Mauvisseau, Q., Auwerx, J., Sweet, M., & Mergeay, J. (2020). Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). *Journal of Fish Biology*, *98*, 399–414. <https://doi.org/10.1111/jfb.14315>
- 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>
- Cantera, I., Cilleros, K., Valentini, A., Cerdan, A., Dejean, T., Iribar, A., Taberlet, P., Vigouroux, R., & Brosse, S. (2019). Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers. *Scientific Reports*, *9*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39399-5>
- Capps, K. A., & Flecker, A. S. (2013b). Invasive fishes generate biogeochemical hotspots in a nutrient-limited system. *PLoS One*, *8*(1), e54093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054093>
- Capps, K. A., & Flecker, A. S. (2013a). Invasive aquarium fish transform ecosystem nutrient dynamics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*(1769), 20131520. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1520>
- Castañeda, R. A., Van Nynatten, A., Crookes, S., Ellender, B. R., Heath, D. D., Maclsaac, H. J., Mandrak, N. E., & Weyl, O. L. F. (2020). Detecting native freshwater fishes using novel non-invasive methods. *Frontiers in Environmental Science*, *8*, 29. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00029>
- Celestino, L. F., Sanz-Ronda, F. J., Kashiwaqui, E. A. L., Celestino, E. F., Makrakis, M. C., & Makrakis, S. (2017). Daily movement behavior

- of two Neotropical armored catfish species (*Ancistrus aff. cirrhosus* Valenciennes, 1836 and *Hypostomus ancistroides* Ihering, 1911) at a road-stream crossing culvert. *Journal of Applied Ichthyology*, 33, 1092–1099. <https://doi.org/10.1111/jai.13446>
- Centre Québécois des Espèces Exotiques Envahissantes (2015). *Campagne éducative « Surveillez les envahisseurs des milieux aquatiques. Ouvrez l'oeil ! » - Protocole d'euthanasie.*
- Chucholl, C., Mrugała, A., & Petrušek, A. (2015). First record of an introduced population of the southern lineage of white-clawed crayfish (*Austropotamobius italicus*) north of the Alps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 416, 1–8. <https://doi.org/10.1051/kmae/2015006>
- Coat, S., Monti, D., Bouchon, C., & Lepoint, G. (2009). Trophic relationships in a tropical stream food web assessed by stable isotope analysis. *Freshwater Biology*, 54, 1028–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02149.x>
- Conn, D. B. (2014). Aquatic invasive species and emerging infectious disease threats: A One Health perspective. *Aquatic Invasions*, 9, 383–390. <https://doi.org/10.3391/ai.2014.9.3.12>
- Cook-Hildreth, S. L., Bonner, T. H., & Huffman, D. G. (2016). Female reproductive biology of an exotic suckermouth armored catfish (Loricariidae) in the San Marcos River, Hays Co., Texas, with observations on environmental triggers. *BioInvasions Records*, 5, 173–183. <https://doi.org/10.3391/bir.2016.5.3.09>
- 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/jcbiol/ruy007>
- Culp, J. M., & Glozier, N. E. (1989). Experimental evaluation of a minnow trap for small lotic fish. *Hydrobiologia*, 175, 83–87. <https://doi.org/10.1007/BF00008477>
- Davison, P. I., Falcou-Préfol, M., Copp, G. H., Davies, G. D., Vilizzi, L., & Créach, V. (2019). Is it absent or is it present? Detection of a non-native fish to inform management decisions using a new highly-sensitive eDNA protocol. *Biological Invasions*, 21, 2549–2560. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-01993-z>
- Deacon, A. (2015). *A tale of two Trinidadian tetras.* <https://amydeacon.weebly.com/writing/a-tale-of-two-trinidadian-tetas>
- Deiner, K., & Altermatt, F. (2014). Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One*, 9(2), e88786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>
- 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>
- Ficetola, G. F., Miaud, 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>
- 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(7), e22746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746>
- Grandjean, F., Roques, J., Delaunay, C., Petrušek, 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(2), 377–392. <https://doi.org/10.1111/rssc.12390>
- Hanek, G., Molnar, K., & Fernando, C. H. (1974). Three new genera of Dactylogyridae (Monogenea) from freshwater fishes of Trinidad. *The Journal of Parasitology*, 60, 911–913. <https://doi.org/10.2307/3278510>
- 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>
- Hill, J. E., & Sowards, J. (2015). Successful eradication of the non-native loricariid catfish *Pterygoplichthys disjunctivus* from the Rainbow River, Florida. *Management of Biological Invasions*, 6, 311–317. <https://doi.org/10.3391/mbi.2015.6.3.11>
- Hinlo, R., Furlan, E., Sutor, L., & Gleeson, D. (2017). Environmental DNA monitoring and management of invasive fish: Comparison of eDNA and fyke netting. *Management of Biological Invasions*, 8, 89–100. <https://doi.org/10.3391/mbi.2017.8.1.09>
- Hoover, J. J., Murphy, C. E., & Killgore, J. (2014). Ecological impacts of Suckermouth catfishes (Loricariidae) in North America: A conceptual model. *Aquatic Nuisance Species Research Program*, 14, 1–20.
- Hunter, M. E., Ferrante, J. A., Meigs-Friend, G., & Ulmer, A. (2019). Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques. *Scientific Reports*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40977-w>
- IUCN (2020). *IUCN - Freshwater biodiversity.*
- Jardim de Queiroz, L., Cardoso, Y., Jacot-des-Combes, C., Bahechar, I. A., Lucena, C. A., Rapp Py-Daniel, L., Sarmento Soares, L. M., Nylinder, S., Oliveira, C., Parente, T. E., Torrente-Vilara, G., Covain, R., Buckup, P., & Montoya-Burgos, J. I. (2019). Evolutionary units delimitation and continental multilocus phylogeny of the hyperdiverse catfish genus *Hypostomus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 145, 106711. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106711>
- 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/bts199>
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196–6200. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>
- Lim, P., Meunier, F. J., Keith, P. A., & Noël, P. Y. (2002). *Atlas des poissons et des crustacés d'eau douce de la Martinique.* Collection patrimoines naturels.
- Madden, T. (2002). *Chapter 16: The BLAST Sequence Analysis Tool.* The NCBI Handbook.
- Manfrin, C., Souty-Grosset, C., Anastácio, P. M., Reynolds, J., & Giulianini, P. G. (2019). Detection and control of invasive freshwater crayfish: From traditional to innovative methods. *Diversity*, 11, 1–16. <https://doi.org/10.3390/d11010005>
- Matamoros, W. A., McMahan, C. D., Mejia, C. R., House, P. H., Armbruster, J. W., & Chakrabarty, P. (2016). First record of the non-native suckermouth armored catfish *Hypopostomus cf. niceforoi* (Fowler 1943) (Siluriformes: Loricariidae) from Central America. *Occasional Papers Museum of Natural Science Louisiana State University*, 87, 1–12.
- Mauvisseau, Q., Tönges, S., Andriantsoa, R., Lyko, F., & Sweet, M. (2019). Early detection of an emerging invasive species: eDNA monitoring of a parthenogenetic crayfish in freshwater systems. *Management of Biological Invasions*, 10, 461–472. <https://doi.org/10.3391/mbi.2019.10.3.04>
- Mazzoni, R., Da Silva, R. C., Pinto, M. P., & Prentis, P. (2015). Invasion and colonisation of a tropical stream by an exotic loricariid fish: Indices of gradual displacement of the native common pleco (*Hypostomus*

- punctatus*) by the red fin Dwarf Pleco (*Parotocinclus maculicauda*) over Fifteen Years. *PLoS One*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139968>
- Mazzoni, R., Pinto, M. P., Iglesias-Rios, R., & Costa, R. (2018). Fish movement in an atlantic forest stream. *Neotropical Ichthyology*, 16, 1–12. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170065>
- Merilä, J. (2015). Factors influencing three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus 1758) catch per unit effort. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 905–908. <https://doi.org/10.1111/jai.12810>
- Michelet, P. (2017). La biodiversité des milieux aquatiques continentaux en France métropolitaine: État des lieux et menaces. *Annales Des Mines-Responsabilité Et Environnement*, 2, 36–39.
- Mizelle, J. D., & Kritsky, D. C. (1967). *Unilatus* gen. n., a unique Neotropical genus of Monogenea. *Journal of Parasitology*, 53, 1113–1114. <https://doi.org/10.2307/3276854>
- Molnar, J. L., Gamboa, R. L., Revenga, C., & Spalding, M. D. (2008). Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6, 485–492. <https://doi.org/10.1890/070064>
- Momot, W. T. (1995). Reviews in Fisheries Science Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems Redefining the Role of Crayfish in Aquatic Ecosystems. *Reviews in Fisheries Science*, 3(1), 33–63. <https://doi.org/10.1080/10641269509388566>
- Muralidharan, M. (2017). Do alien species matter? Impacts of invasions in Indian freshwater systems and challenges in management. *International Journal of Aquatic Biology*, 5, 114–127.
- Nico, L. G., Jelks, H. L., & Tuten, T. (2009). *Non-Native suckermouth armored catfishes in Florida: Description of nest burrows and burrow colonies with assessment of shoreline conditions*. ANSRP Bulletin 9.
- Orfinger, A. B., & Gooding, D. D. (2018). The global invasion of the suckermouth armored catfish genus *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae): Annotated list of species, distributional summary, and assessment of impacts. *Zoological Studies*, 57, e7. <https://doi.org/10.6620/ZS.2018.57-07>
- Pound, K. L., Nowlin, W. H., Huffman, D. G., & Bonner, T. H. (2011). Trophic ecology of a nonnative population of suckermouth catfish (*Hypostomus plecostomus*) in a central Texas spring-fed stream. *Environmental Biology of Fishes*, 90, 277–285. <https://doi.org/10.1007/s10641-010-9741-7>
- Prchalová, M., Mrkvicka, T., Kubečka, J., Peterka, J., Čech, M., Muška, M., Kratochvíl, M., & Vašek, M. (2010). Fish activity as determined by gillnet catch: A comparison of two reservoirs of different turbidity. *Fisheries Research*, 102, 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2009.12.011>
- Radinger, J., Britton, J. R., Carlson, S. M., Magurran, A. E., Alcaraz-Hernández, J. D., Almodóvar, A., Benejam, L., Fernández-Delgado, C., Nicola, G. G., Oliva-Paterna, F. J., Torralva, M., & García-Berthou, E. (2019). Effective monitoring of freshwater fish. *Fish and Fisheries*, 20, 729–747. <https://doi.org/10.1111/faf.12373>
- Remon, J., Bower, D. S., Gaston, T. F., Clulow, J., & Mahony, M. J. (2016). Stable isotope analyses reveal predation on amphibians by a globally invasive fish (*Gambusia holbrooki*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26, 724–735. <https://doi.org/10.1002/aqc.2631>
- 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>
- Rodriguez, M. A. (2002). Restricted movement in stream fish: The paradigm is incomplete. *Not Lost. Ecology*, 83, 1. <https://doi.org/10.2307/2680115>
- Rodriguez-Santiago, M. A., García-Prieto, L., Mendoza-Garfias, B., González-Solís, D., & Grano-Maldonado, M. I. (2016). Parasites of two coexisting invasive sailfin catfishes (Siluriformes: Loricariidae) in a tropical region of Mexico. *Neotropical Ichthyology*, 14, 1–7. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20160021>
- Rubio, V. Y., Gibbs, M. A., Work, K. A., & Bryan, C. E. (2016). Abundant feces from an exotic armored Catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus* (Weber, 1991), create nutrient hotspots and promote algal growth in a Florida Spring. *Aquatic Invasions*, 11, 337–350. <https://doi.org/10.3391/ai.2016.11.3.11>
- Schmelzle, M. C., & Kinziger, A. P. (2016). Using occupancy modeling to compare environmental DNA to traditional field methods for regional-scale monitoring of an endangered aquatic species. *Molecular Ecology Resources*, 16, 895–908. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12501>
- Schumer, G., Crowley, K., Maltz, E., Johnston, M., Anders, P., & Blankenship, S. (2019). Utilizing environmental DNA for fish eradication effectiveness monitoring in streams. *Biological Invasions*, 21, 3415–3426. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02056-z>
- Sepulveda, A. J., Schabacker, J., Smith, S., Al-Chokhachy, R., Luikart, G., & Amish, S. J. (2019). Improved detection of rare, endangered and invasive trout in using a new large-volume sampling method for eDNA capture. *Environmental DNA*, 1, 227–237. <https://doi.org/10.1002/edn3.23>
- Sequencher® (2016). *Version 5.4.6 DNA sequence analysis software*. Gene Codes Corporation.
- Strecker, A. L., Campbell, P. M., & Olden, J. D. (2011). The aquarium trade as an invasion pathway in the Pacific northwest. *Fisheries*, 36, 74–85. <https://doi.org/10.1577/03632415.2011.10389070>
- Team QGIS Development (2016). *QGIS Geographic Information System*. Open Source Geospatial Foundation Project.
- 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*, 1–14. <https://doi.org/10.1002/edn3.189>
- Towns, D. R., Atkinson, I. A. E., & Daugherty, C. H. (2006). Have the harmful effects of introduced rats on islands been exaggerated? *Biological Invasions*, 8, 863–891. <https://doi.org/10.1007/s10530-005-0421-z>
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142622>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: 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 robinii*. *Environmental DNA*, 00, 1–14. <https://doi.org/10.1002/edn3.260>

Annexe 3

Matériel supplémentaire de l'article « Invasion and distribution of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*, in Martinique » (Chapitre 2).

