cahier scientifique n°1

Parc naturel régional Périgord-Limousin

1er JUIN 2012 - SEMINAIRE

De la lutte contre la Grenouille Taureau à la mise au point d'une méthode d'étude de la biodiversité

Restitution d'un travail de recherche conduit dans le cadre d'une thèse de doctorat et d'un programme de coopération financés par la Région Limousin et le FEDER Limousin

Ce projet est cofinancé par L'Union européenne. L'Europe s'engage en Aquitaine et en Limousin avec le Fonds Européen de Développement Régional.

Pour une bonne compréhension,
la lecture de chaque retranscription
d'intervention pourra s'accompagner
de la consultation des illustrations intégrées
dans les diaporamas des intervenants,
téléchargeables sur le site du parc :
www.parc-naturel-perigord-limousin.fr

1er JUIN 2012 - SEMINAIRE

De la lutte contre la Grenouille Taureau à la mise au point d'une méthode d'étude de la biodiversité

Restitution d'un travail de recherche conduit dans le cadre d'une thèse de doctorat et d'un programme de coopération financés par la Région Limousin et le FEDER Limousin

SOMMAIRE

ACCUEIL ..... p. 4
M. Jean-Marie Rougier,
vice-président du Conseil Régional

INTRODUCTION ..... p. 5
M. Michel Evrard,
vice-président du Parc en charge de la commission biodiversité,
Président du Conseil scientifique du Parc

→ **Écologie de la grenouille-Taureau ..... p. 6**
Matthieu Berroneau (association Cistude Nature)

→ **Biologie de la dispersion de la Grenouille taureau en Europe ..... p. 11**
Francesco Ficetola (Chercheur à l'Université de Milan)

→ **La menace sur la biodiversité représentée par la grenouille-taureau : impact des chytrides ..... p. 15**
Claude Miaud (Directeur d'Etudes à l'Ecole Pratiques des Hautes Etudes, Montpellier)

→ **Bilan de 6 ans de lutte sur le territoire du Parc Naturel Régional Périgord-Limousin ..... p. 24**
Fabienne Renard-Laval (Parc Naturel Régional Périgord-Limousin)

→ **La lutte contre la grenouille-taureau en Sologne ..... p. 30**
Gabriel Michelin (Comité Départemental de Protection de la Nature du Loir et Cher)

→ **Application de la méthode de l'ADN environnemental à l'inventaire de la grenouille-taureau et adaptation de l'outil ADNe à la connaissance de la biodiversité ..... p. 32**
Tony Dejean (Docteur de l'Université de Grenoble, président de la société Spygen)

ACCUEIL

M. Jean-Marie Rougier, vice-président du Conseil Régional du Limousin

« Au nom du Président de Région Jean-Paul Denanot, je tiens à vous souhaiter la bienvenue à ce séminaire.

Je tiens à saluer les partenaires institutionnels de cette opération : l'Europe, les Régions – je ne sais pas s'il y a ici des collègues aquitains… Non, je ne crois pas ; pourtant, c'est eux qui ont lancé l'invasion (rires)… Donc l'Europe, les Régions, l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, qui a permis au Parc d'engager la lutte contre la Grenouille taureau ; je salue aussi les DREAL ; évidemment, je suis heureux d'accueillir les membres du PNR Périgord-Limousin, qui ont coordonné l'action, mais je pense qu'il y a quelqu'un aussi du PNR Brenne, et Landes de Gascogne aussi (non ? Limoges est loin de la Gascogne…). Je salue également les associations, et en particulier l'association « Cistude Nature », qui beaucoup étudié la Grenouille taureau ; je salue les gardes chasse particuliers de Dordogne, qui participent chez nous au tir estival contre la Grenouille-taureau.

Je suis heureux de représenter le Président, d'abord en tant que conseiller régional bien sûr, mais surtout en tant qu'ancien président du PNR Périgord-Limousin, puisque j'ai suivi le travail de Tony Dejean, puis des gens qui lui ont ensuite succédé lorsqu'il est parti pour sa thèse à l'Université de Savoie.

Je ne veux pas rentrer dans le programme du séminaire, mon collègue Michel EVRARD le fera mieux que moi, mais je crois qu'il y a deux phases intéressantes dans ce séminaire : d'abord, la lutte pour l'éradication de cette espèce invasives, qui fait d'ailleurs partie d'un des axes de la nouvelle charte qui a été adoptée au Parc ; aussi, je crois que ce qui nous intéresse beaucoup ce matin, c'est d'avoir une vision précise des études qui ont été menées par Tony DEJEAN dans le cadre de sa thèse, et ses divers partenaires scientifiques français et européens, concernant les maladies émergentes des amphibiens et le développement de la technique de l'ADN environnemental.

Voilà, donc, un séminaire extrêmement intéressant, je vous remercie de l'avoir fait ici à Limoges, Michel, je te passe la parole. »

INTRODUCTION

M. Michel Evrard, vice-président du Parc en charge de la biodiversité, président du Conseil scientifique du Parc

« Mesdames et messieurs, chers collègues, c'est avec un immense plaisir que nous vous accueillons dans les locaux de la Région Limousin.

Je remercie plus particulièrement les intervenants qui viennent de loin, voire de très loin.

La biodiversité, comme l'a précisé Jean-Marie Rougier, se trouve être le sujet du deuxième axe de la Charte du Parc Périgord-Limousin. La communauté scientifique, à l'heure actuelle, parle de la 6ème extinction des espèces, et les batraciens sont particulièrement touchés par cette disparition. Plus de 50% de ces espèces ne sont pas en très bon état de conservation, notamment sur le territoire français. Les espèces exotiques envahissantes seraient, entre autres évidemment, une des causes de la disparition des espèces autochtones et donc de la dégradation de la biodiversité. Je dis bien l'une des causes. La Grenouille-taureau en fait bien entendu partie.

En tant que président du Conseil Scientifique, et président de la commission « biodiversité » au Parc, je suis évidemment très intéressé par ce qui va être dit aujourd'hui dans le cadre de ce séminaire, dont je remercie encore une fois tous les intervenants qui se sont déplacés.

En 2005, pour rappeler un petit peu l'historique du projet, Tony Dejean effectuait un stage au Parc ; en partenariat avec l'association Cistude Nature. Le programme pilote d'éradication a pu avoir lieu en 2006 et 2007, grâce au concours de nombreux partenaires financiers et techniques : l'Europe, l'Etat, l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, les Régions, les départements, l'ONEMA de Dordogne (à l'époque le CSP) dont les gardes ont effectué le tir pendant plusieurs années, et l'ONCFS de Dordogne. Ce programme d'éradication au sein du Parc touche maintenant à sa fin, les résultats vont vous être présentés.

Lors de ce séminaire, vous aurez également la restitution du programme de recherche que Tony Dejean a conduit dans le cadre de sa thèse de doctorat, avec de nombreux partenaires scientifiques, notamment pour l'étude transversale des maladies émergentes des batraciens. Ce programme de coopération, porté par le Parc et l'Université de Savoie, a été rappelons le financé par la Région Limousin et le FEDER Limousin, et il a bénéficié d'une bourse CIFRE.

Nous sommes actuellement, je pense, véritablement sur des enjeux du XXIe siècle, à savoir le maintien de la biodiversité dans les zones humides, 75% des habitats humides, à l'heure actuelle, étant en état de dégradation sur le territoire national, donc menacés.

Tony Dejean et ses collaborateurs ont développé une méthode d'inventaire de la faune aquatique à partir de fragments d'ADN qui sont dispersés dans l'environnement. Cette méthode de l'ADN environnemental présente de multiples possibilités d'application. Pour l'inventaire de répartition de la Grenouille taureau, comme vous allez le voir, elle est certainement plus efficace, même si cela est peut-être moins « sympathique » que l'écoute du chant des mâles le soir au bord des étangs !

Je vais laisser maintenant la parole au premier intervenant de ce séminaire, Matthieu Berronneau, de l'association girondine Cistude nature, qui va nous décrire l'écologie de la Grenouille taureau.

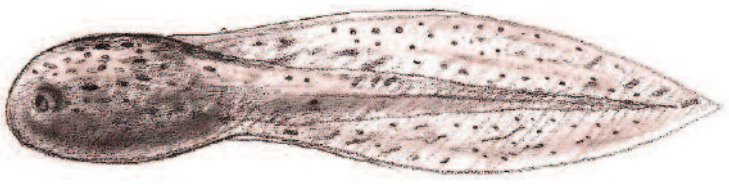
M. Matthieu Berroneau
(association Cistude Nature)

Écologie de la grenouille-Taureau

« Donc, en effet, on m'a demandé de présenter un peu l'espèce dont on va parler ce matin en grande majorité : la grenouille-taureau.

C'est une espèce sur laquelle on a largement travaillé à l'association Cistude Nature, dans le cadre de la mise en place d'un programme d'éradication de l'espèce en Aquitaine. A cette époque-là, le niveau de connaissance de l'espèce était assez proche de zéro. Il était donc important, avant de se lancer dans des actions concrètes, d'améliorer nos connaissances sur l'espèce ; là, je ne vais pas vous présenter le programme d'action puisque ce n'est pas le sujet, mais je vais vous présenter un peu les connaissances qu'on a pu acquérir sur cette espèce en termes d'écologie générale.

Tout d'abord, une petite présentation : la grenouille-taureau est une espèce invasive, ou « espèce exotique envahissante », que l'UICN cite parmi les 100 espèces invasives les plus dangereuses toutes espèces confondues, et elle a d'ailleurs envahi de nombreuses parties du monde. Si on regarde les cartes de répartition, on voit déjà que dans son pays d'origine - les Etats Unis - entre 1989 et 2000, il y a eu une large progression de la présence de l'espèce, donc elle avait déjà entamé sa colonisation ; dans le monde, on a en rouge son aire de répartition originelle, et en vert les pays où désormais l'espèce est présente. On voit bien que la grenouille-taureau est une problématique mondiale, elle est présente dans de très nombreux pays, notamment en Europe.



Têtard Grenouille taureau

Les stades de développement sont assez classiques chez les amphibiens de type anoures.

On a tout d'abord la ponte ; c'est une ponte de très grande dimension : 10 000 à 25 000 œufs, ce qui est assez important en comparaison avec nos espèces autochtones. C'est une sorte d'amas circulaire qui est étendu en surface, qui peut atteindre 1 mètre de diamètre, donc c'est parfois assez impressionnant.

On a ensuite un têtard qui est caractérisé notamment par une taille importante, et qui semblerait se développer au moins sur deux années en Aquitaine. Donc, à l'inverse de la plupart des espèces qu'on a dans notre région, les têtards sont au moins deux ans dans l'eau, le temps de se développer et d'atteindre ces tailles assez remarquables. Alors, ne pas confondre : il y a des espèces locales, et parfois largement en danger, assez rares, qui peuvent atteindre cette taille importante, là j'ai mis l'exemple du *Pélobate cultripède*, une espèce que l'on a chez nous en Gironde (en Sologne, ils ont le *Pélobate brun*), qui donne comme cela des têtards de taille très importante. Donc il est important de ne pas confondre et de ne pas détruire systématiquement les têtards de grande taille, parce que parfois on peut détruire un têtard d'une espèce très rare et largement protégée.

Ensuite, on a le juvénile. Le juvénile, quand il se métamorphose, a la taille d'une petite grenouille verte. On voit l'adulte à côté.

L'adulte qui lui, peut atteindre 20/25 cm museau-cloaque, donc ça fait une grosse grenouille : jusqu'à 950 grammes en Aquitaine, les plus gros qu'on a récupérés faisaient un petit peu moins d'un kilogramme. Ce qui en fait le plus grand anoure de l'hémisphère nord. Ils sont caractérisés notamment par des tympans très gros.

Là aussi j'ai mis « risque de confusion » car attention, il y a certaines espèces du genre « grenouilles vertes » qui peuvent atteindre des tailles importantes. Donc, la taille n'est pas forcément un critère de détermination, il y a d'autres critères, un peu plus pointus, que je n'ai pas spécifiés ici, mais ce qu'il faut retenir, c'est que c'est bien de vérifier qu'il ne s'agit pas d'une grenouille verte.

Le dimorphisme sexuel : on a un dimorphisme sexuel assez marqué chez cette espèce, avec les mâles qui présentent une gorge jaune, qu'on voit bien ici sur la photo de droite, et puis un tympan plus important, à peu près le double de celui de la femelle. Ce gros tympan du mâle lui permet de chanter très fort.

Voilà pour les présentations, ensuite on va donc parler du cycle de vie. Ce cycle de vie, on a pu l'étudier assez précisément, en mettant en place un suivi, par radio-télémétrie notamment. On a fait çà sur plus d'une trentaine d'adultes : on a posé des émetteurs après anesthésie générale, ce qui nous a permis d'apprendre toutes sortes d'informations très intéressantes sur l'écologie, qui permettaient ensuite d'adapter les actions d'éradication sur le terrain. Il y a beaucoup de choses que l'on souhaitait mettre en place à la base, et qui en fait se seraient avérées non payantes, puisque l'écologie de l'espèce dans notre région aurait rendu les pièges ou les actions de piégeage inopérants.

On a aussi mis en place des moyens de suivi de dispersion des juvéniles, par exemple là c'est un dispositif de filet avec des seaux le long du filet, qui permettait de mesurer un peu les taux de dispersion des juvéniles hors des étangs. Je vais décrire les grandes lignes de ce que l'on a observé, saison par saison, en commençant par le printemps.

