

Demande de dérogation pour la capture et la perturbation
intentionnelle de spécimens d'espèces animales protégées
d'amphibiens à des fins scientifique et de conservation
dans le Bas-Rhin de 2021 à 2024

Table des matières

A. Étude de l'habitat terrestre du Crapaud vert (<i>Bufo viridis</i>) : utilisation de pigments fluorescents et pose de radio-émetteurs.....	2
I. Contexte.....	2
II. Protocole.....	3
1) Espèce concernée	3
2) Sites de captures	3
3) Captures.....	4
4) Suivi du déplacement	4
B. Etude du développement embryonnaire et larvaire du Crapaud vert en conditions contrôlées.....	7
I. Contexte.....	7
II. Protocole.....	8
1) Espèce concernée	8
2) Site de capture	8
3) Capture et transport	8
4) Expérimentation	9
III. Intervenants	11
Annexes	13

A. Étude de l'habitat terrestre du Crapaud vert (*Bufo viridis*) : utilisation de pigments fluorescents et pose de radio-émetteurs.

I. Contexte

Les amphibiens font partie des taxons les plus menacés au niveau mondial (Stuart et al. 2004). Ces animaux possèdent un cycle de vie complexe, composé d'une phase terrestre importante et d'une phase aquatique (i.e. reproduction et stade larvaire). Cette dernière est très étudiée, ce qui n'est pas le cas de la phase terrestre, peu connue. En effet, il est difficile de suivre les individus en déplacement, alors qu'en phase aquatique il est très facile d'observer les mâles chanteurs et d'observer des pontes ou des têtards dans l'eau. Néanmoins, la phase terrestre joue un rôle important dans la vie d'un amphibien et constitue la plus grande partie de son cycle de vie (e.g. zone de chasse, zone d'estivage, zone d'hivernage).

Aujourd'hui, les avancées techniques permettent de suivre les déplacements détaillés d'individus sur le court terme (e.g. pigments fluorescents), mais également sur un plus long terme (e.g. radio-télémetrie). Ces techniques sont déjà utilisées chez les amphibiens pour étudier leur déplacement en phase terrestre (Miaud et al. 2000; Eggert 2002; Priol 2015).

L'habitat terrestre du Crapaud vert (*Bufo viridis*) n'a quasiment jamais été étudié, induisant une méconnaissance lourde de conséquences. En effet, en étant incapable de caractériser puis de délimiter des habitats terrestres, il est impossible de quantifier un impact de projets d'aménagements, et donc d'appliquer avec pertinence la séquence ERC.

La présente étude vise donc à comprendre et à connaître les déplacements de cette espèce, qui pourraient se faire sur de longues distances. Le but est d'apporter de nouvelles connaissances, afin de comprendre et de pouvoir protéger la totalité de l'habitat de cette espèce en danger d'extinction (IUCN 2018). Cette étude rentre dans les volets de conservation et connaissance des différents PNA et PRA amphibiens.

Afin de répondre à ces attentes très actuelles tant des services d'instructions, de la communauté scientifique mais aussi des aménageurs, les questions scientifiques soulevées par l'étude sont les suivantes :

Quels sont les microhabitats utilisés par l'espèce en phase terrestre ?

Quels sont les comportements de déplacement ?

Quelle est la typologie des éléments du paysage utilisé ?

Et ce, tant en phase de reproduction qu'en post-reproduction et qu'en phase hivernale.

Pour répondre à ces questions, deux protocoles seront utilisés :

- Un suivi des microdéplacements par **pigment fluorescent sur 10 sites** représentatifs des sites utilisés par le Crapaud Vert dans le Bas-Rhin ;
- Un suivi des déplacements par **radiotracking sur 3 sites** présents dans un paysage de type monoculture intensive.

II. Protocole

1) Espèce concernée

- Crapaud vert (*Bufo viridis*)

L'étude s'intéresse uniquement au **Crapaud vert**, en tant qu'espèce PNA et concernée régulièrement par différents aménagements du territoire, qui ne peut donc être **remplacé** par une autre espèce.

2) Sites de captures

Lors des prospections de terrain réalisées en 2019 et 2020, 10 sites ont retenu notre attention (Fig. 1). Durant une période comprise entre mi-mars et mi-juin, plusieurs centaines de couples ont été observés sur ces sites. Les prélèvements et l'étude se feront donc sur ces 10 sites, 5 bassin d'orage et 5 mares localisées du Bas-Rhin (Tab. 1).