Environmental parameters (Temperature, oxygen concentration and pH) measured at each site prospected during baited-trap survey, with Ponsel Mesure Odeon field tool. Table cells with (-) symbol represent an absence of data due to a prohibition to proceed with the measures.

Station	Type of Habitat	Temperature (°C)	Oxygen concentration (mg/L)	pH
Oman	Stream	27.23	5.831	7.315
Manzo	Water Retention pond	28.79	3.72	7.492
Petit Galion	Stream	26.67	8.062	7.368
Lezarde Site 1		26.7	6.903	7.231
Lezarde Site 2		26.8	6.708	7.225
Lezarde Site 3	Stream	26.17	6.606	6.96
Lezarde Site 4		26.55	7.21	7.504
Lorrain	Stream	25.43	4.656	6.783
Coulistes	Stream	27.4	2.769	7.056
Petite Riviere Site 1		27.05	4.439	7.065
Petite Riviere Site 2	Stream	26.54	5.987	7.098
Grand Galion	Stream	26.67	8.062	7.368
Petite Lezarde	Stream	26.08	5.199	7.337
Château Gaillard	Non-functional hatchery	-	-	-
Jardin Emeraude	Ornamental pond	-	-	-
Habitation Ceron	Ornamental pond	-	-	-
Morne Rouge	Non-functional hatchery	-	-	-
Cacaos	Stream	27.01	2.771	6.935
Ceron	Stream	25.5	7.497	7.716
Capot	Stream	25.88	7.857	7.431
Grand'Riviere	Stream	24.1	8.6	7.4
Carbet Site 1		25.28	7.68	7.48
Carbet Site 2	Stream	25.12	7.775	7.48
Carbet Site 3		24.79	7.99	7.52
Galion	Stream	28.5	5.381	6.972
Blanche	Stream	26.55	7.21	7.504
Case Navire Site 1		28.93	6.454	7.414
Case Navire Site 2	Stream	28.89	5.46	7.088
Roussane	Stream	26.8	6.267	7.21
Vauclin	Stream	29.09	1.02	7.064
Massel	Stream	29.83	7.478	7.278
Riviere Pilote Site 1	Stream	27.89	6.987	7.292

Riviere Pilote Site 2	26.68	2.62	7.101
Riviere Pilote Site 3	26.32	4.87	7.098

Annexe 4

Matériels supplémentaires de l'article "Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot, and eDNA-based success story" (Chapitre 2).

Appendix A: Paragraph 2.4. "DNA extraction protocol from filters"

DNA extractions were performed in a PCR-free dedicated room, one which was different from that used for the preparation of qPCR mixes. Equipment, benches, tools and surfaces were bleach-disinfected before processing samples. $\frac{1}{4}$ of each filter was cut using sterilized forceps and scissors and dried for thirty minutes (to evaporate the ethanol). After this process, the $\frac{1}{4}$ section of the filter was further cut into small pieces and placed into a new 2 mL Eppendorf tube. We used the Qiagen DNeasy[®] Blood & Tissue Kit to extract the DNA, following manufacturers guidelines with only minor modification. In brief, 450 μ L of ATL buffer and 50 μ L Proteinase K were added to the tube with the fragments filter, vortexed for 15 seconds and incubated at 56°C for at least 2 hours. 500 μ L AL buffer and 500 μ L EtOH 100% were then added and the manufacturers protocols were followed thereafter. Extracted DNA was stored at -20°C until further analysis. The extraction yields were determined measuring the DNA concentration using NanoDrop[®] 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware).

Appendix B: Paragraph 2.5. "qPCR assays »

The assay was designed using DNA sequences retrieved from GenBank (see Appendix 2) and the Geneious Pro R10 Software (<https://www.geneious.com>; Kearse et al., 2012) following the method outlined in Brys et al. (2020). In brief, 16S DNA sequences from *C. quadricarinatus* were retrieved from the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>; see Appendix 5) and a consensus sequence was

created to design the assay. The primers and probe were created using the 'primers' design function from Geneious, and their specificity was assessed by visual alignment against 16S sequences from closely related or co-occurring crayfish species listed in Appendix 5 and *in-silico* using the primer-blast tool from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). After *in-silico* validation, the specificity of the assay was tested *in-vitro* with qPCR using DNA extracted from the following closely related species *P. leniusculus*, *P. clarkii*, *Austropotamobius pallipes*, and *Cherax destructor*.

Appendix C: Paragraph 2.6. qPCR treatments

qPCR reactions were set up in a sterile room, decontaminated every night using UV-light treatment. qPCR reactions were carried out in a 25 μ L final volume containing: 12.5 μ L of TaqMan[®] Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies, Applied Biosystems), 2.5 μ L of each primer (final concentration 5 μ M), 1 μ L of probe (final concentration of 5 μ M), 1.5 μ L of DNA-free water and 5 μ L of template (extracted from either individuals, eDNA samples or DNA-free water). In each qPCR plate, four negative controls (i.e. no-template DNA) were incorporated, in order to assess for potential contamination during the amplification.

Amplifications were performed on a Roche LightCycler[®] 480 II quantitative thermocycler using the following conditions: activation at 95°C for 10 min followed by 55 cycles of 95°C for 15 sec and 58°C for 1 min.

Appendix D: eDNA collection locations including field information (coordinates, altitude, name of stream and total volume filtered), Catch Per Unit Effort (CPUE) representing the number of specimens caught per event per trap as a confirmation of *C. quadricarinatus* presence, and eDNA detection results (qPCR positive proportion considering the 12 technical replicates and the mean Cycle threshold (Ct) for positive samples). A.D. in 'Mean Ct' column represent an absence of detection.

Sampling site	Coordinates (° ' ")	Altitude (m)	Stream	Total volume filtered (mL)	CPUE	qPCR positive proportion	Mean Ct
Pont de Bassignac	14°43'54"N ; 60°59'4"O	120	Galion	1150	4.33	0.92	40.3
Fonds Galion - Sainte Luce	14°44'7"N ; 61°0'57"O	160	Galion	2400	0	0.58	39.95
Usine du Galion	14°43'7"N ; 60°57'15"O	20	Galion	600	13	1	36.42
Vauclin Pont N6	14°32'56"N ; 60°50'42"O	7	Vauclin	300	0	0	A.D.
Pacquemar Pont N6	14°31'21"N ; 60°50'16"O	10	Pacquemar	450	0	0	A.D.
Dormante	14°29'9"N ; 60°57'42"O	20	Oman	800	0.33	0.5	39.55
Station Epuration Marin	14°28'12"N ; 60°51'17"O	20	Mastor	600	0	0	A.D.
Ponton Savane	14°23'50"N ; 60°51'57"O	10	-	900	0	0	A.D.
Fontane	14°35'1"N ; 60°52'27"O	20	Simon	450	0	0.58	39.82
Pont Madeleine	14°29'46"N ; 60°54'18"O	10	Petite Rivière Pilote	950	0	0.75	39.85
Desmartinières	14°31'15"N ; 60°54'41"O	180	Petite Rivière Pilote	1000	0	0	A.D.
Domaine La Mauny	14°30'12"N ; 60°54'20"O	30	La Mauny	1000	0	0	A.D.
Guénot - Rivière Pilote	14°29'36"N ; 60°53'44"O	20	Grande Rivière Pilote	1000	3	0.67	39.97
Lowinski	14°31'0"N ; 60°52'55"O	40	Grande Rivière Pilote	1200	1	1	37.40
Jossaud	14°31'31"N ; 60°52'52"O	50	Grande Rivière Pilote	800	0	1	35.45
Petit Bourg	14°32'51"N ; 60°57'36"O	10	Coulisses	1600	3.5	1	35.03
Parcours Sportif Saint-Esprit	14°33'29"N ; 60°56'24"O	70	Coulisses x Cacaos	1550	9.33	1	33.55
Duchâtel Cacaos	14°34'26"N ; 60°55'58"O	40	les Cacaos	650	0	1	34.69
Pont D17 Saint-Esprit	14°33'34"N ; 60°56'4"O	30	Roussane	1750	0	1	32.06
La Favorite	14°37'59"N ; 61°2'6"O	80	Jambette	1000	0	1	36.93
Haut Case Navire	14°37'17"N ; 61°6'5"O	20	Case Navire	2100	2	0.51	38.18
Ecole Fond Lahaye	14°37'52"N ; 61°6'33"O	20	Fond Lahaye	2250	0	0	A.D.
Maison de la Canne	14°32'2"N ; 61°1'10"O	10	Vatable	1800	0	0.42	40.45

Trenelle 1 - Trenelle	14°31'51"N ; 60°57'56"O	0	Trenelle	1200	0	1	33.84
Trenelle 2 - Abandon	14°31'39"N ; 60°58'11"O	0	Abandon	1000	0	1	34.795
Didier - Après tunnel	14°39'38"N ; 61°5'52"O	260	Duclos	3600	0	0	A.D.
Didier - Avant tunnel	14°38'45"N ; 61°5'37"O	150	Dumauzé	3350	0	0.67	38.78
Ozanam Maniba	14°38'55"N ; 61°8'6"O	30	Case Pilote	2400	0	0	A.D.
AMEP Moutte	14°38'12"N ; 61°2'42"O	60	Monsieur	2400	0	0	A.D.
Quartier Rivière l'Or	14°39'58"N ; 61°3'42"O	200	Monsieur	1400	0	0	A.D.
Balheu	14°38'56"N ; 61°0'59"O	30	Longvilliers	850	3	0.75	36.15
Pont N8	14°33'53"N ; 60°57'55"O	10	Manche	1000	1	1	37.93
Quartier Rivière Lézarde 2	14°42'31"N ; 61°1'58"O	180	Lézarde	3800	0	0	A.D.
Habitation Saint-Etienne	14°41'32"N ; 61°0'57"O	110	Lézarde	2700	4.75	1	37.08
Route des Gués	14°40'42"N ; 61°1'19"O	130	Blanche	1200	0	0.425	38.99
Quartier Hotel Plaisir	14°41'12"N ; 61°3'2"O	220	Blanche	1400	0	0	A.D.
Gué de la Désirade	14°39'58"N ; 60°59'45"O	40	Lézarde	1100	4	1	38.33
Soudon / Nasse Caraïbes	14°38'54"N ; 60°59'24"O	30	Lézarde	1500	16.87	0.92	38.20
Ressource	14°36'17"N ; 60°59'53"O	0	Lézarde	1500	2	1	37.27
Moulin à eau	14°39'47"N ; 60°58'8"O	30	Petite Rivière	950	4	1	34.19
Rivière Caleçon	14°36'49"N ; 60°57'49"O	30	Caleçon	1700	0	1	33.98
Brasserie Lorraine	14°37'12"N ; 60°58'28"O	10	Petite Rivière	1100	11.33	1	33.09
Saint Maurice	14°40'11"N ; 61°0'1"O	60	Petite Lézarde	900	6	1	35.65
Denel	14°43'7"N ; 60°59'47"O	130	Tracée	1800	0	1	33.74
Fonds Desforts	14°42'48"N ; 60°58'3"O	20	Tracée	1800	0	0.5	40.375
Case Dujon	14°48'30"N ; 61°0'6"O	10	Sainte-Marie	1400	0	0	A.D.
Marigot D15c	14°49'11"N ; 61°2'9"O	60	Marigot	1150	0	0	A.D.
Habitation Charpentier	14°48'13"N ; 62°1'40"O	30	Charpentier	800	0	0	A.D.
Seguineau	14°49'31"N ; 61°2'35"O	0	Lorrain	2900	0	0	A.D.
Ravine Lorrain	14°48'9"N ; 61°3'3"O	50	Lorrain	1700	2	0.42	40.27
Fonds Gens Libres	14°49'39"N ; 61°4'12"O	30	Grande Anse	1200	0	0	A.D.