C'est au printemps qu'on a les adultes qui vont disperser hors de l'étang, notamment en utilisant les fossés. Donc, par exemple, en termes d'application de l'éradication, si on souhaitait commencer l'éradication dès le printemps, on aurait raté beaucoup d'adultes, puisque beaucoup d'adultes sortent de l'étang à cette période pour aller se nourrir dans les zones humides des alentours. Là, c'est un exemple de résultat qu'on obtient : les couleurs représentent des individus, et on voit bien que depuis leur étang d'origine, les individus ont dispersé dans les zones humides (dans cet exemple une aulnaie inondée), pour revenir dans l'étang en fin de printemps. Donc, si on avait débuté ici l'éradication au 15 avril, on aurait raté la globalité des adultes de la mare. C'est bien là un résultat de l'étude de l'écologie de l'espèce très intéressant dans le cadre d'une application à l'éradication.

On a pu aussi observer des déplacements d'individus qui peuvent utiliser évidemment les fossés, mais également de plus grands réseaux hydrographiques. Dans le cas présent, c'est carrément la Dordogne, dont on est à l'estuaire : on a vu des individus, comme ça, qui ont pu disperser en prenant la Dordogne ! Depuis, on a même trouvé des têtards de Grenouille taureau bien vivants dans l'estuaire : c'est le CEMAGREF qui a pêché des têtards en y faisant des pêches au filet (je ne sais pas si ce n'est pas à l'occasion de pêches à l'esturgeon). C'était sûrement des têtards qui s'étaient échappés d'un étang suite à une vidange, mais ils étaient vivants dans l'estuaire, ça ne les avait pas tués, c'est vraiment impressionnant.

À noter, au printemps, à la sortie de l'hivernation, on a un pic de mortalité assez important, beaucoup d'adultes ayant du mal à résister aux températures fraîches. Mais ça ne suffit pas, malheureusement, à empêcher le maintien de l'espèce chez nous.

Et puis, on a observé beaucoup d'adultes qui restaient hors de l'eau très longtemps, sur parfois plusieurs semaines, parfois plusieurs mois. Or, c'est une espèce qui était considérée dans la littérature comme très aquatique, et lorsqu'on a suivi les individus, beaucoup étaient hors de l'eau, dans les sous-bois, dans les feuilles mortes, et donc c'est des individus que l'on rate lors des passages au bord des étangs. C'est une chose qu'il faut savoir, car ce n'était pas du tout décrit dans la littérature, or c'est ce qu'on a observé.

En été, les adultes retournent dans l'eau, ils débutent la reproduction. Je vous ai mis une petite série de photos prises par un naturaliste de Gironde, qui nous a fait de belles photos de combats de mâles. C'est assez sympathique ce qu'il a pu voir, ce sont des choses qu'on ne voit pas forcément toujours sur les sites. Là, on a deux mâles qui se battent au moment de la reproduction, l'espèce est très territoriale. Suite à ces combats, généralement, il y a la reproduction et les pontes commencent à apparaître, ici une belle ponte sur la Jussie... on a un milieu littéralement envahi d'espèces envahissantes (rires)...

Au milieu de l'été, par contre, on observe généralement un fort ralentissement des activités. Cela est lié aux très fortes chaleurs. Quand il fait très chaud, que les niveaux d'eau baissent, souvent apparemment, les adultes se réfugient dans les terriers de ragondins - encore une espèce exotique (rires). Il fait trop chaud, alors ils amorcent apparemment une sorte d'estivation, ils ralentissent leur activité et attendent que de meilleures conditions climatiques réapparaissent.

Et puis souvent, lors des pluies orageuses de fin d'été-début d'automne, avec la métamorphose des têtards en juvéniles, on a une forte dispersion des juvéniles. Vous avez ici les résultats des captures au filet par dates : on voit bien que ça commence, ici, fin août, jusqu'au 15 novembre environ. On a des pics de dispersion. On a notamment eu un gros pic de dispersion qui correspondait à une semaine de la fin du mois d'août où on avait eu de fortes pluies. Et donc on retrouve, en fin d'été-début d'automne, plein de juvéniles en bord d'étang, qui préparent leur dispersion, et qui ensuite se retrouvent dans les fossés et un peu partout.

A la fin de l'été, les adultes également reprennent leur activité, et on en a retrouvé pas mal qui recommençaient à disperser hors des étangs. Peut-être aussi qu'ils préparent leur hivernation. Là aussi, à propos de l'hivernation, la littérature parlait systématiquement d'adultes qui restaient dans la vase, au fond des étangs. Alors beaucoup nous ont dit : « il suffit de curer les étangs l'hiver, et comme ça on récupère tous les adultes qui passent l'hiver dans l'eau ». Or, nous avons constaté que plus de la moitié des adultes étaient hors de l'eau, dans la litière en pleine forêt. Vous avez ici un exemple, on est au mois de janvier, il fait très froid, et l'adulte est dans la mousse. Il échappe au gel de cette manière, et il passe l'hiver comme ça.

Et puis on a quand même quelques individus qui résistent au froid et qui sont encore actifs, parfois même sous la glace : on a aperçu quelques individus sous la glace, qui se déplaçaient sous l'eau, très lentement évidemment. Il reste donc toujours un petit peu d'activité l'hiver chez certains individus. Les têtards, eux, se réfugient au fond des mares et étangs, là où l'eau est la plus chaude.

Voyons ensuite un peu le mécanisme de dispersion. L'association l'a beaucoup étudié dans le cadre du programme, c'était évidemment important d'en savoir un peu plus sur la dispersion. On s'est basés notamment sur les résultats des inventaires, et on voit une chose intéressante : c'est que la progression de l'espèce semble freinée par certaines caractéristiques du milieu. La croix rouge représente le point historique d'introduction de la grenouille-taureau en Aquitaine. C'était en 1968, un particulier de la commune d'Arvert qui a ramené un peu moins de 10 adultes chez lui, dans sa mare. C'est à partir de cet endroit-là que la population de Gironde s'est développée. La population de Dordogne vient aussi, apparemment, de ce point d'introduction. On aurait pu penser que depuis ce point d'introduction, on aurait retrouvé la grenouille-taureau partout autour, avec un cercle parfait de répartition. Or, il n'en est rien. Il y a des secteurs très proches du point d'introduction où on n'a pas de grenouille-taureau, où en tout cas elle est très rare, et puis des secteurs où elle est très abondante. En fait, ce qui se passe, c'est qu'elle suit la vallée alluviale du fleuve, donc les zones plutôt basses, et dès qu'on arrive sur des zones de relief, l'espèce est beaucoup plus rare et difficile à contacter. Donc il semblerait bien qu'elle suit la topographie « basse » où elle retrouve ses milieux préférentiels, et qu'elle est plus rare dans les zones un peu plus accidentées. Voilà déjà quelque chose d'assez intéressant, d'autant que l'on observe la même chose sur le Bassin d'Arcachon, où l'on connait aussi le point d'introduction historique. Là aussi, la Grenouille taureau a dispersé vers le Nord ; elle était barrée au sud par une autoroute, et par des agglomérations à l'Ouest et à l'Est. Au Nord, elle arrive sur l'eau saumâtre du Bassin d'Arcachon. Donc, sur Arcachon, elle est à peu près cantonnée sur son secteur d'origine, et on espère qu'elle ne se dispersera pas plus que cela.

A l'échelle de la région, les autres intervenants en parleront peut-être un peu plus que moi, mais on a vu un peu les mêmes choses : à partir des points d'introduction, un déplacement vers l'aval en direction de l'estuaire, et puis des déplacements de populations vers le Bassin d'Arcachon et vers la Dordogne, et ça, c'est bien des déplacements par l'Homme. Donc, l'Homme joue un rôle très important dans la dispersion de l'espèce, c'est l'Homme qui permet l'arrivée de la grenouille-taureau sur d'autres secteurs.

Le phénomène est exactement le même à l'échelle de l'Europe, comme le confirment les données génétiques.

Donc, en conclusion, la Grenouille taureau est bien une espèce invasive, car elle présente une grande faculté d'adaptation, un taux de succès de reproduction très important, une grande capacité de déplacement, et elle a peu de prédateurs vu sa taille. Ce qui fait qu'elle a une croissance et une dispersion rapides, et qu'elle colonise tous types de plans d'eau. Cela en fait donc une menace pour la faune patrimoniale des zones humides.

Voyons maintenant quels sont les impacts.

Tout d'abord, il y a une prédation des espèces autochtones. Donc, on a mis en place une étude

du régime alimentaire des adultes de Grenouille taureau. Ce qu'on observe, c'est que c'est en majorité des amphibiens que l'on retrouve dans le contenu stomacal des Grenouilles taureaux. Donc les amphibiens sont la principale source de nourriture de la Grenouille taureau... Mais on trouve aussi d'autres animaux, comme par exemple ici un jeune rat de 58 grammes, trouvé dans cet individu ; là, on peut reconnaître une salamandre tachetée à moitié digérée avec un dytique ou une larve de dytique, et puis ça, ce doit être une grenouille, ou ce qu'il en reste ; on trouve également des serpents aquatiques, par exemple une Couleuvre à collier de 77 cm, ce qui fait une belle couleuvre, eh bien elle s'est fait avaler par cette Grenouille taureau... Et puis là, il est prédigéré, mais je pense que c'est un merle noir, qui s'est fait capturer par une Grenouille taureau. Rien ne l'arrête (rires)... C'est donc de la prédation. Cependant, une Grenouille verte de cette taille-là mangerait probablement la même chose. La Grenouille taureau est plus grande, elle se nourrit donc de proies à la taille qui lui convient.

Il y a également une compétition inter-spécifique. On a notamment des adultes de grande taille, mais on a aussi des têtards de grande taille, et qui se trouvent parfois en très grande densité dans les mares où ils sont présents. Les têtards de Grenouille taureau ne mangent pas les têtards de Grenouille verte par exemple, mais ils sont en compétition sur la ressource alimentaire. Evidemment, quand on voit des densités importantes de têtards tels que celui-ci, on se doute qu'il y a une grosse compétition sur la ressource alimentaire, et dans ce cas-là il n'y a pas la place pour deux espèces.

Et puis, la Grenouille taureau est porteuse saine d'un champignon, qui est une menace pour les amphibiens du cru, mais là je laisserai mes collègues en parler...

Pour conclure, quand la Grenouille taureau est présente, on a observé un peu partout – et c'est largement décrit dans la littérature – une régression ou une disparition de certaines espèces endémiques. Suite à des éradications, on a un retour des espèces autochtones. Nous l'avons observé nous-mêmes sur des sites-tests : on a vu un retour des Grenouilles vertes suite à l'éradication des Grenouilles taureaux. Et puis, évidemment, la menace « Grenouille taureau » s'ajoute à la disparition des zones humides, aux pollutions d'origine anthropique, aux impacts d'autres espèces envahissantes. »

QUESTIONS

Patrick Gonzales, CNRS (station marine d'Arcachon) : Comment peut-on expliquer la non-dispersion à l'amont du point d'introduction, avez-vous des explications ?

Matthieu Berroneau : Nous n'avons pas de réponse irréfutable. Est-ce que c'est que naturellement, quand elles arrivent dans le fleuve, elle n'essayent pas de remonter comme le ferait un poisson ? En tout cas, c'est ce qu'on observe chez la Grenouille taureau, elles descendent toujours vers l'aval. Je pense que c'est vraiment une dispersion naturelle des têtards, qui se retrouvent par hasard dans le fleuve, qui n'ont pas la force de remonter le courant, et donc qui dévalent vers l'aval, et qui arrivent à se métamorphoser en juvéniles plus en aval. Pour l'instant, c'est la seule chose que l'on voie, et puis c'est la seule hypothèse qui permet d'expliquer ce phénomène.

Michel Evrard, vice-président du PNR Périgord-Limousin, en charge de la biodiversité : Est-ce que des prédateurs de la Grenouille taureau ont été identifiés, et notamment dans son pays d'origine ?

M. B. : Dans le pays d'origine, il y a tout ce qui est caïman, mais évidemment on ne va pas introduire du caïman en Aquitaine (rires)... En Aquitaine, il y a les grands oiseaux, les grands échassiers, etc, qui s'attaquent surtout aux jeunes individus. Sur les grands adultes, je ne pense pas qu'il y ait de réel prédateur, à part peut-être, occasionnellement, un carnivore... Mais il n'y a pas de prédateur spécialisé sur les gros individus de Grenouilles taureaux. Sur les juvéniles, évidemment, c'est les prédateurs classiques, les rapaces, les échassiers etc.

La loutre ?

M. B. : La loutre probablement, mais dans les secteurs où la Grenouille taureau est présente, il y a peu de loutres. Peut-être sur le bassin d'Arcachon un petit peu, il doit y en avoir, mais dans la vallée alluviale, c'est des secteurs agricoles assez dégradés, dans lesquels je ne pense pas que la loutre soit présente en grande densité.
(Fabienne Renard-Laval du Pnr Périgord Limousin précise que la Loutre est maintenant bien présente sur le Parc, là où il y a de la Grenouille taureau)
Souvent, ce qui se passe sur les espèces comme ça, introduites, c'est que les prédateurs ne connaissent pas l'animal, donc il y a toujours un délai avant de s'habituer et de se spécialiser sur cette espèce-là, un délai qui permet à l'espèce exotique de s'installer. Personnellement, j'avais vu des prédations de carnivores et de rapaces, mais je n'avais pas pu identifier si c'était précisément sur des individus capturés vivants, ou sur des individus

retrouvés morts et consommés ensuite, notamment en sortie d'hivernation. Là, l'individu qu'on voit a été « grignoté », mais je pense que c'est un milan ou un autre rapace qui l'a trouvé mort et qui l'a alors dépecé.

Et le brochet ?

M. B. : Le brochet, oui, peut-être sur les têtards, ou le black bass également.

Dominique Teysseyre, Agence de l'Eau Adour-Garonne (Toulouse) : **Je voudrais avoir des précisions au niveau de la répartition. Parce que vous nous montrez une carte de la région Aquitaine avec trois foyers principaux. Là, on peut considérer qu'on a un état des lieux, même si on ne peut jamais être sûr de rien en ce domaine-là, mais vous avez clairement identifié ces trois secteurs, sachant que le secteur autour de l'estuaire continue de se développer ; au niveau national, est ce qu'on a cette même vision des sites occupés ?**

M. B. : Oui, au niveau national, il ne reste plus qu'une seule autre population, à part ce que l'on a en Aquitaine : c'est en Sologne, je crois qu'on va en parler tout à l'heure.