Sur ces 10 sites, seuls 3 seront concernés par la méthode de radiotracking (cf. Tableau 1). Ces 3 sites ont été sélectionnés en raison des effectifs présents sur le site et en raison du paysage adjacent, de type « monoculture intensive ». À noter que si d'autres typologies de paysage existent pour l'espèce (« forêt » et « péri-urbain »), de tels sites ne seront pas suivis par l'approche télémétrie de cette dérogation mais par une étude parallèle menée conjointement par le CEREMA et l'association BUFO. Ces deux études complémentaires permettront alors de comparer des typologies de paysage entre eux.

concernés par la méthode de radiotracking

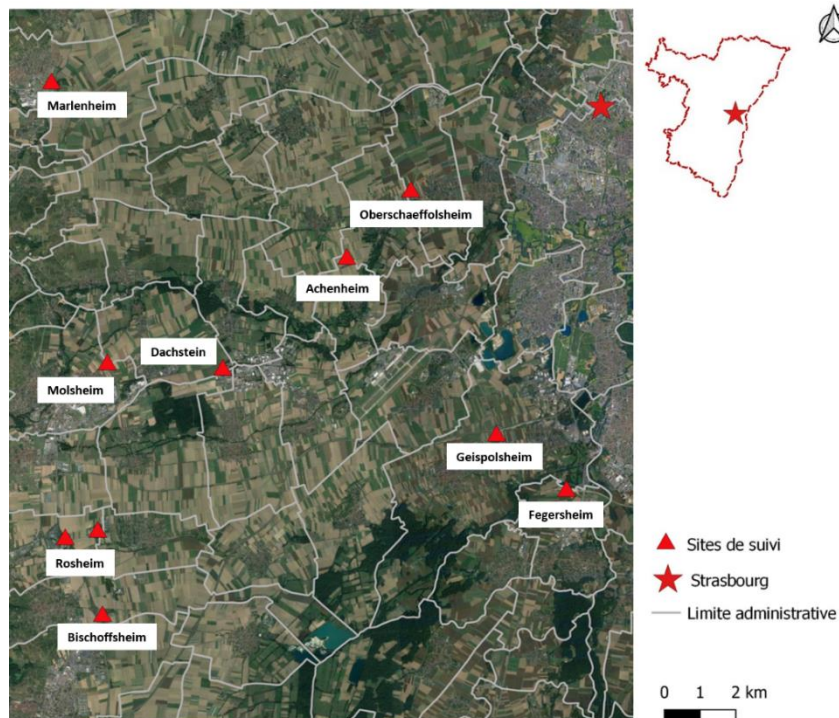


Figure 1: Site de capture et de suivi

En cas de trop faibles effectifs rencontrés dans un des trois sites concernés par la méthode de radiotracking, les sites de substitution sont, dans l'ordre, les suivants :

- (1) Bassin d'orage 104 ;
- (2) Rocade Sud ;
- (3) Carrière d'Achenheim.

À noter que la demande de dérogation n'est pas demandée sur ces seuls sites car les individus peuvent disperser sur de longues distances, le Département du Bas-Rhin étant alors une échelle pertinente pour la demande.

Tableau 1: Informations sur l'ensemble des sites de captures de Crapaud vert, tous ces sites sont utilisés pour l'étude de pigment fluorescent (Cf 3.a), les sites en gras représentent ceux utilisés pour l'étude de télémétrie (Cf 3.b).

Nom du site	Commune	Coordonnées GPS
Bassin d'orage 212	Marlenheim	48°20'40.5''N 7°30'51.4''E
Bassin d'orage 195	Oberschaeffolsheim	48°35'09.3''N 7°38'16.2''E
Bassin d'orage 115	Molsheim	48°32'49.8''N 7°31'09.0''E
Bassin d'orage 104	Rosheim	48°30'12.8''N 7°29'57.4''E
Bassin d'orage rocade sud	Geispolsheim	48°31'29.1''N 7°39'58.7''E
Carrière d'Achenheim	Achenheim	48°20'40.5''N 7°30'51.4''E
Piscine Dachstein	Dachstein	48°32'38.0''N 7°33'46.8''E
Carrière Remex	Rosheim	48°30'17.1''N 7°30'36.0''E
Zone humide routier de l'est	Bischoffsheim	48°29'00.8''N 7°30'43.2''E
Zone humide rocade sud	Fegersheim	48°30'30.1''N 7°41'27.8''E

3) Captures

Quelle que soit la méthode utilisée (pigments ou radiotracking), des captures seront nécessaires. Ces dernières seront effectuées de mi-mars à fin juin 2021 pour les adultes, et de mi-juin à mi-août pour les juvéniles. Les captures se feront à la main et uniquement lorsque les individus se trouveront en déplacement en phase terrestre autour des sites de reproduction. Ces individus sont détectables à l'aide de lampe frontale. Avant tout inventaire et à chaque changement de site, un protocole d'hygiène sera respecté consistant en la désinfection au Virkon® de l'ensemble du matériel (waderns, bottes, épuisettes, gants) afin d'éviter les éventuels transferts d'agents pathogènes (Miaud 2014).