Amont Mangatal	14°42'54"N ; 61°10'7"O	10	Carbet	2100	0	0	A.D.
Campbeilh	14°43'1"N ; 61°9'41"O	80	Carbet	1800	0	0	A.D.
Cascade du Carbet	14°42'48"N ; 61°9'4"O	140	Carbet	2700	0	0	A.D.
Maison Rousse	14°43'46"N ; 61°8'28"O	200	Carbet	3850	0	0	A.D.
Grand Fond	14°43'35"N ; 61°6'59"O	390	Carbet	5800	0	0	A.D.
Canal Beauregard	14°43'10"N ; 61°9'49"O	180	Carbet	1800	0	0	A.D.
Rivière Céron	14°50'19"N ; 61°13'29"O	10	Céron	3700	0	0	A.D.
Case Petit	14°48'31"N ; 61°13'2"O	112	Prêcheur	1200	0	0	A.D.
Route de Depaz	14°45'27"N ; 61°9'49"O	120	Roxelane	2300	0	0	A.D.
Trois Ponts	14°45'25"N ; 61°9'43"O	60	Clitandre	1000	0	0	A.D.
Renault Saint-Pierre	14°45'15"N ; 61°9'50"O	70	Rivières des écrevisses	1200	0	0	A.D.
Cœur Bouliki	14°42'0"N ; 61°4'8"O	300	Rivière Blanche	2650	0	0.5	39.88
Fond Marie-Reine	14°45'52"N ; 61°7'12"O	320	Capot	2350	0	1	36.925
Mackintosh	14°46'41"N ; 61°7'0"O	350	Capot	2400	2	1	36.29
Fond Labour	14°48'24"N ; 61°5'55"O	290	Capot	2800	0	0	A.D.
Vallée Capot	14°50'18"N ; 61°5'28"O	20	Capot	3000	0	0.33	39.365
Stade Grand'Rivière	14°52'30"N ; 61°8'52"O	80	Grande Rivière	6300	0	0	A.D.
Route de Macouba	14°52'21"N ; 61°8'53"O	90	Rivière de Macouba	5900	0	0	A.D.
Bourg Basse Pointe	14°52'7"N ; 61°6'54"O	20	Basse Pointe	4400	0	0	A.D.
Fonds Saint-Jacques	14°47'50"N ; 61°0'27"O	70	Saint-Jacques	2700	3	0.58	36.32
Trace des Jésuites	14°44'47"N ; 61°5'9"O	314	Lorrain	4800	0	0	A.D.
Saut Babin	14°48'43"N ; 61°7'18"O	200	Capot	4500	0	0.33	40.19
EPLFPA Robert	14°39'24"N ; 60°56'2"O	0	Cacao	1500	1	0.33	40.53
Beauséjour	14°33'5"N ; 60°55'18"O	60	Beauséjour	900	2	0.33	40.16
Duchatel St Pierre	14°34'44"N ; 60°56'30"O	40	Saint Pierre	600	4	0.92	36.62
Monnerot	14°36'36"N ; 60°52'59"O	20	Beauregard	2700	2	0.33	39.685
Grands Fonds - François	14°36'50"N ; 60°55'18"O	12	Desroses	1500	1	1	37.61
Trois Bras	14°50'46"N ; 61°11'51"O		Trois Bras	7500	0	0	A.D.

Anse Couleuvre	14°50'30"N ; 61°12'17"O		Couleuvre	5400	0	0	A.D.
Rue Jambette	14°37'9"N ; 61°2'10"O	10	Jambette	750	2	1	34.72
EM Anse Madame	14°37'9"N ; 61°6'1"O	10	Case Navire	3300	2	0.33	38.51
Manzo	14°35'41"N ; 60°56'20"O	40	-	1000	17.165	1	37.88

Appendix 5. List of crayfish species and related GenBank accession numbers used during the *in-silico* development and validation of the assay

Species	Accession number
<i>Astacus astacus</i> (Linnaeus, 1758)	KF888289; KF888291; KF888293; KF888294
<i>Astacus leptodactylus</i> (Eschscholtz, 1823)	KY083052; KF181956; KF181958; KF181960; KF181963
<i>Austropotamobius pallipes</i> (Lereboullet, 1858)	AF237591; AF237596; AF237600; AF237603; AF237609
<i>Cherax destructor</i> (Clark, 1936)	AF500591; AF500592; AF500593; AF500594; AF500595; AF500596; AF500597; AF500598; AF500599; AF500600; AF500601; AF500602; AF500603; AF500604; AY150035; AY153857; AY153858; MH300648
<i>Cherax quadricarinatus</i> (von Martens, 1868)	AF135975; AY150034; DQ006552; EF493080; EU244879; EU244880; EU244881; EU244882; EU244883; EU244884; EU244885; EU244886; EU244887; EU244888; EU244889; EU244890; EU244891; EU244892; EU244893 ; KJ920761; KJ920762; KJ920763; KJ920764; KX258721; KX258722; KX258723; KX258724; MG199588
<i>Faxonius limosus</i> (Rafinesque, 1817)	KT959482; GQ168834; JF293366
<i>Faxonius virilis</i> (Hagen, 1870)	EU442668; EU442696; EU442706; EU442710; EU442712
<i>Pacifastacus leniusculus</i> (Dana, 1852)	JX077833; JX077838; JX077846; JX077850; JX077908; JX077921
<i>Procambarus clarkii</i> (Girard, 1852)	KJ645821; KJ645822; KJ645829; KJ645835
<i>Procambarus virginalis</i> (Lyko, 2017)	EU978457; FJ619797; FJ619799; FJ619800

Annexe 5

Matériels supplémentaires du Chapitre 3 « Écologie trophique de *Cherax quadricarinatus* et impacts sur les communautés des cours d'eau de Martinique. »

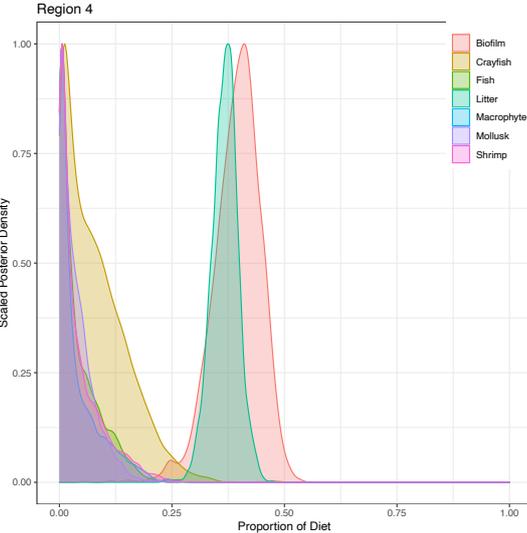
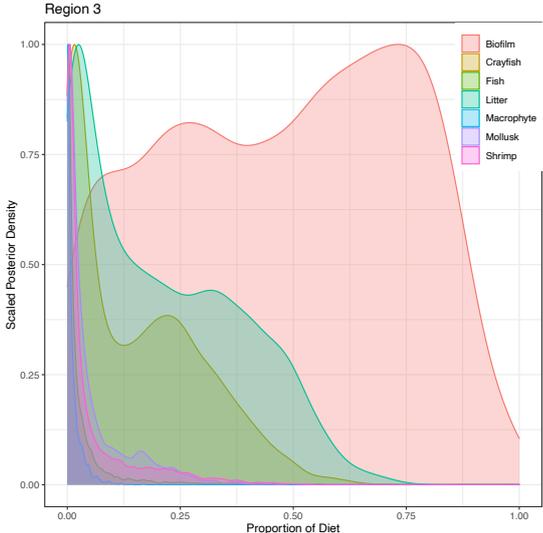
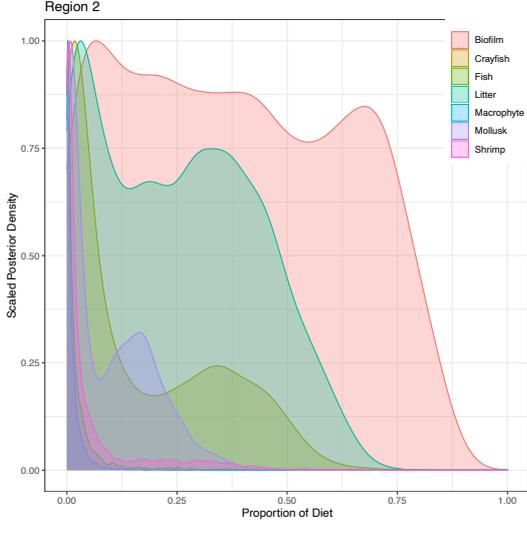
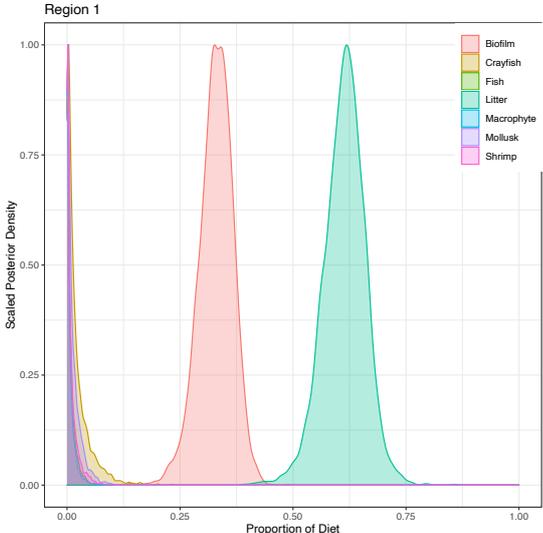
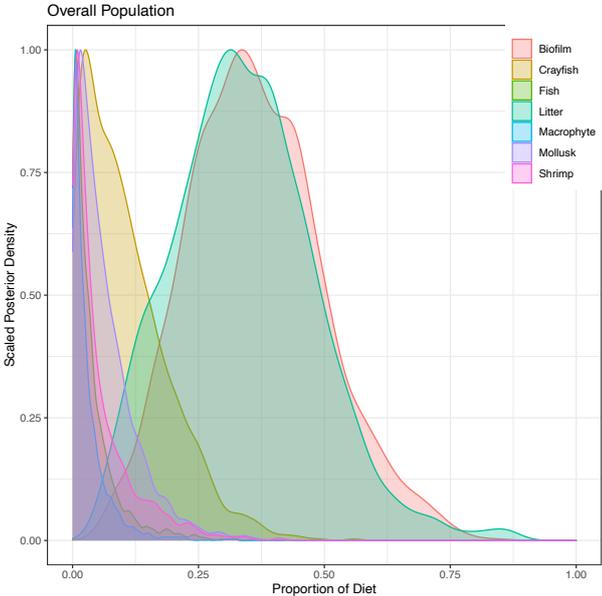
Supplementary data 1 : Global estimated contributions of the different taxa (biofilm, litter, macrophytes, fish, mollusk, shrimp and crayfish) to the diet of *Cherax quadricarinatus* and for each sampling station. Results are reported as mean, median and 97.5 confidence interval (97.5 CI), for each crayfish size class (Cherax I, II, III and IV).