Jean-Marie Rougier, conseiller régional du Limousin : **Comment a-t-elle été introduite en Sologne ?**

M. B. : On ne connait pas l'historique, par contre on a une situation qui est peut-être génétiquement identique à l'Allemagne, ou assez proche. Donc c'est soit un échange Sologne-Allemagne ou Allemagne-Sologne, ou alors une autre introduction. C'est en tout cas une introduction qui ne vient pas d'Aquitaine. Donc c'est une source d'introduction qui vient de quelqu'un d'autre.

Dominique Teysseyre, Agence de l'Eau Adour-Garonne (Toulouse) : **Parce que les trois d'Aquitaine, là, sont similaires ?**

M. B. : Oui, c'est la même souche génétique. Donc il semblerait bien que les populations de Dordogne et du Bassin d'Arcachon proviennent de l'origine girondine. C'est sûrement des gens qui ont déplacé des têtards parce qu'ils trouvaient ça sympa, ou pour l'alimentation...
Précision de Fabienne Renard-Laval, PNR PL : Sur le secteur du Parc Périgord-Limousin, on sait que c'est un habitant qui en a ramené sur son plan d'eau depuis l'estuaire de la Gironde, il y a une quinzaine d'années. Et comme par hasard, l'espèce a été introduite au niveau des deux plans d'eau publics de baignade et pêche, le grand étang de Saint-Saud et le grand étang de Saint-Estèphe (d'où les deux noyaux de présence) parce qu'il y avait des pratiques de « j'attrape les têtards, je m'en sers comme appâts pour aller pêcher, je vais faire un tour sur l'étang de pêche à côté, ils se sauvent », et voilà... c'est parti !

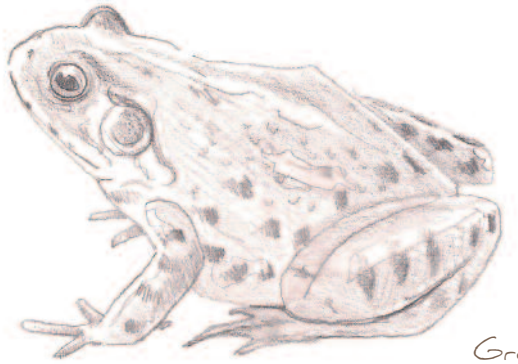
M. B. : Et pour finir sur les cartes, tous les petits points blancs qu'on voit, c'est les zones où on a cherché, et où on n'a pas trouvé la Grenouille taureau. C'est pour un peu illustrer l'effort de recherche.

Fabrice Château, directeur du Parc Naturel Régional Périgord-Limousin : **En Gironde, où en est l'état de la lutte ?**

M. B. : Il en est à peu près à zéro... En gros, ce qui s'est passé, c'est qu'à la fin du programme de quatre ans qu'on avait mis en place pour réaliser l'inventaire de répartition, préciser l'écologie de l'espèce, tester les moyens de lutte, etc, on a proposé une éradication à l'échelle de la Région...
Suite à notre collaboration avec le Parc en 2005, vous aviez lancé l'éradication pilote sur les populations du Parc. Il y avait une opportunité de la faire, c'était intéressant parce que vous aviez de petites populations, etc. Nous, ça nous permettait d'avoir un retour d'information de méthodes, pour pouvoir les améliorer, en fonction de ce qui marche et de ce qui ne marche pas, et de lancer ensuite une grosse action d'éradication sur le gros noyau principal de la Gironde. Donc, on a fait les réunions de restitution de programme, en présentant tout un protocole chiffré, tout le détail du nombre d'heures, du personnel qu'il fallait, etc. On a présenté ça aux financeurs, ensuite c'était à eux de prendre la décision. Ils étaient plutôt partants, mais ça ne s'est pas fait pour des histoires de portage des actions, puisque ce n'est pas évidemment à Cistude nature, une petite association, de porter un si gros projet ! Et en gros il y avait des problèmes politiques entre les différents financeurs, qui souhaitaient que ce soit telle ou telle structure qui porte le programme. Ca ne s'est donc pas fait pour ces raisons-là...
Depuis, ça a été relancé à plusieurs reprises, on a fait plusieurs courriers pour essayer d'expliquer qu'entretemps, la Grenouille taureau continuait de progresser. C'était resté au point mort. Dernièrement, le Ministère a voulu lancer un plan d'action sur les espèces envahissantes, donc on a été à nouveau relancés. Mais nous avons rappelé que ça faisait donc 5 ans maintenant que la répartition n'avait pas été mise à jour. A la fin du programme, on connaissait parfaitement, point par point, les étangs colonisés ; aujourd'hui, la situation a changé, notamment sur l'estuaire, où l'espèce continue de monter vers le Nord. Le problème, c'est qu'il faut reprendre la partie « inventaire ». On a le reste, on a les autres informations, mais pour la partie « inventaire », il faut la refaire...

M. Francesco Ficetolal
(chercheur à
l'Université de Milan)

Biologie de la dispersion de la Grenouille taureau en Europe



Grenouille Taureau

« Merci beaucoup de l'invitation. Je suis Francesco Ficetola, je viens de l'Université de Milan. Je vais parler du travail de recherche qu'on a fait avec Claude Miaud, depuis 2005, sur la biologie de l'invasion de la Grenouille taureau en Europe, donc d'un projet à l'échelle européenne. Mais je vais aussi vous montrer le travail qui a été concentré sur une partie de la vallée du Pô et sur le Parc du delta du Pô, qui est une des premières zones d'Europe où a eu lieu l'invasion de la Grenouille taureau.

On a déjà vu la répercussion de la Grenouille-taureau à l'échelle globale, et on a bien vu que la Grenouille taureau a un impact négatif sur les espèces natives, pour la prédation et pour la compétition.

Mais, et Claude Miaud va en parler plus en détail ensuite, un des problèmes les plus graves posé par la Grenouille taureau est la diffusion du chytride. Le chytride est un champignon de la peau qui cause la mortalité des amphibiens, en particulier dans plusieurs situations ; on peut en parler plus en détail, mais surtout au moment de la métamorphose, entre la phase « têtard » et la phase « adulte ».

On a fait un inventaire des **introductions de la Grenouille taureau en Europe**, et comme vous le voyez sur cette carte, on a eu vraiment un grand nombre d'introductions différentes, au moins 28 depuis 1930, et dans plusieurs pays européens. On a eu au moins 4 introductions en Espagne, 3 ou 4 en France, une dizaine en Italie, 3 ou 4 en Allemagne... Et vous voyez que cette espèce a été introduite dans tous les pays de l'Europe de l'Ouest, plus ou moins.

Mais si vous regardez bien, s'il y a eu des cas où l'espèce est devenue envahissante, comme en France et dans différentes parties de l'Italie, on a eu aussi des situations où après introduction, l'espèce n'est plus présente en fait, elle est maintenant éteinte. Et donc la première question qu'on s'est posée est : pourquoi dans certaines régions on a eu une invasion, et des problèmes pour la biodiversité, alors que par contre, par exemple en Espagne ou en Italie du Sud, ou encore en Grèce, on a eu des introductions, mais l'espèce est restée très localisée ? Pour exemple, en Grèce elle est restée localisée dans le plan d'eau où elle avait été introduite, et n'en a pas bougé beaucoup. Par contre, dans la vallée du Pô et en France occidentale, on a eu une invasion avec une forte expansion des individus, parfois très vite comme on a vu pour la région de Bordeaux, et comme on va le voir pour la vallée du Pô.

Donc, la question qu'on s'est posée ensuite est : « quelles sont les zones en Europe où le risque d'invasion est le plus élevé ? »

Parce que bien sûr, si on comprend quelles sont les zones où il y a un plus fort risque d'invasion, on peut aussi mettre en place des plans d'action, surtout dans les régions où il y a vraiment des risques d'invasion. En effet, s'il y a des introductions de Grenouilles taureaux dans des zones où l'on sait qu'il est improbable de les voir causer une invasion, il n'y a pas vraiment d'urgence. Mais par contre, dans les zones où il y a un très fort risque d'invasion, où la situation est très favorable pour ces grenouilles, alors là, c'est plus urgent de mettre en place des actions d'éradication.

Bien sûr, le premier facteur qui peut rendre une zone favorable pour cette espèce, c'est **le climat**. S'il y a un climat favorable pour cette espèce, le risque de voir une invasion est plus grand. Donc, ce que nous avons fait, c'est utiliser des outils de modélisation pour essayer de décrire la niche climatique de l'espèce. On est partis de plus ou moins 1.500 localités de présence de la Grenouille taureau dans la partie orientale de l'Amérique du Nord, donc dans son aire de répartition native et, bien sûr, des données climatiques de cette zone de répartition native.

À partir de là, on a créé un modèle qui va décrire la niche environnementale de l'espèce. Là, vous voyez, en rouge, les zones de l'Amérique du Nord où le climat est le plus favorable pour la Grenouille taureau. Apparaît, par exemple, cette ligne à la frontière entre les Etats-Unis et le Canada, qui correspond aux limites « nord » de la répartition de l'espèce, et qui correspond à la zone où la température en hiver est trop basse, et donc où les grenouilles ne peuvent pas passer l'hiver. A l'ouest, en revanche, la répartition de l'espèce est limitée surtout par les précipitations, parce que si le climat est trop aride, c'est beaucoup plus difficile pour cette espèce qui dépend, bien sûr, de l'eau pour la reproduction : il est plus difficile de trouver des conditions favorables pour la reproduction et des plans d'eau permanents qui permettent aux têtards de passer l'hiver dans l'eau.

Après, on a pris ce modèle et on a essayé de le projeter à l'échelle globale, et comme ça on a identifié, à l'échelle globale, les zones où le risque d'invasion est plus élevé, et vous pouvez constater qu'il existe un risque d'invasion plus élevé en Amérique du Sud, dans certaines zones d'Europe, mais aussi en Chine et au Japon. En fait, dans toutes ces zones « à risque », sauf l'Australie, il y a effectivement déjà des invasions de Grenouilles taureaux. Malheureusement pourrait-on-dire, on a effectivement des bonnes correspondances entre les résultats de ces modèles et les zones où la Grenouille taureau est envahissante.

Si on regarde la situation en Europe, vous voyez des points ronds, qui correspondent à certaines localités où la Grenouille taureau n'est pas envahissante. On en a deux, par exemple en Espagne, où l'on a eu des introductions mais pas d'invasion, on en a aussi en Italie du Sud, ainsi qu'en Grèce, et c'est la même chose en Hollande. Donc, pour ce qui concerne les zones où on a eu des introductions mais pas d'invasion, la plupart sont dans des secteurs où le climat n'est pas exactement favorable pour cette espèce, c'est notamment le cas des climats trop méditerranéens avec des périodes sèches, qui représentent une limite pour la reproduction de cette espèce.

Mais par contre, les zones de la France occidentale, ou l'Italie du Nord, ou la partie de l'Allemagne où il y a invasion, ont, malheureusement, le climat favorable pour cette espèce. Donc, c'est des zones où le risque d'invasion par la Grenouille taureau est vraiment élevé. Voilà, pour le point de vue « risque d'invasion ».

On a aussi essayé d'utiliser des outils génétiques pour essayer de comprendre qui étaient les grenouilles qui ont causé l'invasion. On a essayé d'identifier **l'origine des grenouilles**, de quelle région elles venaient, mais aussi combien de grenouilles ont été introduites. On a donc étudié des échantillons, soit de la zone de répartition native d'Amérique du Nord, soit de la plupart des populations européennes, et on a séquencé l'ADN mitochondrial.

Cette carte nous représente les résultats. Chaque « fromage » représente les individus, ici en Amérique du Nord. Vous voyez des couleurs différentes, cela signifie que les différents individus des populations étaient génétiquement différents. Par exemple, ici, il y avait 3 génotypes différents dans 4 individus séquencés. Donc cela signifie que dans la répartition native, en Amérique du Nord, les populations ont une diversité génétique élevée : si je vais capturer plusieurs individus, je vais trouver des individus tous différents du point de vue génétique.

En Europe, c'est l'inverse : en fait, vous voyez qu'on a séquencé environ 60 individus de la zone de Bordeaux, par exemple, et ils étaient tous identiques. C'est la même chose avec les individus d'Italie du Nord, qui sont aussi tous identiques entre eux, comme les individus du Loir et Cher et d'Allemagne. Donc, la plupart des populations européennes sont constituées d'individus très, très, similaires du point de vue génétique.

On peut aussi identifier la zone d'origine, c'est-à-dire la zone où les populations américaines sont le plus similaires aux populations européennes. Donc, on peut savoir combien de fois les grenouilles ont passé l'océan, ont été transportées de l'Amérique du Nord jusqu'en Europe. Par exemple, les Grenouilles taureaux qui étaient présentes en Angleterre viennent probablement de la partie la plus occidentale de la zone de répartition native de la Grenouille taureau ; celles de Belgique viennent plus probablement de la partie orientale des Etats-Unis ; celles-ci (couleur bleue)

sont les plus probables pour les populations d'Allemagne et du Loir et Cher ; et par contre, les populations de France occidentale et d'Italie viennent probablement de Louisiane. En fait, cela correspond avec des données historiques que l'on nous avait transmises, et on a bien vérifié avec la génétique l'origine de ces populations.

Le fait que toutes les populations européennes soient très homogènes - on a trouvé vraiment très peu de génotypes différents – et que tous les individus soient à peu près identiques du point de vue génétique, nous dit qu'on a eu très, très, peu de fondateurs. Donc, un nombre très faible d'individus a été suffisant pour déclencher l'invasion dans les populations européennes.