4) Suivi du déplacement

Pour rappel, les déplacements seront suivis via deux techniques afin de répondre aux questions posées.

a. Pigment fluorescent

Questions concernées ;

- Quels sont les microhabitats utilisés par l'espèce en phase terrestre ?
- Quels sont les comportements de déplacement ?

Les pigments fluorescents sont généralement utilisés pour suivre les déplacements de petits animaux sur de courtes distances (Lemen & Freeman 1985; Eggert 2002; Pittman & Semlitsch 2013). Cette méthode consiste à enduire les pattes et le corps de l'animal d'une peinture inoffensive et biodégradable (Fluotechnik[®]), qui va ensuite être rependue sur le sol là où l'animal se sera déplacé (Lemen & Freeman 1985). Son trajet peut alors être retracé à l'aide d'une lampe UV. Pour mettre en place ce suivi les individus seront capturés au moment où ils quittent le site de reproduction. Ce moment, proche de l'aube, aura précisément été estimé par des prospections préalables à l'aide d'enregistreurs audio indiquant l'arrêt des chants. Les individus marqués seront relâchés au point de capture qui sera marqué par un jalon. Une fois tous les individus marqués et relâchés, 30 minutes leur seront laissées pour utiliser l'habitat terrestre, après quoi le chemin laissé par chaque individu sera retracé à l'aide d'une lampe UV.

Afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes, un effectif maximum de 200 individus sera utilisé pour l'expérience (10 adultes et 10 juvéniles par site sur une dizaine de sites ; Fig. 1, Tab. 1).

Plusieurs métriques seront mesurées : Distance linéaire point de départ – point d'arrivée (DL), Distance totale du chemin (DT), Sinuosité ($S=DL/DT$), Nature du point d'arrivée (AR), Habitats naturels utilisés lors du déplacement. Ces métriques permettront d'étudier l'utilisation des micro-habitats et les comportements de déplacements par les individus lors des allers-et-venues sur le site de reproduction, ainsi que durant l'émergence des juvéniles.

b. Radiotélémétrie

Objectifs :

- Quelle est la typologie des éléments du paysage utilisé ? Et ce, en phase reproduction, post-reproduction et hivernale. À noter que pour pallier aux limitations matérielles, le protocole diffère entre la phase de reproduction et les deux autres phases.

La radiotélémétrie sera couplée à l'utilisation des pigments fluorescents pour étudier des déplacements sur de plus longues distances. Cette méthode permet de suivre des individus en utilisant un émetteur radio et une antenne réceptrice ; il est alors possible de retrouver l'animal rapidement et ainsi pointer sa localisation GPS.

La partie radiotélémétrie se compose de 2 études :

- Habitat terrestre pendant la période de reproduction

Nous allons équiper 30 individus adultes (15 mâles et 15 femelles) après la ponte sur 3 sites différents (i.e. 10 individus par site Tab. 1). Chaque animal sera sexé, mesuré, pesé et identifié à l'aide d'une puce RFID et équipé d'un émetteur radio pesant 1,9 g (BD-2H), Holohil Systems[®], Ontario, Canada) et d'une durée de vie pouvant atteindre les 5 mois, implanté en interne dans la cavité péritonéale sous la supervision de Claude Miaud (CEFE CNRS) expert en amphibiens ayant déjà pratiqué la chirurgie sur différentes espèces d'amphibiens. L'implantation se fera suivant le protocole expliqué en annexe. Plusieurs études montrent que l'implantation d'émetteur radio permet de suivre des individus sur de longues périodes tout en ayant très peu de perte d'individus et de mortalité (Miaud et al. 2000; Eggert 2002; Priol 2015). Une étude en cours montre également que l'implantation de radio émetteur est moins

dommageable pour les amphibiens que l'utilisation de harnais (Damien Picard communication personnelle) ; en effet l'utilisation de harnais peut provoquer des abrasions sur la peau des amphibiens (Boncourt 2019) ou les coincer dans la végétation, entraînant leur mort par dessiccation (Damien Picard communication personnelle). Concernant le Crapaud vert, Sinsch & Leskovar (2011) ont utilisé l'implantation de radio émetteur sur 20 individus adultes et n'ont observé aucune mortalité pendant ou après l'étude. C'est pour ces raisons que nous avons décidé de favoriser l'implantation d'émetteur plutôt que l'utilisation de harnais. Les émetteurs ne pouvant dépasser 10% du poids de l'animal, seuls les individus pesant 19 g ou plus seront équipés (soit 72% des mâles et 94% des femelles rencontrés en 2020).