Station	Food item	Proportion of food contribution											
		Cherax I			Cherax II			Cherax III			Cherax IV		
		Mean	Median	97.5% IC	Mean	Median	97.5% IC	Mean	Median	97.5% IC	Mean	Median	97.5% IC
Global	Biofilm	0.348	0.338	0.696	0.332	0.306	0.664	0.358	0.344	0.657	0.364	0.355	0.653
	Litter	0.271	0.262	0.562	0.24	0.214	0.559	0.283	0.268	0.56	0.341	0.333	0.636
	Macrophyte	0.058	0.032	0.279	0.096	0.058	0.424	0.057	0.037	0.217	0.031	0.017	0.137
	Fish	0.117	0.092	0.362	0.109	0.074	0.404	0.042	0.024	0.19	0.039	0.022	0.188
	Mollusk	0.084	0.055	0.355	0.11	0.07	0.419	0.038	0.02	0.194	0.065	0.047	0.227
	Shrimp	0.122	0.091	0.388	0.114	0.084	0.387	0.048	0.025	0.219	0.054	0.03	0.235
	Crayfish	-	-	-	-	-	-	0.173	0.152	0.444	0.106	0.087	0.319

Bassignac	Biofilm	0.15	0.153	0.217	0.259	0.261	0.305	0.303	0.303	0.339	0.329	0.331	0.397
	Litter	0.81	0.81	0.902	0.735	0.733	0.789	0.661	0.664	0.709	0.613	0.616	0.697
	Macrophyte	0.006	0.002	0.035	0.002	0	0.012	0.006	0.002	0.034	0.007	0.003	0.036
	Fish	0.011	0.005	0.054	0.002	0	0.011	0.005	0.002	0.03	0.007	0.003	0.036
	Mollusk	0.012	0.004	0.068	0.002	0	0.013	0.004	0.001	0.026	0.013	0.007	0.06
	Shrimp	0.012	0.005	0.064	0.002	0	0.013	0.005	0.002	0.028	0.01	0.001	0.05
	Crayfish	-	-	-	-	-	-	0.015	0.007	0.069	0.021	0.011	0.096
Cacao	Biofilm	0.524	0.581	0.991	0.796	0.807	0.854	0.521	0.591	0.77	0.38	0.369	0.811
	Litter	0.171	0.086	0.633	0.016	0.002	0.116	0.114	0.052	0.455	0.252	0.249	0.591
	Macrophyte	0.03	0.007	0.199	0.003	0	0.02	0.007	0.003	0.039	0.015	0.006	0.074
	Fish	0.102	0.036	0.555	0.008	0	0.052	0.01	0.003	0.054	0.033	0.009	0.276
	Mollusk	0.064	0.021	0.364	0.129	0.151	0.212	0.02	0.003	0.167	0.094	0.059	0.312
	Shrimp	0.109	0.045	0.548	0.048	0.006	0.227	0.017	0.004	0.132	0.063	0.014	0.394
	Crayfish	-	-	-	-	-	-	0.311	0.322	0.521	0.163	0.08	0.519
Saint-Esprit	Biofilm	0.476	0.532	0.776	0.75	0.755	0.8	0.487	0.566	0.734	0.476	0.495	0.903
	Litter	0.129	0.075	0.49	0.008	0.001	0.059	0.113	0.05	0.446	0.21	0.179	0.561

	Macrophyte	0.021	0.008	0.124	0.002	0	0.014	0.008	0.003	0.039	0.013	0.006	0.067
	Fish	0.15	0.105	0.466	0.019	0.001	0.251	0.011	0.003	0.059	0.034	0.009	0.258
	Mollusk	0.08	0.028	0.358	0.023	0.001	0.223	0.008	0.002	0.048	0.054	0.02	0.266
	Shrimp	0.143	0.107	0.442	0.198	0.225	0.288	0.016	0.003	0.164	0.059	0.014	0.339
	Crayfish	-	-	-	-	-	-	0.358	0.353	0.564	0.154	0.122	0.469
Saint-Jacques	Biofilm	0.311	0.317	0.414	0.426	0.432	0.467	0.391	0.403	0.468	0.395	0.4	0.481
	Litter	0.411	0.414	0.477	0.386	0.383	0.445	0.285	0.282	0.357	0.367	0.369	0.425
	Macrophyte	0.057	0.004	0.245	0.133	0.151	0.22	0.172	0.194	0.324	0.04	0.018	0.172
	Fish	0.096	0.082	0.267	0.027	0.004	0.155	0.041	0.013	0.201	0.041	0.023	0.155
	Mollusk	0.038	0.02	0.157	0.01	0.002	0.063	0.015	0.006	0.08	0.037	0.026	0.134
	Shrimp	0.088	0.063	0.304	0.019	0.003	0.132	0.028	0.009	0.16	0.043	0.022	0.178
	Crayfish	-	-	-	-	-	-	0.068	0.038	0.282	0.079	0.064	0.244

Supplementary data 2 : Global and by-region MixSIAR estimated source contributions for crayfish diet of all size classes. The results show Bayesian credibility intervals and posterior densities. Regions 1, 2, 3 and 4 correspond respectively to Bassignac, Cacao, Saint-Esprit and Saint-Jacques.



Annexe 6

“eDNA survey to detect an endemic cryptic fish, *Anablepsoides cryptocallus*, in tropical freshwater streams” est un article scientifique, accepté après revision dans la revue *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. Il fait suite à une étude, financée par l’Office de l’Eau de Martinique, ayant pour but de développer et d’optimiser la méthode ADN environnemental, afin de réaliser la première carte de distribution du poisson gale, seule espèce de poisson endémique d’eau douce de Martinique.

Page 1 of 29

Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems

1
2
3 1 eDNA survey to detect an endemic cryptic fish, *Anablepsoides cryptocallus*, in tropical
4
5 2 freshwater streams
6
7 3 Thomas Baudry^{1,2,3,4}, Quentin Mauvisseau⁵, Alexandre Arqué¹, Jean-Pierre Goût², Carine
8
9 4 Delaunay³, Hugo de Boer⁵, Frédéric Grandjean³
10
11 5
12 6 ¹ Direction de l’Environnement, de l’Aménagement et du Logement de Martinique, Route de la
13
14 7 Pointe de Jaham - BP7212, Schœlcher 97274, Martinique, France
15
16 8
17 9 ² Office De l’Eau de Martinique, 7 Avenue Condorcet, Fort-de-France, Martinique, France
18
19 10
20 11 ³ Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie
21
22 12 Evolution Symbiose, 5 rue Albert Turpin, Poitiers Cedex, France
23
24 13
25 14 ⁴ Groupe BIOSPHERES, Université des Antilles, Campus de Schoelcher, Martinique, France
26
27 15
28 16 ⁵ Natural History Museum, University of Oslo, Oslo, Norway
29
30 17
31 18
32 19 Corresponding author: Thomas Baudry, thmsbaudry@gmail.com
33
34 20
35 21
36 22
37 23
38 24
39 25
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 26 **Abstract**
4
5
6 27
7
8 28

- 9
10 29
11
12 30
13
14 31
15
16
17 32
18
19 33
20
21 34
22
23
24 35
25
26 36
27
28 37
29
30 38
31
32
33 39
34
35 40
36
37 41
38
39 42
40
41 43
42
43 44
44
45 45
46
47 46
48
49
50
51 47
52
53
54 48
55
56 49
57
58
59
60
1. Martinique is a biodiversity hotspot harbouring many endemic species in the Lesser Antilles in the Caribbean. One of these, *Anablepsoides cryptocallus*, also known as "Poisson gale", is the only endemic freshwater fish of Martinique and a species with a poorly known distribution range.
 2. In this study, we developed, validated, and optimized an environmental DNA detection protocol, targeting a short fragment of the *A. cryptocallus* COI mitochondrial gene, to investigate its presence in Martinique island. A total of 57 sites spread over 43 permanent rivers and two wetlands were sampled through both eDNA and conventional fishing (dip-net capture).
 3. Presence was confirmed in 27 sites using eDNA detection, and in nine by dip-net fishing. eDNA-based detection was effective for *A. cryptocallus* in Martinique and less time-consuming than conventional fishing, making it a relevant tool for future studies throughout the territory. Despite that *A. cryptocallus* was found to be present in a significant number of sites, the situation remains alarming, as historically known sites have been found to have lost the species.
 4. It is now urgent to propose protection status for this endemic species to preserve its preferential habitats which are increasingly threatened by anthropic activities, which are leading to habitat fragmentation and loss.

51
52
53
54 47 *Keywords:* Endemic species, Environmental DNA, Freshwater, Martinique, Real time PCR,
55
56 48 Tropical environment
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

50 **1. Introduction**

51

52 Human activities including pollution, introduction of non-native species, habitat
53 modification and climate changes, are leading to a global degradation of all ecosystems,
54 whether marine or terrestrial, resulting in a considerable erosion of their biodiversity (Ferreira
55 et al., 2017; Hautier et al., 2015). Current species extinctions rates are estimated to be about
56 100 times higher than the average extinction rate during previous major crises in geological
57 time, and the current biodiversity crisis is now recognized as the 6th species extinction crisis
58 (Lawton and May, 1996). This biodiversity loss impacts ecosystem structures and modifies
59 their functional equilibrium, and in turn affects their capacity for resilience to disturbances.
60 These ecosystems thus become more fragile and less resistant to biological invasions, a major
61 factor in current biodiversity loss linked to increases in global exchange. These impacts are
62 even more significant and rapid in island environments. Islands are often home to smaller
63 populations that are very sensitive to environmental disturbances, making their ecosystems very
64 fragile (Myers et al., 2000; Vitousek et al., 1996). There is therefore an urgent need to set up
65 environmental protection programs to preserve their biodiversity and their ecological functions
66 (Flitcroft et al., 2019). However, to establish such protection programs, it is necessary to have
67 a good knowledge of these environments, as well as the various species that they harbour. This
68 requires inventories, with accurate species identification and assessment (endemic, rare,
69 endangered, or invasive) to inform policy for protection of these environments, but also to
70 assess the health of the ecosystems and the species that inhabit them.

71

72 Martinique is a rugged island of 1128 km², located in the Lesser Antilles archipelago in
73 the Atlantic Ocean. Despite its small size, it has a wide variety of landscapes and terrestrial
74 ecosystems with more than 70 permanent rivers – as well as many non-permanent ones, tropical

1
2
3 75 forests, wetlands or mangroves (DEAL Martinique et al., 2018). Its diverse ecosystems host a
4
5 76 wide variety of flora and fauna, with an overall high endemism rate for the Antilles (DEAL
6
7 77 Martinique et al., 2018).

8
9
10 78 Among the Antillean endemics, *Anablepsoides cryptocallus*, better known by its vernacular
11
12 79 name "Poisson gale", is the only endemic freshwater fish in Martinique (Lim et al., 2002). It
13
14 80 belongs to the Rivulidae family and is mainly found in aquatic systems of varying size such as
15
16 81 ditches, pools or backwaters, characterized by a weak current (or even absence of current) and
17
18 82 a dense riparian cover (Lim et al., 2002). However, the ecological requirements of this fish
19
20 83 remain poorly understood. In 2019, a study commissioned by the Direction de l'Environnement,
21
22 84 de l'Aménagement et du Logement (DEAL) of Martinique and the Office de l'Eau (ODE) of
23
24 85 Martinique was conducted to establish potential distribution map of the species based on
25
26 86 bibliographic research, modelling of its preferred habitat and field surveys using dip-nets.
27
28 87 Modelling of its preferred habitats (Appendix A) highlighted "hotspots", i.e. areas where the
29
30 88 environment characteristics led to a higher detection probability of the species considering the
31
32 89 following criteria: cloudiness, height of vegetation, distance from woodland, altitude, and slope.
33
34 90 These areas were mainly located both in the centre of the island and on the North Atlantic coast,
35
36 91 where the species was historically recorded. Subsequent dip-net fishing at previously known
37
38 92 and predicted sites, confirmed its presence in 10 sites but also suggested its disappears from
39
40 93 some of the historically known sites, particularly on the North Atlantic coast (Biotope, 2020).
41
42 94 A further documentary search and collection of testimonies from local fishermen revealed the
43
44 95 existence of 25 additional sites where *A. cryptocallus* potentially occurs. Nevertheless its
45
46 96 preferred habitat of ditches and wetlands makes it highly sensitive to impact from human
47
48 97 activities such as ditch cleaning or the destruction of wetlands, both of which are common in
49
50 98 Martinique.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 75 forests, wetlands or mangroves (DEAL Martinique et al., 2018). Its diverse ecosystems host a
4
5 76 wide variety of flora and fauna, with an overall high endemism rate for the Antilles (DEAL
6
7 77 Martinique et al., 2018).