Dans la région d'Italie du Nord, comme dans la région de Bordeaux, on a fait des simulations qui nous ont dit que l'invasion a été causée par moins de 6 femelles. Voilà qui est très important du point de vue de la gestion, parce que si l'invasion est partie de 5, 6 femelles, c'est-à-dire d'une dizaine d'adultes ou moins, cela signifie que si l'on veut faire un projet d'éradication, il faut être bien sûr d'éradiquer tous les individus. En effet, si on oublie 10 ou 20 individus, ce qui représente un nombre très faible d'individus, il y a le risque que, dans quelques années, survienne une nouvelle invasion. Donc, cette particularité peut être très importante du point de vue de l'éradication. On a des chiffres que l'on peut utiliser.

Voilà la situation à l'intérieur de l'Europe. Vous voyez qu'il y a des zones homogènes, où les individus sont tous identiques, par exemple la situation en Savoie, où en fait il n'y avait qu'un seul individu ; en France occidentale, les individus sont probablement identiques entre toutes les populations, et cela nous dit que les individus ont été transportés par l'Homme, entre une population et l'autre. Et les populations ont eu la même origine, elles viennent de la même introduction à partir de l'Amérique du Nord. C'est la même chose pour l'Italie du Nord, où toutes les populations sont identiques du point de vue génétique. Il y a donc eu une seule introduction, à la suite de quoi des individus ont été portés par l'homme dans différents endroits.

On sait, parce qu'on a les données historiques, que les invasions d'Italie du Nord et du sud-ouest de la France ont été causées par deux introductions différentes, lors de deux périodes historiques différentes. Mais elles sont identiques du point de vue génétique pour le marqueur génétique utilisé. Parce que les deux viennent de la même région des Etats Unis, notamment la Louisiane.

On a aussi, comme Matthieu Berroneau l'a fait dans la région de Bordeaux, pu utiliser les données historiques de répartition pour essayer de reconstruire **la dynamique d'invasion dans la vallée du Pô**.

Cette zone-là, c'est la zone du Parc du delta du Pô. L'étoile représente le point d'introduction. L'espèce a été introduite en Italie du Nord environ en 1935. Au début, vous voyez que la plupart des individus étaient très, très, proches de la zone d'introduction. On voit une petite augmentation, mais dans les vingt premières années, la plupart des individus étaient très proches de la zone d'introduction, à l'exception de quelques petites localités isolées. Dans celle-ci, notamment, la première localité faisant partie du Parc du Pô, elle a été probablement introduite directement pas l'Homme. Donc il y a eu, comme en France, des mouvements d'individus qui ont été transportés par l'Homme, pour différentes raisons et même parfois par simple curiosité : c'était des animaux bizarres...

Vous pouvez suivre la dynamique de l'expansion au cours du XX^{e} siècle. Ici, par exemple, il y a eu un gros déplacement, qui a été encore une fois causé par l'Homme. En l'occurrence, c'était un prêtre qui avait amené des animaux dans sa paroisse, et malheureusement, on peut constater qu'à partir d'une répartition très localisée, on en est arrivé maintenant à une répartition plus diffuse sur le territoire. Mais, comme vous avez vu pour la France, il y a encore une fois un très fort rôle du relief. Encore une fois, la dispersion naturelle depuis la source d'introduction a suivi l'hydrographie, et toujours en direction de la mer. La direction des rivières est donc très importante pour la dispersion de cet animal.

On a, par contre, relevé un rôle très important des activités agricoles. Ainsi, il y a certaines activités agricoles qui sont présentes dans la vallée du Pô, surtout les rizières, qui sont très importantes pour cette espèce. Elle va en effet utiliser les plans d'eau qui sont associés à la culture du riz pour s'implanter. Donc, cette espèce est capable d'utiliser les activités humaines qui peuvent favoriser sa dispersion. La présence de champs de riz dans les années 50 et 60 a certainement favorisé la descente de la Grenouille taureau le long de la vallée du Pô, notamment vers le Parc du delta du Pô.

Finalement, la dernière partie de l'étude a considéré la présence de chytrides dans le Parc du Pô. Plusieurs populations de grenouilles-taureaux en Europe sont infestées de chytrides, qui est ce champignon causant cette maladie des amphibiens dont vous entendrez parler tout à l'heure ; on ne savait rien de la situation dans la basse vallée du Pô, et dans le Parc du delta du Pô, qui en fait a été une des premières zones d'Europe où l'on a observé l'invasion de la Grenouille taureau.

Donc, la question que nous nous sommes posée est « dans cette zone d'Europe, dans la première zone où les Grenouilles taureaux ont envahi le milieu naturel, la présence de la Grenouille taureau est-elle associée aux chytrides ? »

Ici, vous voyez en bleu les zones du Parc du delta du Pô qui sont surtout des zones humides et des forêts associées aux zones humides, et cette étoile représente la première localité de présence des Grenouilles taureaux dans le Parc du Pô ; une présence qui se poursuit plus ou moins dans la même zone. En fait, il faut dire que dans le Parc du delta du Pô, la Grenouille taureau n'est pas beaucoup présente. Elle est, normalement, restée limitée dans cette zone de la partie finale, c'est-à-dire précisément le delta.

On a échantillonné des espèces natives d'amphibiens dans le Parc du Pô : des rainettes dans 3 localités ; des grenouilles vertes dans une deuxième localité ; et enfin, dans une localité très proche de celle où était présente la Grenouille taureau, on a échantillonné soit la Grenouille agile, soit la Grenouille verte.

Quand on fait l'échantillonnage des chytrides, il faut faire très attention pour éviter de diffuser la maladie dans les autres populations. En effet, si on va échantillonner une maladie, le risque est réel de la diffuser.

On utilise des méthodes normalement non invasives pour tester la présence de ce champignon cutané ; c'est-à-dire qu'on va utiliser des tampons que l'on passe sur la peau des animaux. Ensuite, il faut bien tout désinfecter, pour éviter de diffuser la maladie.

Et voilà les résultats de l'analyse « champignons » : dans les zones au Sud du Parc, on n'a pas détecté les chytrides. Il faut préciser qu'il est très important d'évaluer la présence de chytrides dans le Parc, parce qu'il y a là des espèces, et notamment la Grenouille agile italienne, qui sont très en danger dans cette zone, et pour lesquelles on a un programme en cours d'élevage en captivité pour la réintroduction. Or, si on élève en captivité des animaux porteurs de l'infection, cela pourrait causer un problème très grave, parce qu'en fait on va essayer d'élever des animaux rares, mais comme il y a la maladie, on n'aura pas de succès.

Il était donc très important de connaître la situation, surtout dans les zones les plus au sud, où il y a les dernières populations de Grenouilles agiles italiennes, pour lesquelles on va essayer de mener les actions d'élevage en captivité.

Malheureusement, on a trouvé les chytrides dans la zone la plus au Nord du Parc, c'est-à-dire la zone la plus proche du point d'introduction de la Grenouille taureau. Et dans ce secteur-là, une grenouille verte sur trois était infectée par les chytrides.

Voilà, merci encore de votre invitation, et merci aussi à tous ceux qui ont travaillé sur ce projet, qui est lancé depuis 2005.

QUESTIONS

Laurent Chabrol, du Conservatoire Botanique National du Massif Central : On a l'habitude de dire qu'un des facteurs de bonne santé des populations, c'est la diversité génétique, et qu'il faut des corridors pour les échanges génétiques... On s'aperçoit qu'on a là des populations génétiquement très homogènes, mais très dynamiques ; donc, en fait, on n'aurait pas besoin d'avoir des « corridors » favorisant le « brassage génétique » pour qu'une population soit en bonne santé... Peut-on avoir des éclaircissements sur ce point ?

Francesco Ficetola : Je ne vous l'ai pas montré mais en fait, ce qui s'est passé, probablement, c'est que la population, après l'introduction, est montée très vite du point de vue démographique. Cela a permis de faire échapper les populations au « goulot d'étranglement ». Il faut se rappeler que chaque femelle peut faire plusieurs milliers d'œufs dans la ponte, et donc elle peut produire des centaines de juvéniles. Dans diverses études, on a parfois vu que cette montée démographique très rapide cause ce que l'on appelle une « purge génétique ». C'est-à-dire qu'on a des individus qui sont très homogènes du point de vue des marqueurs ADN neutres. Or, la consanguinité peut être un problème, mais si la consanguinité cause la mortalité de 50%, ou 70% des individus dans les premières phases du développement des têtards, ce n'est en fait pas un vrai problème pour une espèce où chaque femelle va produire des milliers d'individus. Et donc cela peut faire sortir vite les populations du « goulot d'étranglement » et causer une invasion, même dans la situation où tous les individus sont très homogènes.

Fabrice Château : En présence des chytrides, toutes les populations ne sont donc pas infectées ?

F. F. : Non, apparemment pas. Claude MIAUD va vous en parler je pense plus en détail, mais en effet toutes les populations ne sont pas infectées. Je n'ai pas de données très récentes pour ici, mais sur ce que j'avais vu, ce n'était pas le cas.

Conclusion de Fabienne Renard-Laval :
S'il n'y a pas d'autre question, on va remercier Francesco FICETOLA d'être venu d'Italie spécialement pour cette demi-journée, sans omettre de rappeler qu'il a travaillé en collaboration également avec Tony DEJEAN sur ce programme. Il s'agit donc bien d'une collaboration interrégionale et internationale, comme le souhaitaient nos partenaires.

M. Claude Miaud
(Directeur d'Etudes à l'Ecole Pratiques des Hautes Etudes, Montpellier)

La menace sur la biodiversité représentée par la Grenouille taureau : impact des chytrides

« Bonjour à tous. Je voudrais également vous remercier pour cette invitation : c'est toujours intéressant de restituer des travaux devant d'autres publics que des publics seulement scientifiques ; c'est un bon exemple d'étude que nous appelons la « recherche-action » : c'est de la recherche, il y a beaucoup de paramètres que l'on ne connait pas, mais il faut aussi agir en même temps, il faut que l'on essaye d'acquérir des informations scientifiques pour alimenter parallèlement l'action. Pour beaucoup de domaines liés à la gestion de la biodiversité, on dépend de cette problématique de « recherche-action ».

Nous nous sommes partagé le travail et je vais vous présenter l'aspect plutôt « maladie des amphibiens ». Comme vous venez de le voir avec la présentation de Francesco FICETOLA, la Grenouille taureau étant un des porteurs potentiels du champignon responsable de cette maladie qu'est la chytridiomycose, il y avait évidemment une dimension épidémiologique importante dans cette étude.

Sur la première diapositive, j'ai rappelé les nombreux partenaires en essayant de ne pas en oublier. Ils y a des partenaires institutionnels, les financeurs, ils se reconnaitront.

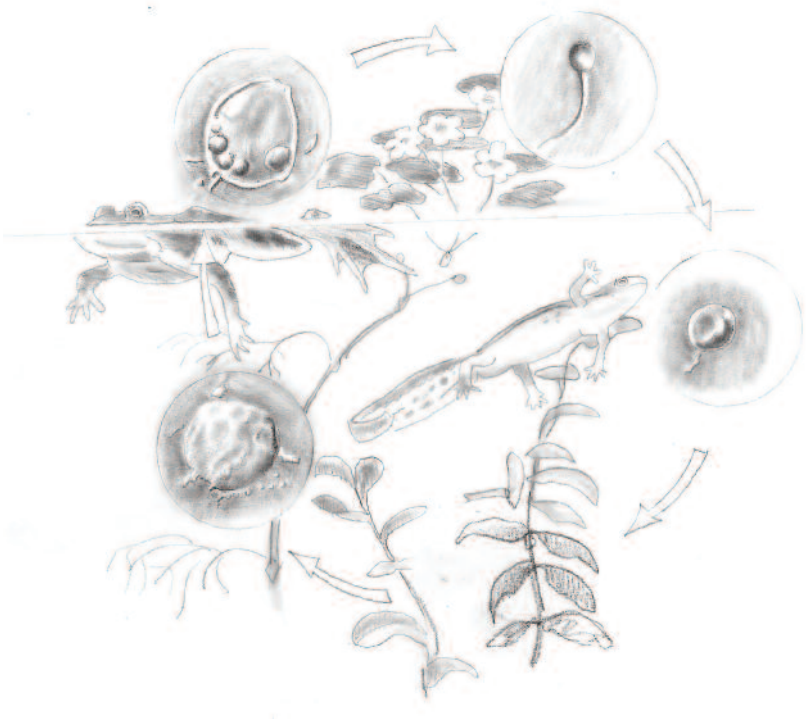
Ce programme, qui avait commencé en 2008, a profité, je dirai, d'un programme européen qui a débuté en 2009, sur la problématique de la chytridiomycose en Europe ; Nous avons donc été un des partenaires de ce programme tout en pouvant profiter d'un élan scientifique très fort autour de cette problématique de la chytridiomycose.

Je vais dans cet exposé vous décrire assez rapidement **les éléments de la biologie du champignon**, et surtout **les résultats épidémiologiques**.

Ce champignon fait partie d'une grande famille, **les chytrides**, qui sont des champignons aquatiques, dont certains sont parasites d'un seul groupe de vertébrés, les amphibiens. Le parasitisme se définit ici par un impact de l'organisme sur son hôte.

Le cycle représenté sur la diapositive correspond d'abord à une phase libre de zoospore, qui diffuse dans l'eau ; et puis très rapidement ces zoospores se fixent sur l'épiderme des amphibiens et vont développer des sporanges, c'est-à-dire se multiplier.