Chaque individu verra sa position relevée une fois par jour et par nuit pendant une durée maximale de 4 mois. Les points GPS récoltés pour chaque individu seront utilisés pour modéliser son domaine vital (via une approche de dynamic Brownian Bridge Movement Model, dBBMM) sur la période concernée, l'étude de ce domaine et des points individuels permettront de déterminer quels habitats sont utilisés durant la saison de reproduction.

- Habitat terrestre hors période de reproduction

Nous allons équiper 20 autres individus (10 mâles et 10 femelles) avec des émetteurs radio identiques à ceux utilisés en phase de reproduction (BD-2H, Holohil Systems[®], Ontario, Canada / 1.9 g / durée de vie pouvant atteindre 5 mois) implantés en interne dans la cavité péritonéale (même protocole, expliqué en annexe). L'implantation de ces émetteurs est nécessaire pour éviter la perte de celui-ci sur le long terme, ce qui sera nécessaire pour l'étude des habitats terrestres hors période de reproduction où les captures seront sûrement plus aléatoires. Plusieurs études montrent que l'implantation d'émetteur radio permet de suivre des individus sur de longues périodes tout en ayant très peu de perte d'individus et de mortalité (Miaud et al. 2000; Eggert 2002; Priol 2015).

La méthode de suivi sera la même que celle présentée précédemment. La fréquence de pointage GPS sera de 1 point par jour et par nuit, mais pourra fluctuer en fonction de l'activité des animaux sur la période de septembre à janvier. Les points GPS récoltés pour chaque individu seront une nouvelle fois utilisés pour modéliser son domaine vital sur la période concernée, cette fois ci pour déterminer quels habitats naturels (mais aussi microhabitats à l'aide des points indiquant l'emplacement où les individus effectuent leur hibernation) sont utilisés en dehors de la saison de reproduction.

c. Impact du protocole et des manipulations

Pour limiter le stress lié à la manipulation, la durée de manipulation sera réduite au minimum. Des gants en latex ou en nitrile non poudrés à usage unique seront utilisés pour éviter la transmission d'agents pathogènes tout en maintenant l'intégrité du mucus épidermique protecteur. De par les précautions prises (gants, désinfection) et les méthodes employées dans des conditions stériles, l'impact sur la population sera le plus limité possible.

B. Etude du développement embryonnaire et larvaire du Crapaud vert en conditions contrôlées

I. Contexte

La fragmentation des habitats induite par l'anthropisation des terres, en particulier avec la construction d'infrastructures linéaires de transports dont les routes, est l'une des causes majeures reconnues de l'érosion de la biodiversité. Les routes sont habituellement couplées à la construction de bassins d'orage captant les eaux de ruissellement afin de les contenir, les stocker et les dépolluer avant leur éventuelle évacuation dans l'environnement. Bien qu'il soit reconnu que l'eau des bassins d'orage est polluée, il a été montré à plusieurs reprises que ces bassins peuvent être colonisés par la flore et la faune, et notamment par les amphibiens (Scher & Thiéry 2005; Watts et al. 2010). Ce taxon est l'un des plus menacés au niveau mondial et la totalité des espèces présentes sur le territoire français est protégée (Stuart et al. 2004; UICN 2015).

Aujourd'hui, les gestionnaires de voirie mettent en œuvre des mesures visant à empêcher les amphibiens de rentrer dans les bassins. Le but de ce projet de recherche est de déterminer les fonctionnalités écologiques des bassins d'orage routiers pour les amphibiens. Si de nombreux individus ont été trouvés dans ces bassins, même dans des bassins anciens, la participation de ces structures dans la viabilité et la dynamique des populations d'amphibiens n'est pas connue. D'une part, la pollution en particulier par les métaux lourds est supposée avoir un effet délétère à court terme sur le phénotype et la survie individuels, à long terme sur les capacités reproductrices et *in fine* sur la dynamique de la population en présence. Cependant, si un recrutement élevé contrebalance la mortalité, ces bassins pourraient alors servir d'habitats adossés à un réseau de mares existant. La question se pose alors, les bassins d'orage sont-ils des sources ou des pièges écologiques ?