8
9
10 78 Among the Antillean endemics, *Anablepsoides cryptocallus*, better known by its vernacular
11
12 79 name "Poisson gale", is the only endemic freshwater fish in Martinique (Lim et al., 2002). It
13
14 80 belongs to the Rivulidae family and is mainly found in aquatic systems of varying size such as
15
16 81 ditches, pools or backwaters, characterized by a weak current (or even absence of current) and
17
18 82 a dense riparian cover (Lim et al., 2002). However, the ecological requirements of this fish
19
20 83 remain poorly understood. In 2019, a study commissioned by the Direction de l'Environnement,
21
22 84 de l'Aménagement et du Logement (DEAL) of Martinique and the Office de l'Eau (ODE) of
23
24 85 Martinique was conducted to establish potential distribution map of the species based on
25
26 86 bibliographic research, modelling of its preferred habitat and field surveys using dip-nets.
27
28 87 Modelling of its preferred habitats (Appendix A) highlighted "hotspots", i.e. areas where the
29
30 88 environment characteristics led to a higher detection probability of the species considering the
31
32 89 following criteria: cloudiness, height of vegetation, distance from woodland, altitude, and slope.
33
34 90 These areas were mainly located both in the centre of the island and on the North Atlantic coast,
35
36 91 where the species was historically recorded. Subsequent dip-net fishing at previously known
37
38 92 and predicted sites, confirmed its presence in 10 sites but also suggested its disappears from
39
40 93 some of the historically known sites, particularly on the North Atlantic coast (Biotope, 2020).
41
42 94 A further documentary search and collection of testimonies from local fishermen revealed the
43
44 95 existence of 25 additional sites where *A. cryptocallus* potentially occurs. Nevertheless its
45
46 96 preferred habitat of ditches and wetlands makes it highly sensitive to impact from human
47
48 97 activities such as ditch cleaning or the destruction of wetlands, both of which are common in
49
50 98 Martinique.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 125 conducted in 57 sites spread over 43 permanent rivers and two wetlands. All 57 sites were
4
5 126 additionally investigated through conventional fishing.
6

7
8 127

9
10 128 **2. Material and methods**

11
12 129 *2.1. In-situ sampling protocol*

13
14
15 130

16
17 131 A total of 57 sites spread over 43 permanent rivers and two wetlands were surveyed. The
18
19 132 choice of these sampled sites was based on historically known presence, but also on the
20
21 133 distribution model issued by Biotope (2020) (Appendix A). Sites where the presence of *A.*
22
23 134 *cryptocallus* was identified by the Biotope (2020) study were also investigated, in order to serve
24
25 135 as positive *in-situ* controls. All sites were sampled by conventional fishing, dredging the banks
26
27 136 and aquatic macrophytes with a dip net.
28
29

30
31 137 Water samples were collected according to the method described by Baudry et al. (2021).
32
33 138 Briefly, water was collected from one river bank to the other in a sterile plastic bottle using
34
35 139 gloves (Coward et al., 2018). The water was then poured into a Nalgene™ filtration unit
36
37 140 (Lawson Handley et al., 2019) with nitrocellulose filters (Sartorius® 47 mm diameter and 0.45
38
39 141 µm pore size) and the vacuum pump was engaged. Filtration took place until the filter was
40
41 142 saturated with the suspended solids present in the water. The volume filtered was then recorded,
42
43 143 and the filter folded into quarters and preserved in tubes filled with molecular grade absolute
44
45 144 ethanol. Three biological replicates (three filters) were collected per site.
46
47

48
49 145 To avoid cross-contamination between sites, all material was decontaminated using a 50%
50
51 146 bleach solution after each site and thoroughly rinsed with tap water. At each site, a control
52
53 147 sample (1000 mL of distilled water) was filtered in the same way as described above before
54
55 148 filtering water from the site. This negative control between each site was performed to avoid
56
57 149 possible false positives between the different surveyed locations. All samples were stored in a
58
59
60

1
2
3 150 cooler until they were returned to the laboratory where they were stored at -20°C before
4
5 151 analysis.

6
7
8 152

9
10 153 2.2. DNA extraction from filter

11
12 154

13
14
15 155 All extractions were carried out in dedicated rooms, where the benches were disinfected
16
17 156 every night by UV treatment to avoid any risk of contamination. All surfaces, equipment, and
18
19 157 tools were sterilized using a 50% bleach solution.

20
21 158 Following the protocol in Baudry et al. (2021), a quarter of a filter was cut and dried for 15
22
23 159 min to evaporate ethanol. Qiagen® DNeasy Blood & Tissue Kit DNA extraction kit (Düsseldorf,
24
25 160 Germany) was then used to isolate total DNA from each filter, following the manufacturer's
26
27 161 recommendations with some modifications, as in Baudry et al. (2021). Extraction yields were
28
29 162 then measured using the NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington,
30
31 163 Delaware) (Appendix B) and the samples were stored at -20°C until analysis by real-time PCR
32
33 164 (Roche LightCycler® 480 II, Basel, Switzerland).

34
35
36 165

37
38
39
40 166 2.3. qPCR assays

41
42 167

43
44
45 168 The primers and probe were designed using Geneious Pro R10 software
46
47 169 (<https://www.geneious.com>; Kearsse et al., 2012), based on the sequences present in GenBank
48
49 170 (Appendix C) and following the method outlined in Brys et al. (2020). Using sequences isolated
50
51 171 from a portion of the COI mitochondrial gene (Biotope, 2020), a set of species-specific primers
52
53 172 and probe targeting a 125-base-pair fragment of the COI gene, was developed (Forward 5'-
54
55 173 AATAATTGGAGCCCCTGACA-3', Reverse 5'-TTCACCCTGTTCTGCTCCT-3', and 6-
56
57 174 FAM MGB probe 5'-ACTTTTACCCCTCTTTCT-3'). Using Geneious "Primer Design"

58
59
60

1
2
3 175 function, their specificity was assessed by visual alignment using COI sequences of co-
4
5 176 occurring fish and crustacean species from the West Indies and genetically closed species. *In-*
6
7 177 *silico* tests were done using the NCBI primer projection tool
8
9
10 178 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

11
12 179 Following *in-silico* validation, the set or primers/probe was tested at different
13
14 180 concentrations (from 0.5 μ M to 10 μ M final concentration) and different annealing
15
16 181 temperatures (from 55°C to 61°C). Specificity was tested *in-vitro* with real-time PCR, under
17
18 182 optimal conditions, using DNA extracted from fish species co-occurring in Martinique and/or
19
20 183 genetically close: *Hypostomus plecostomus*, *Ancystrus* sp. and *Hypostomus robinii* (three
21
22 184 species of the Loricaridae family, highly valued in aquaria, including *H. robinii* occurring
23
24 185 naturally in Martinique), *Poecilla reticulata* (a species of guppy, introduced in Martinique) and
25
26 186 *Kryptolebias marmoratus* (a Rivulidae species occurring naturally in Martinique).

27
28
29
30
31 187

32 33 188 2.4. Mesocosms

34
35 189

36
37 190 Mesocosm experiments were carried out to assess the primers efficiency on eDNA extracted
38
39 191 from known positive samples. Two conditions were tested: two specimens (one male and one
40
41 192 female) in 2 litres of water and two specimens (one male and one female) in 50 litres of water.
42
43 193 The specimens were left for one week in the aquaria, as an accommodation period during which
44
45 194 eDNA could diffuse into the water. The water temperature and pH were maintained at 27°C
46
47 195 and 7.5 respectively, in line with the values found in the preferred environment of *A.*
48
49 196 *cryptocallus*, with a natural 12/12h photoperiod. After a week, eDNA samples were performed
50
51 197 in the mesocosm, and water was filtered into two biological replicates (two filters) for each
52
53 198 condition following the method described above. Two real-time PCR replicates (technical
54
55 199 replicates) were performed on each biological replicate.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

200

201 2.5. qPCR analyses

202

203 Two real-time PCR replicates were performed on the DNA extracted from each filter
204 using a LightCycler® 480 II quantitative thermocycler (Roche, Basel), at the determined optimal
205 conditions. These were performed on the extracted DNA from each filter, and this corresponded
206 to six amplifications per site (i.e. three filters per site and two replicates per filter).

207 Reactions were performed in a 25 µL final volume: 12.5µL of TaqMan Environmental
208 Master Mix® 2.0 (Life Technologies, Applied Biosystems), 2.5 µL of each primers (5 µM), 1
209 µL of probe (5 µM), 1.5 µL of sterile water and 5 µL of eDNA. Each 96-well plate contained
210 four control samples (qPCR mix to which water was added instead of eDNA) to test for possible
211 contamination during amplification. *In-situ* negative controls (distilled water filtered between
212 each site) were analysed in duplicates.

213 Standard curves were generated by performing serial dilutions with DNA extracted directly
214 from individuals collected in Martinique were also included to assess the quality of the
215 amplified products. The concentrations of the dilutions ranged from 20 ng.µL⁻¹ (NanoDrop®
216 1000 spectrophotometer) to 2.375 x 10⁻⁷ ng.µL⁻¹. A signal was considered positive when the
217 number of amplification cycles (Ct Value) did not exceed 42 (Agersnap et al., 2017) and the
218 site was considered to harbour *A. cryptocalhus* if at least one replicate out of six tested was
219 positive (Bedwell and Goldberg, 2020).

220

221 2.6. Limit of Detection and Limit of Quantification

222

223 To investigate the sensitivity of our method, we followed the Minimum Information for
224 Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) Guidelines requirements

1
2
3 225 defined by Bustin et al. (2009) and both Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification
4
5 226 (LOQ) were determined. LOD and LOQ were determined following the analysis of the
6
7 227 previously described dilution series, with concentrations ranging from 20 ng.µL⁻¹ to 2.4x10⁻⁷
8
9
10 228 ng.µL⁻¹, where each dilution was analysed in 10 replicates.

11
12 229 The LOD corresponded to the minimum concentration at which eDNA could be detected
13
14 230 (1 in 10 replicates at a Ct < 45) and the LOQ corresponded to the minimum concentration at
15
16 231 which quantification was possible (9 in 10 replicates at a Ct < 45) (Mauvisseau et al., 2019;
17
18 232 Baudry et al., 2021).

19
20
21 233

22 234 2.7. eDNA transport

23
24
25
26 235

27
28 236 The effectiveness of the method, in terms of the distance at which eDNA can be detected
29
30 237 in the main river, was tested through an "eDNA transport" experiment. For this, the "Coeur
31
32 238 Bouliki" area was chosen, where *A. cryptocallus* was known to be present in a ditch, with a
33
34 239 very weak flow rate, connected approximatively 20 meters downstream to the main river (called
35
36 240 'Rivière Blanche'). Water was therefore filtered (as described above) directly from the ditch
37
38 241 and then downstream from the riverbed at four different points (200 m, 500 m, 1000 m, and
39
40 242 1500 m) (Figure 1). One biological sample (filter) was collected per site and then two technical
41
42 243 replicates were performed per filter. To ensure that the DNA detected was from the targeted
43
44 244 fish population, a complete inventory of the ditches and backwaters present in the study area
45
46 245 was carried out using a dip net.

47
48
49
50
51 246

52 247 2.8. Analysis

53
54
55
56 248

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

249 The maps were generated using QGIS 2.18 (Las Palmas) software (QGIS Development
250 Team, 2016), with the Martinique map coming from the IGN database and the watercourses
251 from BD Carthage and BD Topo. All field data were compiled in Appendix B.

252

253 **3. Results**

254 *3.1. qPCR assays*

255

256 Analysis of the results shows that the optimal conditions for sample processing were: 5 μ M
257 of primers and probe concentration and 60°C for the annealing temperature. Under these
258 conditions, primers/probe were specific to *A. cryptocallus*. Additionally, *in-silico* alignment
259 tests using online databases revealed no amplification of other species and other DNA samples
260 tested *in-vitro* (*H. plecostomus*, *H. robinii*, *P. reticulata*, *Ancystrus sp*, *K. marmoratus*).

261 The LOD (1 replicate out of 10) corresponded to a concentration of 9.5×10^{-7} ng. μ L⁻¹ and
262 the LOQ (9 replicates out of 10) corresponded to a concentration of 1.5×10^{-5} ng. μ L⁻¹.

263

264 *3.2. Mesocosm*

265

266 All eDNA samples from the controlled mesocosms (including both volumes conditions)
267 showed positive detection of *A. cryptocallus* through real-time PCR. This was observed after
268 an average of 20.57 ± 0.19 cycles for the 1.5 litre condition and after an average of $32.105 \pm$
269 0.23 cycles for the 50 litres condition. An influence of the volume of the mesocosm on the
270 detection efficiency was observed, with a decrease in the number of cycles when the mesocosm
271 volume decrease.

272

273 *3.3. eDNA transport*

1
2
3 274

4
5 275 Detection of *A. cryptocallus* DNA was possible at each sampling point up to 1500 m
6
7
8 276 (Figure 1), with decreasing efficiency the further away from the ditch, in the principal river:
9
10 277 from an average of 36.13 ± 0.1 cycles at 200 m from the source of eDNA emission to 39.54
11
12 278 cycles at 1500 m. Both technical replicates were positive at each point, except for the furthest
13
14 279 point (1500 m, only one replicate out of two) (Figure 1).