Sur cette coupe d'épiderme d'un amphibien on voit une inflammation, une augmentation de



l'épaisseur de l'épiderme, qui montre bien qu'il y a l'effet du champignon lié à sa multiplication. Cette inflammation va causer des modifications physiologiques : les amphibiens sont très sensibles aux échanges hydriques par l'intermédiaire de leur épiderme, et donc ces modifications peuvent, dans certains cas, causer la mortalité des individus qui sont touchés par le développement de ce champignon.

Avant la mort, les zoospores peuvent réinfecter l'individu d'origine, ou infecter d'autres individus. Chez certaines espèces, le champignon va se développer dans l'épiderme, s'alimentant sur la kératine, et ne pas provoquer d'inflammation, ni donc de mortalité. On parlera « d'espèces-réservoirs ».

Ce champignon est très spécifique, on ne le trouve que sur les amphibiens et il ne se nourrit que de leur kératine. Chez le têtard, cette kératine n'est présente qu'au niveau des pièces buccales, alors qu'au moment de la métamorphose, l'épiderme se kératinise pour avoir un épiderme qui permet la vie extérieure ; cette augmentation de la kératine va provoquer une augmentation de la ressource alimentaire pour le champignon, donc une augmentation de la densité de champignon. Pour les espèces-réservoirs, pas de dommages... Mais évidemment, pour les espèces qui sont susceptibles d'être sensibles à cette maladie – et maintenant on parlera de maladie - c'est souvent durant la métamorphose que l'on observera les grands épisodes de mortalité.

Ce champignon provoque en effet des **mortalités massives**. Cette diapositive présente une carte de répartition des mortalités observées, à peu près à jour : en Amérique du Nord, en Amérique centrale, en Europe, en Australie... Et vous trouvez assez facilement, avec un bon moteur de recherche, de nombreuses images de cas de grenouilles, ou d'autres types d'amphibiens morts, dans différents milieux.

Ici, c'est un petit peu ce qui a généré le démarrage de nombreuses études, nous sommes dans les montagnes de Sierra Nevada de Californie, avec une espèce endémique et patrimoniale, dans un endroit très, très, reculé, pour lequel l'impact des activités humaines est considéré comme nul. Il a été dit tout à l'heure qu'en effet, les amphibiens subissent des impacts très importants actuellement. On a classé par ordre d'importance la destruction des habitats, les pollutions, et puis les espèces envahissantes ; et là, au début des années 90, on observait des épisodes de mortalité importants, dans des secteurs où les causes principales de la disparition des amphibiens, les facteurs anthropiques, n'étaient pas identifiées. C'est ce qui a généré cette quantité d'études.

On dispose aussi de données historiques concernant, pour certains secteurs, la dynamique de cette invasion ; un des endroits du monde les mieux documentés, c'est l'Amérique centrale, où l'on a à la fois une observation de la propagation du champignon, des épisodes de mortalité massive, un front de colonisation en quelque sorte, et puis les épisodes de reconstitution de population, lorsque toutes les populations d'une espèce n'ont pas été décimées... Et parfois aussi des disparitions d'espèces, puisque qu'on est là dans des secteurs, des « hotspots » de biodiversité pour les amphibiens, avec de très nombreuses espèces. Or certaines espèces ont entièrement disparu de ces régions, faute d'avoir pu se reconstituer par la suite.

On va s'attacher maintenant à regarder ce qui se passe plus proche de nous, en Europe. Historiquement, la première description d'une mortalité massive associée à la présence du champignon a été liée à une découverte dans le parc de Penalara, à environ 80 km au Nord de Madrid. Là aussi, on est dans un parc national, donc un Parc où la préservation de la biodiversité est l'un des axes majeurs de l'activité, et où les activités humaines sont quasiment inexistantes. Et la présence d'observateurs a permis de documenter la disparition de presque 90% des amphibiens dans les mares où ils étaient auparavant présents ; ce sont des petites mares en milieu alpin, très faciles à échantillonner. On a parlé précédemment des

problématiques de détection, or là ce sont des zones où l'on a une très bonne connaissance de la répartition et des données historiques. On pouvait donc vraiment associer ces disparitions à un phénomène « catastrophique ».

Ces données ont été publiées un peu avant le début des années 2000, et après 2000, des mortalités, en particuliers sur des alytes, ont été observées dans les Pyrénées – on se rapproche de notre territoire – et dans les Asturies.

Pour la France, la première observation de mortalité associée à la présence de chytrides a été faite dans les Pyrénées Atlantiques et les Hautes Pyrénées, très proches en fait des mortalités d'Alytes observées dans les Pyrénées espagnoles. C'est d'ailleurs ces observations de mortalités dans les Pyrénées espagnoles qui ont généré des sorties de terrain du côté français, pour vérifier la présence de ce champignon. Et - avec pas mal de chance quand on voit la répartition de la chytridiomycose dans les Pyrénées, qui est très localisée - les premières sorties des chercheurs anglais qui travaillaient sur ce programme dans les Pyrénées françaises, ont fait qu'ils sont tombés sur les quelques lacs infestés !

Cette diapositive illustre la mortalité de juvéniles d'Alytes, au moment de la sortie de ces lacs, des photos prises en 2010 et en 2011. On est donc actuellement en phase d'observation de ces mortalités dans ces lacs.

Cette diapositive illustre **le lien entre les espèces exotiques envahissantes et la chytridiomycose** : en 2006, nos collègues anglais partenaires du programme européen, qui sont chargés de l'identification génétique des lignées de chytrides, nous ont sollicités pour identifier la présence de chytrides dans les populations de Grenouilles taureaux introduites en France. Nous leur avons envoyé des échantillons de Gironde et du Loir et Cher, et ils ont montré la présence de ce champignon chez ces espèces introduites en France, ce qui a été publié au milieu des années 2000.

On était donc, à cette époque, en présence d'événements d'introduction d'espèces exotiques envahissantes, avec des impacts de compétition, de prédation directe, ou de mobilisation de ressources dans les écosystèmes, qui ont été bien illustrés précédemment, et auxquels venait s'ajouter la suspicion d'un impact de transmission d'organismes pathogènes.

Cette problématique a été une des problématiques de la thèse de Tony Dejean : maintenant qu'on sait qu'il y a des Grenouilles taureaux en France, maintenant qu'on sait que ces Grenouilles taureaux sont porteuses d'un champignon, quel est **le potentiel de transmission de ce champignon aux espèces locales** ? Ce n'est pas une évidence que ces porteurs sains soient susceptibles de faire des contaminations croisées pour des espèces natives.

Triton alpestre

Têtard Grenouille Taureau

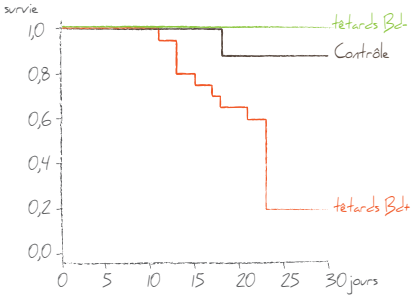
Nous avons réalisé à l'Université de Savoie toute une série d'expériences. En voilà une résumée : l'objectif était d'élever des têtards de Grenouilles taureaux, de vérifier la présence de chytrides chez ces têtards, puis de faire un protocole expérimental avec des têtards de Grenouilles taureaux « témoins » non infestés, et des têtards de Grenouilles taureaux infestés, en contact avec une espèce d'amphibiens « native », pour voir si :

• premièrement, l'espèce native, ici en l'occurrence il s'agissait de Tritons alpestres, se contaminait au contact des têtards ;

• s'il y avait une influence en termes de mortalité.

Je ne vous développe pas le protocole expérimental lui-même, mais nous avons obtenu un résultat rapide : sur cette courbe, vous avez en abscisse le temps qui s'écoule, de 0 à 30 jours, et en ordonnée le taux de survie des différents lots testés. La courbe verte correspond aux Tritons alpestres élevés seuls. Le contrôle correspondait aux Tritons alpestres exposés aux têtards de Grenouille taureau « Bd- ». Et la courbe rouge correspond aux Tritons alpestres exposés à des têtards porteurs de chytrides (Bd+). Ces Tritons qui ont été infestés ont subi une mortalité élevée, puisque 80% des tritons qui avaient été en contact avec ces têtards ont succombé. On apporte ici une preuve expérimentale de la possibilité de contamination croisée entre espèces d'amphibiens et de l'impact de cette lignée de chytrides sur l'espèce native (Triton alpestre).

Résultats contamination croisée



> Analyse de la survie des Tritons alpestres maintenus seuls dans des bacs (Contrôle), avec des têtards de Grenouilles taureaux non infectés par Bd (têtards Bd-) et avec des têtards infectés (têtards Bd+)

L'état des connaissances sur la répartition en France de la chytridiomycose était nul au début du programme. Nous avons organisé, dans le cadre de la thèse de Tony Dejean, mais aussi avec le soutien d'étudiants en stages de Master, une grande **étude épidémiologique à l'échelle de la France** afin de connaitre la répartition de ce champignon. Au cours de l'année 2010 a été réalisée l'identification des partenaires potentiels pour réaliser cette étude. Premièrement, parce nous pouvions faire un échantillonnage en Rhône-Alpes, mais pas sur toute la France. Deuxièmement, parce que les analyses de biologie moléculaire qui permettent de révéler la présence de ce champignon ont un coût relativement important et notre programme européen ne nous permettait évidemment pas de payer l'ensemble des analyses. Un gros travail d'identification des partenaires et de mobilisation financière a été réalisé.

Cette carte montre les résultats résumés de cette étude, conduite principalement en 2011 ; quelques prélèvements et résultats arrivent encore en 2012. Plus de 95 organisations ont participé à cette étude, des départements, des parcs, des réserves, etc., et même quelques entreprises privées ; ce qui nous a permis d'échantillonner 235 sites et 25 espèces différentes. Tout à l'heure, Francesco vous a dit quelques mots concernant la technique : le but est de capturer 30 individus dans un site et de réaliser des frottis cutanés à l'aide d'un écouvillon, et ensuite d'extraire l'ADN obtenu sur cet écouvillon. En passant cet écouvillon sur l'épiderme des amphibiens, s'ils sont porteurs de chytrides, on essaye de prélever des spores et des sporanges permettant ensuite d'identifier les Chytrides avec des outils moléculaires.

Donc 30 prélèvements sur 235 sites, ça fait environ 7.000 écouvillons, et comme il y a 2 PCR par écouvillon, ça fait 14.000 PCR. J'ai mis justement une illustration de ces courbes qui montrent l'augmentation de l'ADN de chytrides quand elle est présente dans un échantillon. Ce travail a été réalisé en partie par Alice VALENTINI, qui était en post-doc au laboratoire, et

surtout Nadine CRISTINA, ingénieure de recherches, qui a fait une grande partie de ces analyses en 2011.

Voilà le résultat global ; on peut utiliser deux paramètres : l'occurrence, c'est-à-dire le nombre de sites dans lesquels le champignon est détecté ; et la prévalence, c'est-à-dire au sein de chaque site, le nombre d'individus porteurs du champignon.

L'occurrence moyenne, à l'échelle de la France, est de 33%, c'est-à-dire que 33% des sites échantillonnés en France abritent le champignon. La prévalence moyenne est de 6%, avec de grandes variations, d'un individu sur 30 jusqu'à, dans certaines populations, 28 individus sur 30 porteurs de ce champignon.

Des spécialistes de l'épidémiologie sont en train d'analyser ce jeu de données afin de voir, par rapport aux théories épidémiologiques, les relations avec les paramètres anthropiques, les paramètres climatiques, les paramètres d'habitats, etc.

On peut quand même faire quelques descriptions rapides : pour des espèces à large distribution, présentes dans toute la France, il y a une occurrence de 58% chez la Grenouille verte, avec des prévalences importantes, supérieures à la moyenne, et qui peuvent aller jusqu'à plus de 50%.

En ce qui concerne **l'Alyte accoucheur**, même si là on a une répartition qui ne correspond pas à sa répartition en France, on en a quand même 21 populations échantillonnées. Cette espèce semble avoir une occurrence et une prévalence assez fortes.

Pour le Sonneur à ventre jaune, l'échantillonnage est plus régional et montre une occurrence forte. Ce résultat est à vérifier à l'échelle nationale.

On trouve également des espèces à grande répartition géographique, comme le Crapaud commun et la Grenouille rousse, ou les tritons, pour lesquelles les occurrences ou les prévalences sont très faibles. Pour le Crapaud commun, sur 48 sites échantillonnés en France, on ne trouve qu'une occurrence que de 6%. La prévalence très faible, de 1%, sur un échantillonnage de 1.229 individus !

Si on veut avoir une **espèce « sentinelle »** de la répartition de ce champignon en France, c'est une bonne stratégie que de cibler l'espèce pour laquelle on a la plus grande occurrence et la plus grande prévalence. Le groupe des Grenouilles vertes est un bon modèle pour cela. C'est aussi un bon modèle parce que c'est une espèce qui est relativement facile à capturer, et qui présente une grande aire de répartition ; c'est pour ces raisons qu'à l'avenir, nous allons proposer cette espèce comme espèce-sentinelle pour les études sur ce champignon.

Si on regarde ce qui se passe autour de nous - car il s'agit d'un **programme européen**, nos collègues travaillent aussi sur ces aspects - vous voyez qu'on trouve des résultats qui sont à peu-près équivalents en Europe occidentale. Les collègues des pays d'Europe orientale sont aussi dans la phase de collecte des échantillons, pour réaliser le même genre d'étude.

Selon les pays, on a deux approches : soit une approche qui cible une espèce - en Suisse c'est l'Alyte, tout comme en Espagne, avec des prévalences de 50 à 25% - ordres de grandeur tout-à-fait équivalents ; soit des approches sur plusieurs espèces - c'est l'approche qu'on a eue en France - pour le Royaume-Uni ou pour les Pays-Bas, où vous voyez des prévalences de 16 à 30%, valeurs proches de celles observées en France.