Afin de répondre à cette question, nous avons en 2020 réalisé une étude *in situ* sur les têtards de Crapaud vert (*Bufo viridis*) dans les bassins d'orage routiers (BO) et des mares semi-naturelles plus favorables pour l'espèce, que l'on dénommera ici 'sites contrôlés' (SC). Nos résultats montrent que la survie des têtards est bien plus faible dans les BO. En revanche il reste à élucider quelles sont les variables responsables de cette faible survie au stade têtard afin de permettre une amélioration des BO. Pour cela, nous devons nous intéresser aux variables différenciant les BO des SC que nous avons suivis. Deux de ces variables ont été identifiées comme ayant une action significative :

- La pollution du sédiment (e.g. métaux lourds), 8 fois plus importante dans les BO que dans les SC (alors que la pollution de l'eau n'était pas différente) ;
- La présence très élevée d'au moins une espèce de sangsues identifiée (*Helobdella stagnalis*) dans les BO, parasitant les têtards du Crapaud vert.

Le but de la présente étude est d'estimer la survie des têtards du Crapaud vert, soumis en conditions contrôlées à ces deux types de perturbations : présence ou non de polluant dans le sédiment et/ou présence ou non de cette espèce de sangsues. En effet d'autres paramètres non mesurés ont peut-être une action encore plus importante et cette approche en conditions contrôlées doit permettre de démontrer l'effet individuel de ces deux variables et leur importance respective.

II. Protocole

1) Espèce concernée

- Crapaud vert (*Bufo viridis*)

Afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes tout en permettant une réduction maximum du nombre d'individus prélevés, les effectifs suivants sont utilisés :

- 480 têtards de Crapaud vert (*Bufo viridis*), correspondant à environs 1000 œufs prélevés sur 5 fragments de 50 cm de pontes différentes. Notons que chez cette espèce, une ponte peut produire entre 2000 et 15000 œufs (Miaud & Muratet 2018).

Dans la continuité des expériences 2020, le remplacement par une espèce proche n'est pas pertinent et induirait une perte majeure d'information. En effet et de façon évidente, toutes les espèces d'amphibiens n'ont pas la même sensibilité aux polluants et à différents cocktails de polluants.

2) Site de capture

Les prélèvements de ces cinq fragments de pontes différentes se feront au niveau d'un plan d'eau situé sur la commune de Bischoffsheim dans le parc d'activité les Acacias (48°29'01.7"N 7°30'43.3"E). Ce site est connu pour abriter plusieurs centaines de couples adultes de crapauds verts chaque année et dont le taux de survie *in situ* des têtards était de 71% en 2020.

En cas d'échec 2021 de la reproduction au niveau de ce site, le site alternatif visé serait la mare de compensation de la sablière de Bischoffsheim (48°29'40.5"N 7°30'51.4"E). Ce site alternatif est aussi connu pour avoir abrité une cinquantaine de couple en 2020.

3) Capture et transport

Les prélèvements seront effectués le même jour (mars/avril 2021) suivant le cycle biologique de l'espèce, cela afin de s'assurer de prélever des pontes provenant de femelles différentes. Les 5 fragments de 50 cm de long seront mis chacun dans un bocal et une fois les cinq pontes échantillonnées, ramenés au Laboratoire (cf 4.a). Ces 5 fragments seront maintenus séparément au laboratoire dans de l'eau propre du robinet préalablement filtrée et oxygénée toujours à température ambiante (20°C) jusqu'à éclosion. Ensuite 480 têtards seront utilisés pour l'expérimentation. Les autres individus seront immédiatement relâchés sur le site de capture. À la fin de l'expérimentation, les crapelets survivants fraîchement métamorphosés seront également relâchés sur le site de capture.

Avant tout inventaire et à la fin du prélèvement, un protocole d'hygiène sera respecté consistant en la désinfection au Virkon® de l'ensemble du matériel (waders, bottes, épuisettes, gants) afin d'éviter les éventuels transferts d'agents pathogènes (Miaud 2014).

4) Expérimentation

a. *Le transport des échantillons de ponte et des têtards*

Les 5 fragments de pontes, prélevés de jour, seront transportés séparément jusqu'au laboratoire (IPHC) dans des bocaux de prélèvement. Chaque bocal ne contiendra qu'un seul fragment de ponte. Les bocaux, de contenance d'un litre contiendront 500 ml d'eau prélevée sur place et seront fermés hermétiquement et à l'abri de la lumière. La durée du transport sera au maximum de 45 minutes.

Les conditions de transport et de relâchés des différents têtards seront les mêmes qu'à la collecte en revanche le transport des crapelets se fera dans des boîtes sans eau mais contenant de la sphaigne humide.

b. *Maintien dans les locaux du Département d'Écologie Physiologie et Éthologie (DEPE) de l'IPHC*

Les éclosions et les expérimentations seront effectuées dans les locaux de l'animalerie du DEPE de l'IPHC, 23 rue du Lœss à Strasbourg. Les individus seront installés dans une salle close de 8 m², à accès réglementée.