15
16
17 28018
19 281 3.4. *In-situ detection*20
21 282

22
23
24 283 No control samples were tested positive, indicating the absence of contamination
25
26 284 between sites or during laboratory procedures. Of the 57 sites surveyed using eDNA analysis,
27
28 285 27 were found to be positive, with an amplification rate between one and six out of the six
29
30 286 technical replicates, corresponding to 19 different rivers and two wetlands (Appendix B, Figure
31
32
33 287 2). Of the positive sites surveyed, *A. cryptocallus* had already been captured at 7 by
34
35 288 conventional fishing during the study conducted by Biotope (2020): Golf Trois Ilets – 6/6
36
37 289 replicates, Pont N8 – 4/6 replicates, Coeur Bouliki – 6/6 replicates, Tivoli – 6/6 replicates, Petit
38
39 290 Pré – 6/6 replicates, François – 4/6 replicates and Anses d'Arlets – 6/6 replicates (Appendix B).
40
41
42 291 Some catchments appear to have several sites harbouring *A. cryptocallus*, for example Lézarde,
43
44 292 Galion, Coulisses, François, Longvilliers and Lorrain (Figure 2). No populations appeared to
45
46 293 be present in the North Atlantic coast area, North Caribbean and in the South Atlantic area.

47
48
49 294 During the dip-net surveys, nine sites were found to be positive, and no site was found
50
51 295 to be positive by this monitoring method alone (i.e. these nine sites were also positive using
52
53 296 eDNA detection survey). All the positive sites historically recorded in 2019 were investigated,
54
55 297 representing seven sites, and two new points of presence were discovered: Usine du Galion and
56
57 298 Quartier Rivière Lézarde 2. Among the 27 positive sites, 18 have not yet been confirmed by
58
59
60

1
2
3 299 fishing, and therefore required additional surveying on site to confirm the positive eDNA
4
5 300 detection (Appendix B).
6
7
8 301

9
10 302 **4. Discussion**
11
12 303

13
14 304 eDNA detection for monitoring *A. cryptocallus* was found to be accurate and reliable to
15
16 305 establish a fast and exhaustive mapping of the distribution of this endemic species in
17
18 306 Martinique. Indeed, the validation steps recommended by Thalinger et al. (2021) have shown
19
20 307 the specificity of the primers and the probe *in-silico* and *in-vitro*. LOD and LOQ (respectively
21
22 308 9.5×10^{-7} ng. μL^{-1} and 1.5×10^{-5} ng. μL^{-1}) showed a highly sensitive detection method. The
23
24 309 mesocosm experiments, as well as sites where *A. cryptocallus* had been previously captured
25
26 310 and which served as positive controls, allowed to further validate the methodology.
27
28
29
30
31 311

32
33 312 Of the 57 sites surveyed, 27 were found to be positive for the presence of *A. cryptocallus*,
34
35 313 which is a significant increase over the Biotope study that identified the species in 10 sites only
36
37 314 by traditional fishing. For our study, only seven of the 10 sites fished by Biotope were retained
38
39 315 due to adverse weather conditions (notably drought) which made eDNA surveys unfeasible.
40
41 316 These sites were all positive using the molecular method survey (Figure 2). Among the areas
42
43 317 historically known to harbour this species, the Galion area was found to be positive (using both
44
45 318 eDNA and fishing) although no fish had been caught during the field surveys carried out by
46
47 319 Biotope (2020). This result reflects the high efficiency of this eDNA detection compared to
48
49 320 more invasive traditional inventory methods, already reported in the literature, such as for the
50
51 321 blue crayfish *Cherax quadricarinatus* (Baudry et al., 2021).
52
53
54
55
56 322
57
58
59
60

1
2
3 323 Overall, of the 27 eDNA positive sites, nine were confirmed by dip-netting (33.3%). This low
4
5 324 percentage of confirmation, compared to other studies conducted in Martinique, can be
6
7 325 explained by the following points: (1) The difficulty of capturing individuals using traditional
8
9 326 fishing techniques. *A. cryptocallus* lives in muddy ditches or even in areas often disconnected
10
11 327 from the main river, and these areas are hard to survey effectively. In addition, during the dry
12
13 328 season, when water is scarce, *A. cryptocallus* can bury itself in the mud for several days or even
14
15 329 weeks, making it invisible and hard to capture. The capture of several individuals at nightfall
16
17 330 could also suggest a nocturnal life rhythm. However, most surveys in this study were carried
18
19 331 out during the day; (2) The low density of fish makes its capture difficult and more random.
20
21 332 This may be reflected by the low number of positive technical replicates at specific sites when
22
23 333 low amounts of little eDNA are released into the environment. Moreover, for the sites showing
24
25 334 6/6 replicates eDNA positives, most were confirmed by fishing (5 out of 6 sites); (3) The
26
27 335 distance of the population from the source of eDNA emission. Indeed, the eDNA detection
28
29 336 experiment along a linear river revealed the possible detection up to 1500 m in the main river.
30
31 337 Thus, the presence of an upstream population could be detected at several downstream sites of
32
33 338 the same river. A reduction in detection efficiency would be observed from upstream to
34
35 339 downstream, with a decrease in the number of positive technical replicates. However, this could
36
37 340 also be explained by the presence of fish in a larger body of water, and therefore with greater
38
39 341 dilution of the DNA. However, as large rivers are not the preferred habitat for *A. cryptocallus*,
40
41 342 upstream presence seems the most likely hypothesis. Several rivers illustrate these results well:
42
43 343 the Rivière Coulisses with the upstream site 'Parcours sportif Saint-Esprit' (2/6 replicates) and
44
45 344 the downstream site 'Petit Bourg' (1/6 replicates), Rivière Blanche with the upstream site 'Cœur
46
47 345 Bouliki' (6/6 replicates) and the downstream site 'Quartier Hotel Plaisir' (1/6 replicates) and
48
49 346 finally the Rivière Galion with the upstream site 'Saint-Luce' (6/6 replicates) and the
50
51 347 downstream site 'Bassignac' (5/6 replicates). Some rivers were not sampled in the upstream
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 348 part, but showed positive eDNA results in their downstream part, for example: the Saint-
4
5 349 Jacques River (1/6 replicates), the Cacao River (site 'EPLEFPA Robert' with 2/6 replicates), the
6
7 350 Jambette River (site 'Rue Jambette' with 2/6 replicates). Thus, it is highly likely that the
8
9
10 351 presence of *A. cryptocallus* is located further upstream from these sites and therefore not
11
12 352 sampled by traditional methods at the sites sampled.

13
14 353 It is important to note that this technique makes it possible to point to novel survey sectors
15
16 354 upstream from the sampling sites, and positive detection could be an indication to increase
17
18 355 sampling upstream, rather than an actual point of presence.

19
20
21 356
22
23 357 Some catchment areas appear to be very interesting for the presence of the species, such
24
25 358 as the Lézarde, Galion, Coulisses and Lorrain. The discovery of positive sites, for example in
26
27 359 certain North Atlantic sites, is encouraging because they are among the areas favourable for the
28
29 360 presence of *A. cryptocallus* (Appendix A) even though the last surveys in 2019 were
30
31 361 unsuccessful (Biotope, 2020). The perspectives arising from this work firstly lie in carrying out
32
33 362 conventional fishing to confirm the presence of this species on the positive sites identified in
34
35 363 this study. This is especially important at upstream sites, as it will then be possible to refine the
36
37 364 precise location of the populations by taking additional samples in the upstream part when sites
38
39 365 located downstream have proved positive. These surveys should be carried out during the wet
40
41 366 season to avoid the individuals burying themselves in the mud. Despite the discovery of new
42
43 367 populations, the abundance of these fish in Martinique remains low and with a declining area
44
45 368 of occurrence. Their rarefaction is mainly due to the modification, even the destruction, of their
46
47 369 ecological niche. Indeed, this species lives in wetlands and ditches, and these are intensely
48
49 370 targeted by anthropic activities (cleaning, drainage, drying out, etc.) that lead to habitat
50
51 371 destruction, loss, and fragmentation.

52
53
54 372
55
56
57
58
59
60

1
2
3 373 Implications for conservation
4

5 374 These ecosystems, especially wetlands or ditches, receive less attention than other
6
7
8 375 habitats and protection programs are therefore difficult to set up (Flitcroft et al., 2019). The
9
10 376 presence of this rare endemic species in these ecologically important areas should promote a
11
12 377 better protection of these habitats and benefit other co-occurring species. However, despite its
13
14 378 recognized status as the only endemic freshwater fish species in Martinique (Lim et al., 2002),
15
16 379 *A. cryptocallus* still does not benefit from any particular protection status. The current study
17
18 380 makes an important contribution to the baseline data for an IUCN Red List of Threatened
19
20 381 Species assessment for this taxon, and this in turn can help to prioritize it for targeted
21
22 382 conservation efforts. It would be very valuable to study the health status of the populations as
23
24 383 well as their genetic diversity to establish management units and conservation priorities, which
25
26 384 could also lead to a protection status for *A. cryptocallus*.
27
28
29
30
31
32

33 385
34 **Acknowledgement**
35

36 387 The authors would like to thank the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and
37
38 388 the University of Poitiers for the provision of all the equipment necessary to carry out the study.
39
40 389 This project was funded by the Office de l'Eau de Martinique (ODE) and technically supported
41
42 390 by the Office de l'Eau de Martinique (ODE) and the Direction de l'Environnement, de
43
44 391 l'Aménagement et du Logement de Martinique.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

398

399 **References**

400

401 Agersnap, S., Larsen, W.B., Knudsen, S.W., Strand, D., Thomsen, P.F., Hesselsøe, M.,

402 Mortensen, P.B., Vrålstad, T., Møller, P.R. (2017). Monitoring of noble, signal and

403 narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS ONE*,404 12, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179261>

405 Baudry, T., Mauvisseau, Q., Goût, J., Arqué, A., Delaunay, C., Smith-ravin, J., Sweet, M.

406 (2021). Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot, an eDNA-based success

407 story. *Ecological Indicators*, 126. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107637>

408 Bedwell, M.E., Goldberg, C.S. (2020). Spatial and temporal patterns of environmental DNA

409 detection to inform sampling protocols in lentic and lotic systems. *Ecology and*410 *Evolution*, 10, 1602–1612. <https://doi.org/10.1002/ece3.6014>411 Biotope (2020). *Étude d'amélioration de la connaissance sur le Poisson Gale (Anablepsoides*412 *cryptocallus) : distribution, état de conservation, mesures et recommandations*. 43 pages.

413 Brys, R., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Mauvisseau, Q., Auwerx, J., Sweet, M., Mergeay, J.

414 (2020). Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach

415 (*Misgurnus fossilis*). *Journal of Fish Biology*, 98, 399-414.416 <https://doi.org/10.1111/jfb.14315>

417 Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R.,

418 Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. (2009). The

419 MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR

420 experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611–622.421 <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

422 Cantera, I., Cilleros, K., Valentini, A., Cerdan, A., Dejean, T., Iribar, A., Taberlet, P.,

- 1
2
3 423 Vigouroux, R., Brosse, S. (2019). Optimizing environmental DNA sampling effort for
4
5 424 fish inventories in tropical streams and rivers. *Scientific Reports*, 9, 1–11.
6
7 425 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39399-5>
8
9
10 426 Cowart, D.A., Breedveld, K.G.H., Ellis, M.J., Hull, J.M., Larson, E.R. (2018). Environmental
11
12 427 DNA (eDNA) applications for the conservation of imperiled crayfish (Decapoda:
13
14 428 Astacidea) through monitoring of invasive species barriers and relocated populations.
15
16 429 *Journal of Crustacean Biology*, 38, 257–266. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruy007>
17
18 430 DEAL Martinique, ECOVIA, CREOCEAN. (2018). *Diagnostic - Profil Environnemental de*
19
20 431 *la Martinique*. 139 pages.
21
22
23 432 Deiner, K., Altermatt, F. (2014). Transport distance of invertebrate environmental DNA in a
24
25 433 natural river. *PLoS ONE*, 9, e88786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>
26
27
28 434 Ferreira, A.R.L., Sanches Fernandes, L.F., Cortes, R.M.V., Pacheco, F.A.L. (2017). Assessing
29
30 435 anthropogenic impacts on riverine ecosystems using nested partial least squares
31
32 436 regression. *Science of the Total Environment*, 583, 466–477.
33
34 437 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.106>
35
36
37 438 Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008). Species detection using
38
39 439 environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4, 423–5.
40
41 440 <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
42
43
44 441 Flitcroft, R., Cooperman, M.S., Harrison, I.J., Juffe-Bignoli, D., Boon, P.J. (2019). Theory
45
46 442 and practice to conserve freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Aquatic*
47
48 443 *Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29, 1013–1021.
49
50 444 <https://doi.org/10.1002/aqc.3187>
51
52
53 445 Hautier, Y., Tilman, D., Isbell, F., Seabloom, E.W., Borer, E.T., Reich, P.B. (2015).
54
55 446 Anthropogenic environmental changes affect ecosystem stability via biodiversity.
56
57 447 *Science*, 348, 336–340. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1788>
58
59
60