On se trouverait donc fin 2011 dans une situation relativement paradoxale, puisque je vous parle d'un champignon avec une occurrence importante, je vous parle de mortalités massives liées à la présence du champignon or, à ce jour, les seules observations de mortalités massives en France sont très localisées, dans 2 ou 3 lacs pyrénéens !

La résolution de ce paradoxe a fait un grand pas en avant suite à la publication, fin 2011, de l'identification génétique, c'est-à-dire du génome complet, de **différentes lignées de chytrides**. À ce jour, on sait que chez toutes les espèces d'amphibiens colonisées par ce champignon, on a bien affaire à la même espèce de chytride ; mais au sein d'une espèce considérée, il existe une diversité (on parle « d'isolats »

l'Alyte accoucheur

dans la terminologie des spécialistes des champignons), ces différents isolats ayant chacun un profil génétique différent.

Les chercheurs du laboratoire d'épidémiologie de Londres ont réussi à récupérer 20 isolats, dont 8 proviennent de populations d'amphibiens marquées par une mortalité massive. Elles proviennent d'Espagne, de France - des lacs des Pyrénées où l'on a observé des mortalités massives - d'Australie et d'Amérique du Nord, là aussi avec des observations de mortalités massives. D'autres isolats de ce champignon proviennent de pays où on n'a pas observé de mortalité : dans une autre région d'Espagne, ou en Suisse.

L'étude génomique permet de représenter les relations d'affinité génétiques entre les différents isolats. Cette figure montre l'aspect de la structuration génétique et l'aspect géographique, sur la même carte. Vous voyez un « arbre », qui permet d'identifier 3 groupes. Ici, un grand groupe où tous les individus sont en rouge ; un groupe en bleu, et un groupe en vert. Et si on regarde où sont ces groupes sur la carte mondiale, les chytrides du groupe rouge se retrouvent sur les 5 continents ; ceux du groupe bleu ne se retrouvent qu'en Afrique du Sud et en Europe ; et enfin en vert, seulement en Europe. Parmi ces 3 groupes, qu'on appelle des « clades » seulement un est associé aux épisodes de mortalités massives sur les 5 continents (notés par les petites croix). Un clade est présent seulement en Afrique du Sud et sur les îles de Majorque, et un autre en Suisse.

Je vais rapidement vous donner une explication sur la présence de ce clade à Majorque : il existe un Alyte endémique à Majorque, qui était connu comme fossile et qui a été redécouvert dans les années 90, qui vit dans des canyons et dans des grottes de ces îles ; ce sont de très petites populations à très faible effectif. Il a été proposé un programme de renforcement de populations, dans un centre d'élevage d'amphibiens situé sur l'île de Jersey.

Xénope lisse

De grandes quantités de jeunes Alytes sont réintroduits dans le milieu naturel. Il se trouve que, dans ce centre d'élevage de Jersey, sont élevés également des xénopes en provenance d'Afrique du Sud. Ces xénopes sont porteurs de chytrides. Il s'agit d'une des premières preuves expérimentales du rôle de l'homme dans l'introduction de ce champignon dans une région. La lignée de chytrides trouvée sur les Alytes de ces îles des Baléares provient des xénopes élevés sur l'île de Jersey et originaires d'Afrique du Sud...

Un résultat marquant de l'analyse de la diversité génétique des chytrides est l'existence de lignées très différentes. Nos collègues de Londres ont testé, comme vous l'avez vu dans l'expérience de contamination croisée, l'effet des différentes lignées de chytrides sur la survie de têtards, ici de Crapaud commun. La lignée provenant d'Afrique du Sud ne provoque quasiment pas, ou pas significativement (en comparaison du contrôle), de mortalité chez ces têtards. Par contre, toutes les lignées provenant des différentes parties du monde mais génétiquement proches provoquent des mortalités importantes, par exemple jusqu'à 80% de mortalité.

On a donc des lignées différentes sur l'ensemble du monde, et surtout des différences de virulence entre ces lignées. Vous voyez déjà qu'on avance dans la solution du paradoxe avec cette histoire de variabilité de la virulence entre les lignées.

Certaines lignées peuvent être trouvées partout dans le monde, alors que d'autres sont localisées (en Suisse, en Afrique du Sud). Il en existe une quatrième en Asie, identifiée par un autre groupe de chercheurs.

Ces lignées présentent **des virulences différentes**. Grâce à la connaissance complète des génomes, les collègues ont pu mettre en évidence des épisodes de recombinaisons. Les lignées hyper-virulentes sont en fait des lignées recombinées, c'est-à-dire des lignées qui proviennent d'un mélange de lignées préexistantes. Vous connaissez peut-être les problématiques des maladies émergentes, il s'agit d'un phénomène assez classique : la recombinaison de différentes grippes, aviaire ou porcine, est grave car les épisodes de recombinaisons amènent des lignées hyper-virulente pouvant avoir des impacts forts. C'est ce scénario qui serait observé pour la chytridiomycose : la maladie, sur les 5 continents où elle est observée, provient d'une lignée de chytrides virulente, cette virulence provenant de recombinaisons.

On retrouve cette même histoire pour une autre maladie émergente due à un champignon et qui touche les chauves-souris en Amérique du Nord. Ce champignon est sous une forme recombinante et ce sont des lignées du champignon qui sont présentes en Europe qui ont recombiné avec des lignées d'Amérique du Nord, provoquant les mortalités chez les chauves-souris sur ce continent.

Grace à ces analyses génétiques, on est aussi capable de dater les épisodes de recombinaison. Pour les Chytrides, la recombinaison daterait d'un intervalle qui est de 35 à 250 ans... 35-250 ans, c'est-à-dire au cours du XX^{e} siècle ! L'origine de cette recombinaison est très certainement liée aux activités humaines, en particulier aux transports, aux déplacements de xénopes et de Grenouilles taureaux, pour des raisons médicales ou alimentaires, au cours du XX^{e} siècle.

On se retrouve donc dans une situation de grande responsabilité vis-à-vis de ces maladies émergentes et en particulier dans la propagation d'espèces exotiques.

Je parle de responsabilité, je parlais de « recherche-action » tout à l'heure... Un des axes du programme européen - et aussi l'un des attendus du programme développé avec le Parc Naturel Régional du Périgord-Limousin – était de proposer des mesures de prévention. Pour les naturalistes et les professionnels des milieux naturels, il y a encore 2 ou 3 ans, il n'existait absolument aucune mesure sanitaire préconisée pour les sorties de terrain. Nous avons travaillé sur ce sujet, et proposé, en concertation avec nos collègues du programme européen, des mesures qui soient à la fois efficaces mais aussi utilisables - c'est une condition de l'efficacité – par les personnes qui vont sur le terrain. Ces mesures ont été publiées, et elles sont diffusées dans les différents pays européens - il existe des traductions dans les différentes langues. On pourra y revenir si vous avez des questions, mais ce document est très facilement accessible. Il est en ligne sur plusieurs sites et les personnels qui l'utilisent le trouvent sans aucun problème.

Vous l'aurez compris, que ce soit au niveau des maladies émergentes ou des espèces exotiques envahissantes, plus l'action est précoce et plus elle est efficace ; elle sera également d'autant moins coûteuse, que cela soit en terme d'impacts pour les écosystèmes ou en terme de budget pour contrer ces effets négatifs...

Un des autres attendus de ce programme était à la fois de **diffuser de la connaissance** sur les maladies des amphibiens, et puis d'essayer de trouver des outils pour collecter de l'information du fait des connaissances très fragmentaires sur les maladies des amphibiens.

Nous avons développé un site internet (**www.alerte-amphibien.fr**) qui permet aux acteurs de terrain de déclarer des observations de mortalité, de manière à déclencher derrière des actions (prélèvements et identification des causes de mortalité). On s'est vite rendu compte que ce site ne permettait pas seulement de déclarer des observations de mortalité, mais surtout toutes sortes d'observations de pathologies observées sur le terrain (j'ai sélectionné quelques observations sur cette diapositive). Cet outil a été développé dans le cadre de la constitution d'un réseau d'épidémio-surveillance des maladies des amphibiens. Pour la France, il existait des réseaux pour les mammifères, les oiseaux et les poissons mais pas pour les amphibiens. Nous avons eu 70 alertes en 2011-2012 sur le site, la plupart pour des observations d'amphibiens morts. Une majorité pour des infections qu'on peut penser être liées à des parasites ; mais aussi de nombreuses observations de signes cliniques, pour lesquels des vétérinaires, même des vétérinaires spécialistes de groupes proches, sont incapables d'identifier l'agent étiologique.

On a eu également, grâce à ce site, deux alertes de mortalités massives. Une mortalité de Crapauds communs dans un lac du Jura où on a pu identifier la présence de Ranavirus, qui est une autre maladie émergente des amphibiens en Europe ; le lien reste cependant à établir entre Ranavirus et mortalité observée. On nous a également signalé une mortalité importante de Crapauds calamites dans un lac de l'Aude, où nous devrions aller faire des prélèvements cette année, s'il y a encore des observations de mortalité massive.

Ce réseau d'épidémio-surveillance a été l'une des choses les plus difficiles peut-être à mettre en place, mais je pense qu'il a été mis sur de bons rails : le site est bien connu, le protocole d'hygiène est maintenant bien diffusé, et accepté – ce qui est très important. On parle de maladie, d'épidémiologie, de signes cliniques, et les professionnels de ce domaine sont les vétérinaires. Ces partenaires sont maintenant clairement identifiés, des vétérinaires travaillant par exemple sur les poissons, il y a évidemment une similitude de modèles biologiques. Ce groupe de vétérinaires va nous épauler pour animer ce réseau d'épidémio-surveillance. C'était bien le but, que ce réseau soit connu et animé par les professionnels compétents dans les différents domaines qu'il touche (écologues, épidémiologues, vétérinaires, etc.).

On en arrive à 2012. L'histoire, vous l'avez compris, n'est pas terminée. Notre premier objectif est **l'identification des lignées présentes en France**. Je vous ai dit qu'il y avait diverses lignées dans le monde ; mais la seule lignée identifiée aujourd'hui en France est la lignée observée dans les lacs pyrénéens. Il s'agit bien de la lignée hypervirulente-recombinante. Mais dans les nombreux sites où ce champignon est présent en France, on ne sait pas quelle lignée est présente. Ce qu'on peut dire aujourd'hui, c'est qu'il y existe des chytrides qui font partie de notre biodiversité. Elles sont là, elles se développent sur les amphibiens, il y a eu co-évolution avec les amphibiens qui sont capables de s'en protéger. Ce qui pose problème, c'est en particulier l'augmentation de la virulence liée à la recombinaison : la lignée produite infeste les amphibiens qui n'ont pas co-évolué avec elle, provoquant la mortalité.

Nous allons essayer d'identifier les lignées des chytrides portés par les 3 populations de Grenouilles taureaux présentes France, et des Grenouilles vertes vivant en communauté avec ces Grenouilles taureaux, pour voir s'il y a transmission entre espèces.

Un autre objectif important est de comprendre ce qui se passe avec les lacs pyrénéens : comment cette lignée hypervirulente, qu'on trouve en Australie, en Amérique du Nord, en Amérique centrale, a pu se retrouver dans ces deux ou trois lacs des Hautes-Pyrénées ? Il y a un probablement un lien avec les activités humaines, ce qui montre que ces études ont des connexions avec les sciences humaines ou sociales.

Enfin, l'animation du réseau de veille épidémiologique reste primordiale. Il faut intervenir en cas d'observation de mortalité massive, communiquer sur les bonnes pratiques sanitaires de terrain, ça c'est quelque chose qui nous tient à cœur également, puisque nos activités de naturalistes ou de scientifiques ou de professionnels de l'environnement ne sont pas anodines dans les milieux que nous fréquentons. Ces bonnes pratiques sont utiles pour lutter contre la propagation des maladies, mais aussi contre celle des espèces envahissantes : laver ses bottes quand on part d'un endroit, c'est aussi utile pour éviter de transporter des graines de toutes sortes de plantes, etc. et simple à adopter sur terrain.

J'ai rappelé sur cette dernière diapositive les différents partenaires et collaborateurs de ce programme. Je vous remercie de votre attention.

QUESTIONS

Dominique Tesseyre, Agence de l'Eau :
Vous avez parlé des prévalences, etc. Est-ce qu'on a une idée de la sensibilité des différentes espèces de batraciens de notre territoire à cette maladie ? Est-ce qu'il y a des porteurs sains dans notre faune d'amphibiens, par exemple ?

Claude Miaud : Oui, les Grenouilles vertes, sur lesquelles on a trouvé 50% de prévalence, donc des taux de présence de chytrides importants, sont des réservoirs sains, dans le sens où l'on n'a jamais, à ce jour, observé de mortalité massive de Grenouilles vertes. C'est probablement le cas pour d'autres espèces.
Nos collègues anglais, qui ont toujours travaillé jusqu'à présent avec la lignée hypervirulente, ont testé cette lignée sur différentes espèces. Et en effet, il y a des espèces qui réagissent plus ou moins. Mais c'est par rapport à la lignée hypervirulente.
On n'est plus dans ce modèle un petit peu trop simpliste du départ, où la présence de chytrides équivalait à chytridiomycose, et puis la mortalité était liée aux capacités de résistance des différentes espèces.
Maintenant, ce n'est plus du tout ça, mais plutôt : les chytrides sont des champignons de répartition cosmopolite, avec coévolution aux espèces locales... Et puis, sur certains endroits, les épisodes de mortalité massive seraient liés à une problématique de mal-adaptation à un champignon qui est différent, qui a recombiné, qui présente une virulence supérieure, et qui a donc un impact.

Les lignées de champignons très virulents paraissent très largement répandues, donc en cause par rapport aux cas de mortalité...