Une fois les pontes arrivées à destination, ~10 œufs de chaque ponte seront sacrifiés pour analyse de polluants. Les 5 fragments de pontes restant seront répartis dans un aquariums (30 L) contenant de l'eau préalablement filtrée, oxygénée et à température ambiante (20°C). Dès l'éclosion, 480 têtards seront sélectionnés aléatoirement et répartie dans 4 conditions (120 têtards par condition). Dans chacune de ces conditions, les 120 têtards sont répartis dans 3 réplicats par nombre de 40 (4*3*40=480 ; Annexe).

- Condition 1 : Condition contrôle, chaque aquarium contient de l'eau propre du robinet, et du sédiment propre acheté en animalerie ;
- Condition 2 : Chaque aquarium contient de l'eau propre, et du sédiment provenant d'un mélange de sédiment issu de 3 bassins d'orage représentatifs des concentrations de pollution recensées en 2020 (sédiment BO) ;
- Condition 3 : Chaque aquarium contient de l'eau propre, du sédiment propre acheté en animalerie, et 30 sangsues (*Helobdella stagnalis*) capturées dans un bassin d'orage ;
- Condition 4 : Chaque aquarium contient de l'eau propre, du sédiment BO, et 30 sangsues (*Helobdella stagnalis*) capturées dans un bassin d'orage.

Remarque : dans les exclos de dimensions 55x39x29 cm utilisés pour les expérimentations de 2020 et où 30 têtards étaient présents, c'est parfois plusieurs dizaines de sangsues qui étaient trouvées. Le choix de 30 sangsues pour 40 têtards permet de retrouver des conditions similaires.

Afin de maintenir ces amphibiens en captivité temporaire, nous disposons d'un certificat de capacité N° 67-134 et d'une autorisation d'ouverture d'établissement N° DDPP67-SPAE-FSC-2019-04.

c. Approche expérimentale

L'approche expérimentale va consister à élever ces têtards sous différentes conditions (ci-dessus), afin d'estimer des différences de taux de survie et de croissance. De plus, une analyse de polluants sera effectuée sur les individus fraîchement récoltés quand retrouvés morts au cours de l'expérimentation.

Cette expérimentation implique, après la sélection des 480 têtards à l'éclosion, un maintien temporaire d'une durée maximale de 4 mois. C'est la durée maximale attendue de développement jusqu'au stade 'crapelet', après métamorphose et premières tentatives de sortie de l'eau (observation sur le terrain 2020). Comme pour les têtards éclos mais non expérimentés (cf. ci-dessus), ces crapelets seront tous relâchés dans leur mare d'origine, selon les mêmes modalités de transport, dans des boîtes sans eau mais contenant de la sphaigne humide.

Les seules souffrances à prendre en compte sont (1) physiologiques, les mêmes que dans les conditions 'naturelles' des bassins d'orage (sédiments pollués et présence de micro-prédateurs), ou (2) ; un stress de capture et de déplacement lors des transitions éclosion/jeune larve et au stade de crapelet, pour la capture et le retour à leur mare d'origine, ou (3) ; lors des manipulations de mesure. La durée de manipulation des larves, sera la plus courte possible sans être trop hâtive, car une manipulation délicate est nécessaire pour éviter de blesser les individus et de limiter leur stress. L'utilisation de gants en latex ou en nitrile non poudrés (qui pourrait irriter la peau des amphibiens) est nécessaire pour éviter d'enlever le mucus protecteur de leur peau ainsi que la transmission d'agents pathogènes. De par les précautions prises (gants, désinfection) et les méthodes employées, l'impact sur la population sera négligeable.

Néanmoins, notons que la majorité des têtards de la condition 4 (cf. §b, similaire aux bassins d'orage) puisse ne pas survivre (N= 120), avec sans doute aussi un excès de mortalité dans les conditions 2 et 3. D'un point de vue éthique et de conservation, retenons que :

- Sur les 1000 œufs prélevés, le taux d'éclosion sera beaucoup plus élevé que dans le lieu de prélèvement et toutes les larves écloses, sauf les 480 individus expérimentaux seront relâchées ;
- Il en sera de même pour les 120 têtards de la condition 1, dont les chances de métamorphose seront supérieures à celles de leur mare d'origine (sans prédateur ni risque de déshydratation) ;
- Durant nos protections de terrain en 2020, nous avons remis à l'eau plusieurs milliers de têtards sur différents sites afin d'éviter leur mort par dessiccation. Une perte maximale de 480 têtards (chiffre surestimé donc) peut être considérée comme négligeable au regard des effectifs rencontrés sur le terrain l'année dernière.