- 1
2
3 448 Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S.,
4
5 449 Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond,
6
7 450 A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for
8
9 451 the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649.
10
11 452 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
12
13 453 Lawson Handley, L., Read, D.S., Winfield, I.J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., Hahn, C.,
14
15 454 Blackman, R., Wilcox, R., Donnelly, R., Szitenberg, A., Hänfling, B. (2019). Temporal
16
17 455 and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England’s largest lake.
18
19 456 *Environmental DNA*, 1, 26–39. <https://doi.org/10.1002/edn3.5>
20
21 457 Lawton, J.H., May, R.M. (1996). Extinction rates. *Journal of Evolutionary Biology*, 9, 124–
22
23 458 126.
24
25 459 Lim, P., Meunier, F.J., Keith, P.A., Noël, P.Y. (2002). *Atlas des poissons et des crustacés*
26
27 460 *d’eau douce de la Martinique*. Collection patrimoines naturels.
28
29 461 Mauvisseau, Q., Tönges, S., Andriantsoa, R., Lyko, F., Sweet, M. (2019). Early detection of
30
31 462 an emerging invasive species: EDNA monitoring of a parthenogenetic crayfish in
32
33 463 freshwater systems. *Management of Biological Invasions*, 10, 461–472.
34
35 464 <https://doi.org/10.3391/mbi.2019.10.3.04>
36
37 465 Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A., Kent, J. (2000).
38
39 466 Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.
40
41 467 <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35002501>
42
43 468 Piggott, M.P. (2016). Evaluating the effects of laboratory protocols on eDNA detection
44
45 469 probability for an endangered freshwater fish. *Ecology and Evolution* 6, 2739–2750.
46
47 470 <https://doi.org/10.1002/ece3.2083>
48
49 471 Team QGIS Development. (2016). QGIS Geographic Information System. Open Source
50
51 472 Geospatial Foundation Project.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 473 Thalinger, B., Deiner, K., Harper, L.R., Rees, H.C., Blackman, R.C., Sint, D., Traugott, M.,
4
5 474 Goldberg, C.S., Bruce, K. (2021). A validation scale to determine the readiness of
6
7
8 475 environmental DNA assays for routine species monitoring. *Environmental DNA*, 3, 823-
9
10 476 836. <https://doi.org/10.1002/edn3.189>
11
12 477 Thomsen, P.F., Willerslev, E. (2015). Environmental DNA - An emerging tool in
13
14 478 conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183,
15
16 479 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
17
18
19 480 Vitousek, P.M., Loope, L.L., Westbrooks, R. (1996). Biological invasions as global
20
21 481 environmental change. *American Scientist*, 218–229.
22
23
24 482
25
26 483
27
28 484
29
30 485
31
32 486
33
34 487
35
36 488
37
38 489
39
40 490
41
42 491
43
44 492
45
46 493
47
48 494
49
50 495
51
52 496
53
54 497
55
56
57
58
59
60

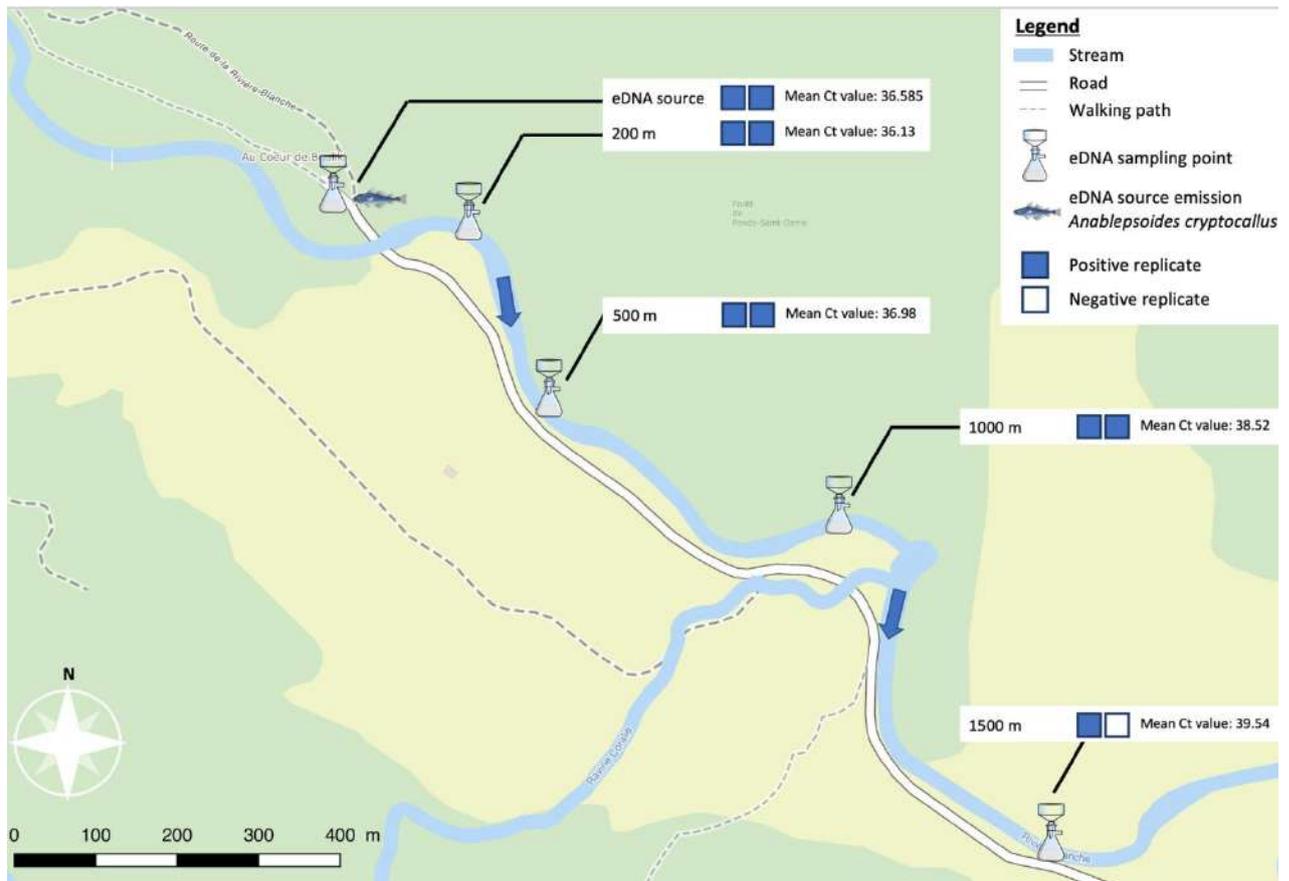


Figure 1: Evaluation of eDNA dispersal distance along the Riviere Blanche from a known population of *Anablepsoides cryptocallus*. The blue squares highlight the number of positive replicates for the presence of *A. cryptocallus*, and the white squares highlight the number of negative replicates. The 'Average Ct Value' represents the number of cycles ran for the detection of the *A. cryptocallus* target DNA.

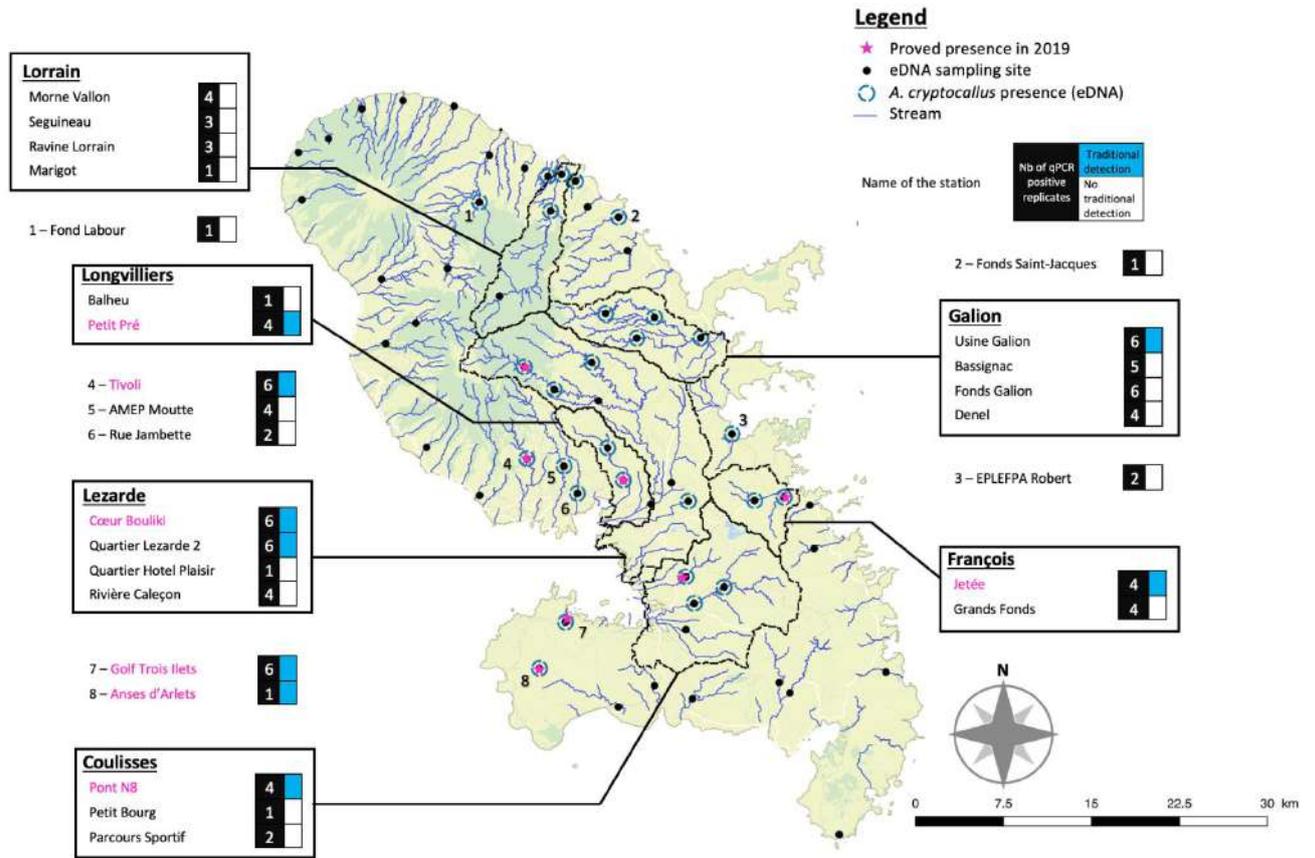
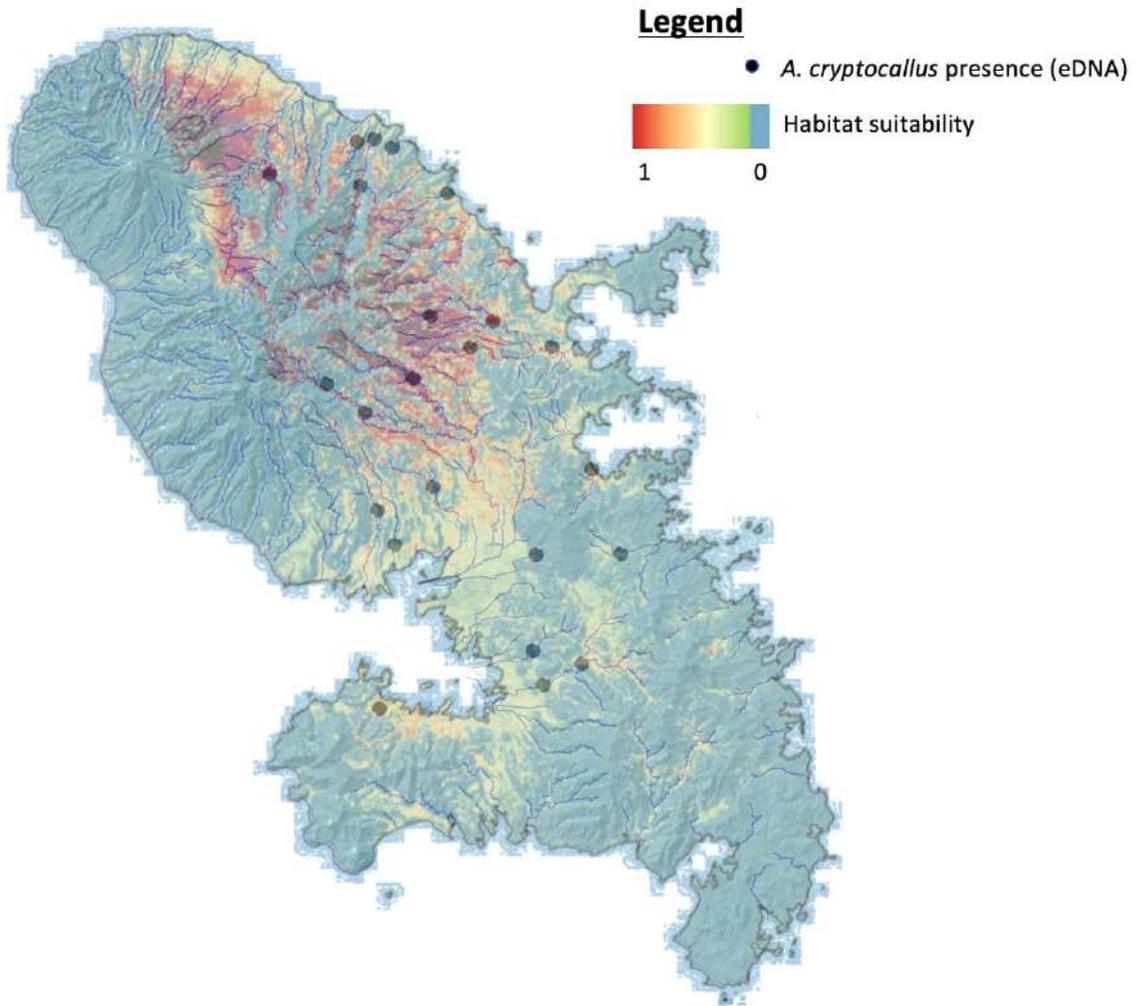