C. M. : Oui, la lignée hypervirulente est observée dans les endroits où l'on a observé de la mortalité. Mais c'est le seul endroit où on est allé chercher des chytrides quand l'étude sur la chytridiomycose a commencé... Au commencement, il y avait observation de mortalité massive, les chercheurs sont allés faire des prélèvements, et ils y ont identifié la lignée hypervirulente. Mais maintenant que les études épidémiologiques sont réalisées en dehors des épisodes de mortalité massive, on va trouver de nombreuses lignées, qui sont des lignées normales appartenant à la biodiversité. Les virus, les bactéries, et les champignons font partie de la biodiversité...

Véronique Barthélémy, de la DREAL Limousin :
Est-ce qu'on a prouvé l'efficacité du protocole sanitaire ? Parce qu'il me semble qu'il y a une application de 5 minutes du produit désinfectant... Ca me semble un peu léger, alors je voulais savoir si c'était prouvé.

Et est-ce qu'il y a lieu de s'inquiéter du développement des sciences participatives comme « un dragon dans mon jardin », pour la diffusion de chytrides, ou l'augmentation de la fréquence des recombinaisons ?

C. M. : Pour le premier point, concernant le test des différents produits fongicides etc, il y a eu de très nombreuses études dans le milieu médical sur l'efficacité, les différentes modalités, les temps d'application, la manière d'appliquer etc. Je dirai, sur des études « à la paillasse » : on met un champignon sur un carreau de faïence, et on teste différents produits, et on regarde en combien de temps ils tuent l'ensemble des champignons.
Dans le cadre d'études plus sur les aspects « terrain », sur les bottes par exemple, ce sont plutôt nos collègues suisses qui se sont intéressés à ce problème, et donc ils vont certainement publier très vite ce genre de résultats. Pour l'instant, les temps d'application correspondent à ce qu'on observe en milieu de type hospitalier.
C'est un peu le problème de ces protocoles d'hygiène, c'est que soit il faut les faire à fond, soit ce n'est pas la peine de les faire... Mais en termes de principe de précaution, ce qu'on avait proposé au début comme protocole était quand même relativement sévère - mais applicable – et il se trouve que c'est très efficace.

Sur votre deuxième question, l'aspect « science participative », elle revient à : « est ce que plus il y a de gens susceptibles d'être en contact, plus ça présente un risque en termes de diffusion ? ». Je dirais oui, c'est lié purement au nombre de partenaires, de participants ; plus il y a de personnes qui vont aller mettre des bottes dans les milieux naturels, des épuisettes, etc., plus il peut y avoir ce risque. Je dirais toutefois que maintenant, je suis un peu rassuré par rapport à ces aspects-là ; premièrement parce que même lors des opérations de science participative, les communications sur les aspects d'hygiène sont tout-à-fait possibles ; deuxièmement, le fait que quand même ces champignons sont des champignons normaux de notre fonge, et que les épisodes de mortalité, la localisation des lignées hypervirulentes, etc., ont l'air tout-à-fait restreints sur le territoire, cela limite quand même ces risques. Si cette occurrence de 30% de chytrides correspondait à des problèmes de virulence et de mortalité, alors là, on serait vraiment extrêmement inquiets ; c'était d'ailleurs un peu notre problème au début. Rappelons-le, les études sont parties sur le constat « présence de chytrides = risque de mortalité ». Maintenant, on sait que la présence de chytrides est « normale », mais qu'il faut être vigilant sur les mortalités observées. C'est le cas pour les Pyrénées : ce qui y est arrivé pourrait arriver ailleurs et il faut être vigilant par rapport à ça.

Matthieu Berroneau, Cistude Nature : Qu'est ce qui se passe concrètement au niveau de ces deux lacs d'altitude des Pyrénées ? Est-ce que les touristes peuvent continuer à se baigner allègrement autour de ces sites ?

C. M. : C'est une bonne question, que de savoir ce qui se passe, quelles sont les mesures mises en place, s'il y a des confinements... C'est une bonne question parce que je n'ai pas la réponse ; ces lacs sont isolés, mais il y a quand même une forte fréquentation de touristes. De la communication est faite avec, je crois, un panneau d'information pour ces aspects. Nos collègues de Londres et du laboratoire d'Ecologie expérimentale de Moulis travaillent à comprendre comment ces lacs ont été infestés.
À titre d'exemple, du côté espagnol, des mortalités massives ont été observées dans différentes mares le long de vallons, qui ont été interdits à la fréquentation humaine, avec un panneau interdisant leur accès. On n'en n'est pas là pour ces lacs pyrénéens. La réflexion est plutôt « et maintenant ? ». On sait qu'il y a cette lignée hyper-virulente, et que les populations d'amphibiens ont quasiment disparu. Se pose par exemple le problème de savoir si ce serait bien qu'ils disparaissent complètement... parce que s'il n'y a plus d'amphibiens, il n'y aura plus de champignon... Par contre, s'il reste des amphibiens, ça peut dire que c'est ceux qui sont résistants à cette lignée hyper-virulente et donc eux-mêmes potentiellement facteurs de propagation de l'infection. Un deuxième message important, c'est aussi la relation entre la densité de populations et la probabilité d'apparition d'une maladie (contaminations croisées, etc.).
Nous qui nous intéressons à la biodiversité, à la gestion de la biodiversité, dans des parcs, dans des réserves, avec l'objectif souvent d'augmenter les effectifs dans les populations... d'un point de vue épidémiologique, ça peut présenter un risque. C'est donc important d'intégrer un volet épidémiologique dans les études et la gestion de la biodiversité actuellement, parce qu'il est fort probable que la problématique des maladies émergentes ne fera que s'accentuer à l'avenir.

Mme Fabienne Renard-Laval
(Parc Naturel Régional
Périgord-Limousin)

Bilan de 6 ans de lutte sur le territoire du Parc Naturel Régional Périgord-Limousin

« En tant que responsable du pôle « gestion des espaces naturels » du Parc naturel régional Périgord-Limousin, je vais vous faire l'historique de 6 ans de mise en œuvre du programme d'éradication des Grenouilles-taureaux dans le Parc Naturel Régional Périgord-Limousin. C'est le programme que Tony Dejean avait commencé à mettre en place à l'époque où il faisait partie de notre équipe.

Pour re-situer le territoire, parce qu'aujourd'hui, on est à Limoges : le Parc est donc à cheval sur les régions Aquitaine et Limousin, au cœur d'un triangle Angoulême-Périgueux-Limoges, cela correspond à cette « tâche » en haut de cette carte de présence de la Grenouille-taureau en Aquitaine, qui nous a déjà été présentée par Cistude nature. Vous voyez que non loin, il y a un autre petit point de présence de la Grenouille-taureau qui est le secteur de Thiviers (ville-porte du Parc)

Sur le territoire du Parc, l'espèce avait donc bien été identifiée dans l'étude régionale réalisée par Cistude nature, et de mémoire localement les gens se souviennent d'avoir commencé à l'entendre ou à la voir il y a maintenant une bonne quinzaine d'années. Elle aurait été introduite par un habitant d'une petite commune du Parc, qui aurait ramené quelques individus du bassin d'Arcachon. En 2005, on avait 5 communes du Parc concernées, qui se trouvent toutes en Dordogne, et qui se répartissent en deux « noyaux » de présence qui sont séparés par une ligne de crête correspondant à un changement de bassin versant. Cela va dans le sens de ce que l'on disait tout à l'heure, sur le fait que l'espèce suit le réseau hydrographique et n'aime pas bien franchir les reliefs.

La particularité ici, outre que l'on a un climat favorable, c'est que l'on a une **situation « à risques » du point de vue hydrographique**, pour deux raisons : d'une part, les noyaux de présence de l'espèce qui ont été identifiés se trouvent sur deux têtes de bassins versants distinctes ; donc, l'espèce ayant une dynamique de colonisation vers l'aval, on avait de gros risques de contamination du reste du réseau hydrographique. Notre noyau de présence le plus à l'ouest se trouve sur la tête de bassin versant de la Charente, sachant que sur le bassin de la Charente il n'y a pas du tout de Grenouilles-taureaux identifiées ailleurs, donc en fait on avait une obligation d'intervenir pour ne pas être responsables aussi d'une contamination généralisée de ce grand bassin. Et puis le deuxième noyau, ici, sur la Dronne, soit sur le bassin versant de la Dordogne, se trouve sur un

site Natura 2000, donc avec une sensibilité naturaliste générale – cela fait un peu « désordre » d'avoir de la Grenouille-taureau sur ce secteur.

Autre facteur de risque du point de vue hydrographique, la triste particularité du territoire du Parc, qui est de compter 4.741 plans d'eau de plus de 1 000 m² sur l'ensemble du territoire - ça, c'était le recensement de 2001, et je pense même qu'on peut augmenter le chiffre aujourd'hui. La densité atteint localement 7 étangs au km² sur le bassin versant de la Doue, qui accueille l'un de nos deux noyaux de présence : on a la plus haute densité de plans d'eau du Parc, et de France même apparemment, sur ce secteur, avec des étangs « à touche-touche ». Donc, en termes de corridors, ici c'est le « paradis » pour les Grenouilles-taureaux, puisqu'elles peuvent allègrement passer d'un étang à l'autre avec de l'eau bien stagnante, bien chaude, une nourriture abondante, une pression à peu près inexistante avant la mise en place de la lutte... Nous avions vraiment une importante situation à risque.

Début 2005, nous avons été alertés par Cistude nature, à l'issue de l'étude qu'ils avaient faite à l'échelle de la région, sur ce risque et sur la nécessité de commencer à essayer d'agir sur le territoire du Parc, puisque les populations n'étaient pas encore jugées trop importantes. Donc, le Parc Périgord-Limousin s'est positionné comme secteur-pilote. Concrètement, a été lancée sur l'année 2005, en partenariat avec Cistude nature, **une étude préalable**, qui a été conduite par le biais d'un stage de fin d'études de Tony Dejean.

L'objectif était de connaître précisément la répartition de la Grenouille-taureau sur le territoire du Parc ; également de mettre au point des méthodes de lutte efficaces, puisqu'en fait les méthodes de lutte n'avaient jamais encore été réellement testées de manière complète en France ; mais aussi sensibiliser les élus et les habitants du territoire à cette espèce pour limiter les risques de dispersion – il y avait des pratiques consistant à utiliser des têtards comme appâts pour la pêche, etc, favorisant leur passage d'un étang à l'autre...

L'inventaire a été réalisé par une méthode classique, connue à l'époque : observation visuelle diurne et écoutes nocturnes, en collaboration avec les agents du Conseil Supérieur de la Pêche à l'époque (maintenant ONEMA), et Cistude Nature. Près de 600 plans d'eau ont alors été prospectés sur le territoire du Parc, et 54 pièces d'eau sont apparues occupées par l'espèce, sur nos deux noyaux de présence. Ailleurs, a priori, il n'y en avait pas et aujourd'hui, il n'y en a toujours pas : à chaque fois que nous sommes alertés à cause de la présence d'amphibiens de taille importante, il s'avère que ce n'est jamais de la Grenouille-taureau, mais juste d'imposants individus du groupe des Grenouilles vertes.

Les différentes méthodes de destruction, on va y revenir (ramassage des pontes, piégeage des têtards, tir, vidanges maîtrisées), ont été testées, avec la coopération de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, de la Direction Départementale de l'Agriculture de Dordogne (actuelle DDT), entre autres, et puis d'une association de pêche locale qui a bien collaboré.

Les résultats de l'étude de répartition réalisée en 2005, ça a été sur le secteur 1, du bassin de la Charente, 19 sites occupés (qui apparaissent tous en rouge), et puis sur le secteur 2 (le bassin de la Dronne), 35 sites occupés. Quand on dit des sites, ça peut être des étangs de taille importante, des étangs de taille plus petite, des mares ou des bassins. En l'occurrence, il y avait les bassins des anciennes pêcheries d'un gros plan d'eau, aujourd'hui à sec. Voilà, c'était la situation connue par l'inventaire « classique » au début du programme.

L'étude préalable a permis aussi d'engager une vaste campagne de communication par voie de presse, radio, réunions, puisque nous voulions vraiment sensibiliser sur les risques présentés par la présence de l'espèce, et lui donner « mauvaise presse », et puis voir s'il y avait une réceptivité des propriétaires d'étangs et des différents acteurs pour engager un programme de lutte. Cela a été le cas, puisque ce qu'il en est ressorti, c'est une attente forte des habitants du Parc et des propriétaires d'étangs pour intervenir en matière de destruction de l'espèce, et puis une volonté d'agir des différents acteurs et des élus.

Donc, la décision a été prise de mettre en place **dès 2006 une opération-pilote d'éradication** sur les 2 noyaux de présence du Parc. Cette opération-pilote d'éradication, prévue sur 2 ans (2006-2007) a été permise grâce à l'embauche au sein du Parc d'un chargé de mission « grenouille-taureau », qui était Tony Dejean. Le coût de la mission sur 2 ans se situait autour de 100 000 ¤ pour salaires, acquisition de matériels (nasses pour le piégeage, barque, armes, wadders...), etc.

On a eu un financement important et exceptionnel, il faut le signaler, de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, dont la politique, normalement, n'est pas de s'engager dans la lutte contre les espèces exotiques envahissantes. Mais Dominique Tesseyre, ici présente, a bien voulu nous suivre, considérant que la situation était encore rattrapable, et qu'effectivement, il y avait un espoir d'éradication. Ensuite, finan-

cements de l'Europe, de la Région Aquitaine et puis des deux Conseils Généraux, ainsi que de l'Etat ont pris le relais.