III. Intervenants

Les manipulations réalisées durant cette étude seront effectuées et encadrées par des personnes possédant de très bonnes connaissances sur la batrachofaune d'Alsace, il s'agit de :

Conan Antonin :

- Formation initiale : Master Biodiversité et Gestion de l'Environnement dans lequel des sorties herpétologiques étaient réalisées. Doctorat en cours : « Rôles écologiques des bassins d'orage routiers pour les amphibiens ».
- Formation continue : Stage de 6 mois sur les maladies des amphibiens avec une grande partie de terrain et de manipulation sur les amphibiens. Formé par Claude Miaud (CEFE CNRS de Montpellier) à l'identification, la capture, la manipulation et le marquage par implantation de puce sous-cutanée (RFID) chez les amphibiens. Formation à la conception de projet utilisant l'expérimentation animale (2019). Formation à l'expérimentation animale (manipulations d'individus, règles d'éthique, estimation du stress et de la souffrance animale...), formation à la chirurgie (techniques de chirurgie sur petit animal...)

Le Brishoual Meven :

- Formation initiale : Master en Écologie et Éco-ingénierie des Zones Humides incluant des enseignements sur les Amphibiens et des sorties herpétologiques.
- Formation continue : Stage de 2 mois sur un inventaire herpétologique principalement constitué d'observation et de manipulation d'Amphibiens et de Reptiles. Formé à l'identification, la capture et la manipulation des Amphibiens et des Reptiles par Martin Bonhomme (Bureau d'étude en herpétologie MCLterra).
Stage de 6 mois puis CDD de 6 mois sur l'efficacité des barrières à faune pour les Amphibiens et le suivi d'une population de Crapauds verts par capture-marquage-recapture. Formé aux mesures biométriques et à l'implantation de puces sous-cutanées (RFID) chez les Amphibiens par Antonin Conan (IPHC- CNRS, Université de Strasbourg).

Jumeau Jonathan :

- Formation initiale: Master en Écophysiologie et Éthologie dans lequel des sorties herpétologiques étaient réalisées. Doctorat en biologie de conservation dont un sujet a notamment porté sur l'utilisation des bassins d'orage par les amphibiens. Le sujet contenait une part de manipulations d'amphibiens. Diplôme d'expérimentation animale (manipulations d'individus, règles d'éthique, estimation du stress et de la souffrance animale...).

Handrich Yves :

- Formation initiale : Doctorat en Biologie, Chargé de recherche au CNRS de Strasbourg et habilitation à diriger des recherches. A réalisé de nombreuses études sur la faune sauvage (Amphibien ; Hamster ; Manchots).

Dans un souci de transmission du savoir et de renforcement des moyens humains, des stagiaires et des salariés (CNRS ou CD67) seront amenés à participer aux travaux. Cependant, des règles strictes sont fixées :

- Les stagiaires bénéficieront d'une formation initiale sur le terrain, conduite par les personnes susmentionnées ;

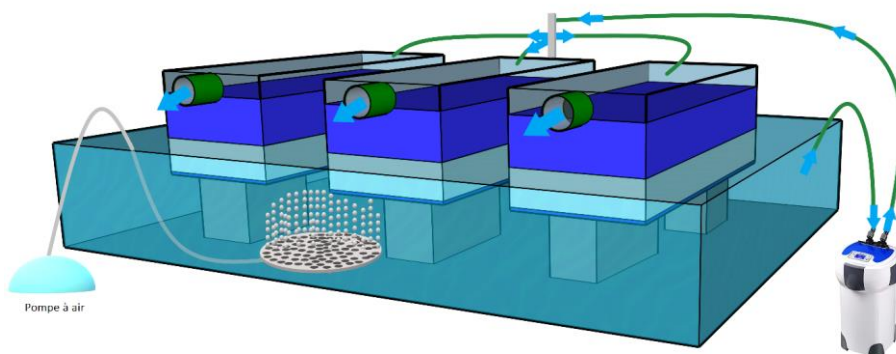
- Les stagiaires devront avoir manipulé avec succès des espèces communes (grenouilles vertes par exemple) avant de manipuler des espèces à fort enjeu de conservation ;
- Les stagiaires seront systématiquement accompagnés sur le terrain et réaliseront les manipulations en présence systématique d'une des deux personnes susnommées.