Figure 2: Map of the distribution of *Anablepsoides cryptocallus* in the rivers of Martinique, using the environmental DNA (eDNA) method. A total of 57 sites were surveyed, on 43 permanent rivers and two wetlands, following some points of presence already known before this study (pink stars) as well as the presence model created by Biotope (2020) (Appendix A), highlighting the presence of *A. cryptocallus* at 27 sites by eDNA.



Appendix A: Correlation between the presence points highlighted by eDNA in this study and the modelling of the preferential habitats of *Anablepsoides cryptocallus* (modified from Biotope 2020). The areas closest to 'warm' colour in the model represent those most favourable to the presence of *A. cryptocallus*.

Appendix B: List of environmental DNA surveyed sites used in this study. Field information such as GPS coordinates, elevation, number of streams, total volume of water filtered are referenced as well as laboratory data. The "proportion of positive qPCR replicates" represents the number of positive real-time PCR replicates out of the six replicates tested and the "average Ct" represents the average number of cycles at which the presence of *Anablepsoides cryptocallus* at the sites was amplified. The sites highlighted in red represent those where *A. cryptocallus* was already known to be present. Mean concentration of total DNA, measured with NanoDrop® 1000 spectrophotometer, were reported in the last column.

Sites	Coordinates (° ' ")	Altitude (m)	Stream	Total volume filtered	qPCR positive replicates proportion	Mean Ct Value	Traditional method detection
Pont de Bassignac	14°43'54"N ; 60°59'4"O	120	Galion	1150	0.833	37.2	-
Fonds Galion - Sainte Luce	14°44'7"N ; 61°0'57"O	160	Galion	2400	1	36.38	-
Usine du Galion	14°43'7"N ; 60°57'15"O	20	Galion	600	1	35.86	+
Ranch Macabou	14°30'8"N ; 60°50'4"O	10	Massel	550	0		-
Dormante	14°29'9"N ; 60°57'42"O	20	Oman	800	0		-
Golf Trois Ilets	14°32'18"N ; 61°2'42"O	10	Pagerie	2200	1	34.045	+
Diamant	14°28'53"N ; 61°0'36"O	20	Fond Placide	550	0		-
Ponton Savane	14°23'50"N ; 60°51'57"O	10	-	900	0		-
Fontane	14°35'1"N ; 60°52'27"O	20	Simon	450	0		-
Pont Madeleine	14°29'46"N ; 60°54'18"O	10	Petite Rivière Pilote	950	0		-
Guénot - Rivière Pilote	14°29'36"N ; 60°53'44"O	20	Grande Rivière Pilote	1000	0		-
Petit Bourg	14°32'51"N ; 60°57'36"O	10	Coulisses	1600	0.17	38.73	-
Parcours Sportif Saint-Esprit	14°33'29"N ; 60°56'24"O	70	Coulisses x Cacaos	1550	0.33	38.26	-
Trenelle 1 - Trenelle	14°31'51"N ; 60°57'56"O	0	Trenelle	1200	0		-
Ozanam Maniba	14°38'55"N ; 61°8'6"O	30	Case Pilote	2400	0		-
AMEP Moutte	14°38'12"N ; 61°2'42"O	60	Monsieur	2400	0.67	40.275	-

Sites	Coordinates (° ' ")	Altitude (m)	Stream	Total volume filtered	qPCR positive replicates proportion	Mean Ct Value	Traditional method detection
Fonds Saint-Jacques	14°47'50"N ; 61°0'27"O	70	Saint-Jacques	2700	0.17	38.23	-
Trace des Jésuites	14°44'47"N ; 61°5'9"O	314	Lorrain	4800	0		-
EPLEFPA Robert	14°39'24"N ; 60°56'2"O	0	Cacao	1500	0.33	40.125	-
Monnerot	14°36'36"N ; 60°52'59"O	20	Beauregard	2700	0		-
Grands Fonds - François	14°36'50"N ; 60°55'18"O	12	Desroses	1500	0.67	39.12	-
Trois Bras	14°50'46"N ; 61°11'51"O		Trois Bras	7500	0		-
Anse Coulevre	14°50'30"N ; 61°12'17"O		Coulevre	5400	0		-
Rue Jambette	14°37'9"N ; 61°2'10"O	10	Jambette	750	0.33	40.015	-
EM Anse Madame	14°37'9"N ; 61°6'1"O	10	Case Navire	3300	0		-
Tivoli	14°38'28"N ; 61°4'8"O	160	Monsieur	800	1	37.61	+
Petit Pré	14°37'38"N ; 61°0'21"O	10	Longvilliers	900	1	35.05	+
François Jetée	14°36'56"N ; 60°53'59"O	0	-	300	0.67	39.67	+
Anses d'Arlets	14°30'21"N ; 60°3'44"O	390	-	300	1	36.78	+

Appendix C: List of closely related and/or co-occurring (highlighted in red) species and related GenBank accession numbers utilized during the *in-silico* design and validation steps of the assay.

Species	Accession number
<i>Agonostomus monticola</i> (Bancroft, 1834)	JQ060397; JQ935847; MG496131
<i>Ancistomus snethlageae</i> (Steindachner, 1911)	KX087166
<i>Anguilla rostrata</i> (Lesueur, 1817)	EU524437; EU524441; HQ339977
<i>Aphanotorulus emarginatus</i> (Valenciennes, 1840)	KT239019

1		
2		
3	<i>Arcos nudus</i> (Linnaeus, 1758)	KJ616448; KY656421
4		
5	<i>Atya innocuous</i> (Herbst, 1792)	EU005036; EU005041; EU005050
6		
7	<i>Atya scabra</i> (Leach, 1816)	EU005144; EU005154; EU005158
8		
9		
10	<i>Awaous banana</i> (Valenciennes, 1837)	MG496095; MG936715; MG936723
11		
12	<i>Baryancistrus xanthellus</i> (Rapp Py-Daniel, Zuanon &	KX087167
13		
14	R. R. de Oliveira, 2011)	
15		
16		
17	<i>Centropomus undecimalis</i> (Bloch, 1792)	HQ575817; JQ841103; JQ842412
18		
19	<i>Ctenogobius fasciatus</i> (Gill, 1858)	MG448726; MG449073; MG449444
20		
21	<i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)	HQ141078; HQ141080; JF915577
22		
23	<i>Dormitator maculatus</i> (Bloch, 1792)	FN545586; HQ955845; JQ840473
24		
25	<i>Eleotris perniger</i> (Cope, 1871)	KU232389; KU727870; KU727875
26		
27	<i>Gobiomorus dormitor</i> (Lacepède, 1800)	AY722144; FN545590; HM379814
28		
29	<i>Guavina guavina</i> (Valenciennes, 1837)	JQ840516; KU727830; KU727832
30		
31		
32	<i>Guinotia dentata</i> (Latreille, 1825)	AY803593; KU578961
33		
34		
35	<i>Hypancistrus zebra</i> (Isbrücker & Nijssen 1991)	KX611143
36		
37	<i>Hypostomus affinis</i> (Günther, 1864)	KT239012; KT239013; MK355285
38		
39	<i>Hypostomus ancistroides</i> (Ihering, 1911)	GU701726; MK464111
40		
41	<i>Hypostomus commersoni</i> (Valenciennes, 1836)	EU359423; GU701716
42		
43	<i>Hypostomus francisci</i> (Lütken, 1874)	NC_045188
44		
45	<i>Hypostomus luetkeni</i> (Steindachner, 1877)	MG825026
46		
47	<i>Hypostomus plecostomus</i> (Linnaeus, 1758)	KM576100
48		
49		
50	<i>Macrobrachium acanthurus</i> (Wiegmann, 1836)	GU205036; HM352485; KM101538
51		
52	<i>Macrobrachium carcinus</i> (Linnaeus, 1758)	GU205050; HM352492; KM101549
53		
54	<i>Macrobrachium crenulatum</i> (Holthuis, 1950)	HM352498; JF810994; JQ805900
55		
56	<i>Macrobrachium faustinum</i> (de Saussure, 1857)	EU005003; EU005011; EU005017
57		
58		
59		
60		

1		
2		
3	<i>Macrobrachium heterochirus</i> (Wiegmann, 1836)	GU205061; HM352494; KM101553
4		
5	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (de Man, 1879)	FJ958195; GQ995511; KF499328
6		
7	<i>Micratya poeyi</i> (Guérin-Méneville, 1855)	EF489982; FJ348781; FJ348790
8		
9		
10	<i>Mugil cephalus</i> (Linnaeus, 1758)	GU225393; GU225395; GU260667
11		
12	<i>Oostethus brachyurus</i> (Bleeker, 1854)	JQ841283; JQ841284
13		
14	<i>Oreochromis mossambicus</i> (Peters, 1852)	EU417781; EU752141; HQ959692
15		
16	<i>Palaemon pandaliformis</i> (Stimpson, 1871)	KP179181; KP179185; KP179187
17		
18		
19	<i>Peckoltia furcate</i> (Gmelin, 1788)	KX087180
20		
21	<i>Poecilia reticulata</i> (Peters, 1859)	GU702153; JN028266; JN989142
22		
23	<i>Poecilia vivipara</i> (Bloch & Schneider, 1801)	GU701911; KU684418; KU684426
24		
25		
26	<i>Potimirim potimirim</i> (Müller, 1881)	EF489974; KP202822; KP202828
27		
28	<i>Pterygoplichthys anisitsi</i> (Eigenmann & Kennedy,	KT239004; KT239005
29	1903)	
30		
31		
32	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i> (Weber, 1991)	AP012021
33		
34	<i>Pterygoplichthys pardalis</i> (Castelnau, 1855)	KT239016
35		
36		
37	<i>Sicydium plumieri</i> (Bloch, 1786)	MK655759; MK655765; MK655771
38		
39	<i>Sicydium punctatum</i> (Perugia, 1896)	KF668854; MK655674; MK655920
40		
41	<i>Xiphocaris elongata</i> (Guérin-Méneville, 1855)	EU004954; EU004961; EU004966
42		
43		
44	<i>Xiphophorus helleri</i> (Heckel, 1848)	EU752037; EU752044; HM345930
45		
46		
47		
48		
49		
50		
51		
52		
53		
54		
55		
56		
57		
58		
59		
60		