Annexes

Annexe 1 : protocole d'implantation de radio-émetteur

L'implantation sera réalisée en laboratoire sous anesthésie générale. Les crapauds seront immergés dans un mélange [100 ml d'eau + 0,2 ml de phenoxyéthanol] jusqu'à décontraction musculaire totale (environ 10 à 20 minutes). Une fois l'individu anesthésié, une désinfection à la Vétédine puis à l'éthanol 70% sera effectuée au niveau de la future incision. Afin de réduire la douleur, 0,4 ml d'un anesthésiant local (Lurocaïne® 20 mg/mL solution injectable sous-cutanée) et 0,2 ml d'un analgésique (Meloxicam 0.1 à 0.2 mg/kg solution injectable en intra musculaire) seront injectés à l'endroit où les incisions cutanées et musculaires seront réalisées au niveau du flanc abdominal gauche. L'émetteur sera inséré dans la cavité péritonéale. Afin de refermer la plaie, des points de suture musculaire et cutanée seront réalisés avec du fil de suture résorbable Polysorb 5-0. Une dernière désinfection et une dernière application d'anesthésiant local seront réalisées sur la suture. L'animal sera ensuite rincé à l'eau fraîche puis placé en salle de réveil, dans un bac comprenant quelques millimètres d'eau à température ambiante. Une fois réveillé, il sera placé dans un vivarium comportant une partie aquatique et terrestre (mousse humide) enrichi par des cachettes faites de pots en terre et disposant de la nourriture *ad libitum* (e.g. grillon/teigne de ruche), durant une journée et une nuit avant d'être relâché sur le site de capture.

Les individus seront suivis dès leur relâché pendant 5 mois maximum afin de limiter les risques de perte de l'émetteur. À la capture de fin d'expérimentation, les individus seront recapture afin de leur enlever l'émetteur suivant une procédure identique à celle de l'implantation puis relâchés sur le lieu exact de capture. Il est possible que certains individus restent introuvables ou inaccessibles, entraînant une impossibilité de recapture. Dans ce cas ils garderont leur émetteur à vie, mais il est possible qu'ils le rejettent naturellement (Tracy et al. 2011).



Annexe 2: Schéma du dispositif des trois aquarium d'une condition expérimentale, pour l'étude de la survie des têtards de Crapaud vert en conditions contrôlées

Bibliographie

- Boncourt E. 2019. Quantifier la perméabilité des domaines skiabiles pour la Grenouille rousse (*Rana temporaria*): une approche combinant suivi GPS et génétique du paysage. Université Grenoble Alpes.
- Eggert C. 2002. Use of fluorescent pigments and implantable transmitters to track a fossorial toad (*Pelobates fuscus*). *Herpetological journal* **12**:69–74.
- Lemen CA, Freeman PW. 1985. Tracking Mammals with Fluorescent Pigments: A New Technique. *Journal of Mammalogy* **66**:134–136. American Society of Mammalogists.
- Miaud C. 2014. Protocole d'hygiène pour le contrôle des maladies des amphibiens dans la nature à destination des opérateurs de terrain.
- Miaud C, Sanuy D, Avrillier J-N. 2000. Terrestrial movements of the natterjack toad *Bufo calamita* (Amphibia, Anura) in a semi-arid, agricultural landscape. *Amphibia-Reptilia* **21**:357–369. Brill.
- Pittman SE, Semlitsch RD. 2013. Habitat type and distance to edge affect movement behavior of juvenile pond-breeding salamanders. *Journal of Zoology* **291**:154–162. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).
- Priol P. 2015. Suivi d'une espèce rare en vue de sa conservation: dynamique spatiale et temporelle de populations de Pélobate cultripède (*Pelobates cultripès*) en Aquitaine.
- Scher O, Thiéry A. 2005. Odonata, Amphibia and environmental characteristics in motorway stormwater retention ponds (Southern France). *Hydrobiologia* **551**:237–251.
- Sinsch U, Leskovar C. 2011. Does thermoregulatory behaviour of green toads (*Bufo viridis*) constrain geographical range in the west? A comparison with the performance of syntopic natterjacks (*Bufo calamita*). *Journal of Thermal Biology* **36**:346–354. Pergamon.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science (New York, N.Y.)* **306**:1783–6. American Association for the Advancement of Science.
- UICN. 2015. La Liste rouge des espèces menacées en France. Available from https://inpn.mnhn.fr/docs/LR_FCE/UICN-LR-Reptile-Fascicule-m5-1.pdf (accessed December 6, 2018).
- Watts AW, Roseen RM, Ballestero TP, Houle JJ, Gilbert HL. 2010. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Stormwater Runoff From Sealcoated **44**:8849–8854.