Les opérations de tir nocturne ont été réalisées dès 2006 et pendant plusieurs années par des agents du Conseil Supérieur de la Pêche de Dordogne, qui étaient un peu en marge de leur mission normale... Le SD 24 de l'ONEMA n'est malheureusement pas représenté aujourd'hui, mais je voulais rappeler ce gros effort de coopération (mobilisation exceptionnelle de 2 à 3 agents, 2 à 4 nuits par semaine, pendant 1 à 2 mois, et ce 4 années consécutives)

Le succès technique, c'est que dès la première année, il y a eu plus de 4 000 individus, tous stades confondus, qui ont été éliminés ; également, une communication efficace a été poursuivie, et a amené une bonne perception de l'opération, avec une forte implication des propriétaires d'étangs.

Et la suite ? Cela a été expliqué précédemment, pour des raisons de durée de développement des têtards notamment, on considère que le cycle de l'espèce dans nos régions est accompli sur 6 ans. Donc, le raisonnement « théorique », c'était que si l'on commençait une action de lutte en 2006, il fallait la maintenir pendant au moins 6 ans pour réussir à annuler la reproduction.

L'idée était d'avoir des moyens importants au démarrage, grâce à l'opération-pilote et au soutien financier de l'Agence de l'Eau les deux premières années, et puis de finaliser l'éradication ensuite par des moyens qui à l'époque n'étaient pas bien identifiés. Et donc, la question, c'était « quels moyens à partir de 2008 ? »

Nous avons effectivement dû gérer une baisse des moyens affectés à l'issue de l'opération-pilote. Notre chargé de mission, Tony Dejean, est parti faire une thèse (voir dernière intervention) et a été remplacé par quelqu'un (Sébastien Guibert) qui était en « contrat d'avenir » après un « passage de relais » dans le cadre d'un stage ; et puis, à partir de 2010, nous avons fonctionné avec des embauches spécifiques strictement estivales, de 1 ou 2 techniciens, pour coordonner le tir et organiser le piégeage. Le reste de l'année, j'assure moi-même la préparation et la suite des opérations.

L'ONEMA de Dordogne a maintenu pendant plusieurs années son intervention sur le tir, mais n'a pu le faire au-delà de 2009, puisque là on n'était plus dans les missions prioritaires. Depuis 2010, le tir est assuré par les gardes-chasse particuliers de Dordogne, qui sont représentés ici notamment par leur Président, Francis GAMBA. Je dois préciser que l'intervention des garde-chasse particuliers est totalement bénévole ; c'est-à-dire qu'au niveau de l'opération, on rembourse juste les frais de déplacement (pas toujours demandés...), on fournit le matériel, mais les gardes interviennent bénévolement. Par ailleurs, on a toujours un partenariat avec l'ONCFS pour la formation des gardes (surtout des nouveaux), au début de chaque saison aux mesures de sécurité pour le tir de nuit et pour le tir depuis une barque. Pour donner un ordre d'idée, c'est un partenariat original qui fonctionne chaque année avec un budget de 10.000 ¤ (essentiellement pour couvrir les salaires des 2 agents recrutés l'été).

Il y a essentiellement **3 méthodes de destruction** qui sont utilisées chez nous :

→ 1. le tir des individus métamorphosés

→ 2. le piégeage des têtards (dans le cas d'une très forte densité uniquement)

→ 3. le ramassage des pontes. Elles sont complétées quelques fois par des « vidanges maitrisées ». Le principe aussi est de maintenir une veille écologique sur les plans d'eau présents dans un rayon d'un kilomètre autour des sites infestés, pour éviter tout renouvellement de la population.

Ici nous sommes sur des interventions essentiellement estivales, or on a vu avec l'étude girondine, par rapport à la biologie de l'espèce, qu'en période estivale, les individus avaient une activité très réduite. En fait, sur le Périgord-Limousin, on a un climat plus froid qu'en Gironde, donc l'activité des Grenouilles-taureaux démarre plus tard, et l'été est bel et bien la bonne période pour intervenir ici. Notons au passage que le protocole d'hygiène « chytrides » est bien entendu appliqué par les équipes d'intervention.

Le tir des individus métamorphosés, c'est du tir de nuit, généralement à pied depuis la berge ou dans l'eau, ou depuis une barque pour les grands plans d'eau, avec des équipes de 2 ou 3 personnes : toujours un agent du Parc qui fait l'éclaireur, et un garde-chasse qui exécute le tir ; on utilise des carabines 5,5, et puis en équipement, des wadders et des lampes frontales.

Des exemples d'interventions, juste pour donner une idée : en 2011, il y avait 28 sites surveillés. Nous avons effectué 13 interventions sur l'ensemble des sites, et en temps d'intervention des agents, ça donne 55 heures d'interventions nocturnes au cours de l'été. Le résultat pour cette campagne 2011, en termes d'individus détruits par tir : 756 juvéniles, 31 sub-adultes, 11 mâles et 10 femelles.

Le piégeage des têtards à l'aide de nasses se fait sur un nombre limité d'étangs qui le justifient, parce que c'est quand même relativement lourd à mettre en œuvre. Une vingtaine

de nasses à simple ou double entrées sont installées régulièrement autour des étangs. Un relevé quotidien des nasses est obligatoire, notamment pour libérer les autres espèces qui se piègent : ça peut être des couleuvres, des campagnols amphibies, on a un peu tout vu... Et donc, le piégeage est prolongé jusqu'à diminution significative des prises. Des individus des autres stades sont également piégés dans les nasses : en 2011, on y a trouvé beaucoup d'adultes (venus se nourrir ?) et de juvéniles.

Un exemple de répartition entre tir et piégeage : sur cette carte, vous avez en 2011 un secteur sur lequel vous voyez apparaître en rouge entouré de jaune les étangs où du tir a été effectué, et puis, entourés de bleu, deux étangs où il y a eu du piégeage en plus du tir. Même chose sur le deuxième secteur, deux étangs ont bénéficié du piégeage en plus.

Le piégeage donne des résultats non négligeables, puisqu'en 2011, sur seulement 4 étangs, on arrive à des effectifs conséquents. Vous voyez, sur un des secteurs notamment, 667 têtards et 927 juvéniles attrapés avec les nasses. Ces résultats, rappelons-le, sont obtenus sur des sites particuliers où il y a eu des problématiques de reproduction encore récente.

Voici les résultats globaux de la campagne 2011, pour donner une idée : 2 831 individus éliminés ; vous voyez qu'il y a peu d'adultes : 12 femelles, 20 mâles ; au bout de 6 ans de pression, forcément, il ne reste plus beaucoup d'adultes. Par contre, on a toujours des effectifs élevés de têtards et juvéniles, qui peuvent être liés tout simplement au fait de rater le ramassage d'une ponte, ce qui suffit pour avoir à nouveau une « explosion » sur certains secteurs. Donc il faut être vraiment très vigilants sur ce stade là.

Le ramassage des pontes se fait suite à la surveillance des sites infestés, à raison de 2 passages par semaine entre juin et juillet. Voyez que des fois, la végétation ne facilite pas les choses... Il est procédé à une vérification de la fécondation des pontes avant l'euthanasie.

L'autre moyen d'intervention qui est important, c'est l'assistance à la vidange des étangs infestés. Cela s'est fait beaucoup en début de programme, il s'agissait pour ainsi dire d'organiser des vidanges spécifiquement pour récupérer des individus. Sinon, au niveau du Parc, on a aujourd'hui un chargé de mission « étangs » qui accompagne certains propriétaires lors des vidanges, et qui effectivement leur fait prendre des précautions quand il y a la Grenouille-taureau.

Voilà les courbes qui permettent de visualiser **l'évolution des « résultats » au cours des 6 années de notre programme de lutte.** Alors il ne faut pas regarder trop la bleue, parce que c'est elle qui est un peu inquiétante, c'est la courbe des juvéniles, liée peut-être à une pression un peu « relâchée » en 2009, avec des équipes qui « s'essoufflaient » ; et puis en 2010, on a les gardes-chasse particuliers de Dordogne qui se sont un peu passionnés pour le sujet, et en prospectant, on a retrouvé un ou deux étangs sur lesquels il n'y avait pas encore eu d'intervention, et il y a eu une grosse pression sur ces étangs-là, qui a amené les chiffres importants.

Par contre, si vous regardez les autres courbes, la rouge, la verte et la mauve, qui représentent les sub-adultes, les mâles et les femelles, on a une décroissance quand même très importante. L'échelle n'est pas très parlante à cause des effectifs juvéniles, mais on a très nettement une décroissance des effectifs des sub-adultes, mâles et femelles tués. Donc il faut qu'on réussisse maintenant à maîtriser ce stade juvénile.

Pour savoir où on en était à l'issue de cette 6e campagne de lutte et pouvoir bien orienter la campagne 2012, nous avons effectué à l'automne 2011 un **contrôle de présence de la Grenouille taureau par la technique de l'ADN environnemental**, réputée plus fiable que les écoutes-observations. Nous avons contrôlé non pas les étangs où on venait juste de faire du tir ou du piégeage, mais ceux où on n'avait rien vu en 2011, et où on suspectait une disparition de l'espèce suite à la pression de destruction.

La méthode appliquée a été d'effectuer 20 prélèvements d'eau sur chacun des 24 plans d'eau sélectionnés, répartis sur les deux secteurs. L'analyse des échantillons a été confiée à la société Spygen, et on a récupéré plutôt des bonnes nouvelles, puisque 21 des étangs qui avant avaient de la Grenouille-taureau ont été confirmés négatifs par la technique de l'ADN environnemental. Par contre, 3 sont ressortis « positifs », c'est-à-dire avec un indice de présence de Grenouille-taureau, sous une forme ou une autre. Donc sur ceux-là il va falloir être à nouveau vigilants et intervenir de nouveau cet été 2012. Pour nous, c'était plutôt réconfortant parce que tant qu'on n'avait pas les résultats, je me suis dit : « si tout est encore positif, on va se poser des questions... »

Résumé sous forme de cartes, ça donne ça : là, vous avez le secteur 1 (Piégut/Saint-Estèphe), où figurent en bleu les 30 plans d'eau qui avaient été initialement identifiés en 2005 comme ayant de la Grenouille-taureau ; après je vous fais apparaître en grisé ceux où il n'y a pas eu de campagne en 2011 parce que les études préalables par méthode classique, écoute-observation, faisaient ressortir qu'il n'y

avait plus de Grenouilles-taureaux ; en rouge, vous avez les plans d'eau où il y a de la présence avérée par tirs, puisqu'on y a tué des individus pendant l'été 2011 ; en bleu marine, absence supposée suite aux tirs, puisqu'en dépit de prospections nocturnes, aucun individu n'a été tué ; et puis en vert cerclé vous voyez apparaître un étang où il y a eu de l'ADN positif, donc il est repassé dans le camp des étangs avec Grenouilles-taureaux ; par contre en jaune vous voyez apparaître tous les sites sur lesquels il y a eu test ADNe négatif.

Si on fait le bilan sur ce secteur 1, à l'automne 2011 l'espèce ne se maintient plus que sur 10 des 30 pièces d'eau initialement occupées, et ce sans prendre en compte l'efficacité de la campagne 2011. Donc on est sur la bonne voie. *Ndlr : les résultats de la campagne 2012 sur ce secteur qui a subi un hiver très rude ont été les suivants : plus de têtards, seulement 60 individus détruits par tir, tous stades confondus (11 adultes, 44 sub-adultes, 5 juvéniles), sur 9 plans d'eau et mares.*

Même approche et mêmes légendes sur le secteur 2, de Saint-Saud/Champ-Romain, où là, on partait au départ de 35 sites occupés. Donc, pas d'intervention car pas de présence visuelle en 2011 sur les grisés ; du tir, en rouge, pendant l'été 2011 ; pas de tir car absence lors du tir sur les étangs en bleu marine ; ADN positif sur deux petits étangs et une mare, sur lesquels on va retourner en 2012 ; et en jaune les sites sur lesquels il n'y a plus de Grenouille-taureau d'après les tests ADN environnementaux. Le bilan c'est que sur ce secteur, à l'automne 2011, l'espèce ne se maintient plus que sur 11 des 35 pièces d'eau initialement occupées. Il faut être honnête, pour ce qui est des 35 pièces d'eau, on avait un chiffre un peu « gonflé », parce qu'on comptait tous les bassins des pêcheries du grand étang de Saint Saud, qui ont fait l'objet d'une vidange avec récupération suivie d'un à-sec définitif, et sur lesquels il n'y a plus de Grenouilles-taureaux. Mais cela reste un résultat bien encourageant... *Ndlr : les résultats de la campagne 2012 sur ce secteur qui a subi un hiver très rude ont été les suivants : plus de têtards, seulement 50 individus détruits par tir, tous stades confondus (10 adultes, 34 sub-adultes, 6 juvéniles), sur 5 plans d'eau de la seule commune de Champs Romain, l'espèce semblant éradiquée du territoire de Saint-Saud.*

En conclusion, on a des **points forts**, qui sont :

- des résultats d'actions concluants, avec une baisse des effectifs d'adultes sur le territoire, et une diminution nette du nombre de plans d'eau occupés.
- des partenariats efficaces et une implication forte des acteurs locaux et des propriétaires.
- c'est aussi l'occasion de diffuser des messages intéressants concernant la biodiversité et la gestion des étangs en général, on communique de manière régulière et on a des contacts de qualité avec les propriétaires, ça nous permet de faire d'autres choses.
- ce « débouché », je n'y reviendrai pas en détail ici, sur le programme de recherche concernant la chytridiomycose et l'ADN environnemental.

Les **points faibles**, parce qu'il y en a, c'est quand même des moyens humains affectés au programme qui sont non pérennes, et/ou basés sur du bénévolat. Donc, même si on est censés atteindre bientôt l'éradication, il faut continuer à fonctionner « avec les moyens du bord », des fois de manière un peu chaotique. On n'a pas d'éradication complète, vous l'avez vu, à l'issue du délai théorique de 6 ans, mais on s'y attendait quand même un peu ; notamment, sur le secteur 1, on a trouvé des étangs qui avaient de la Grenouille-taureau, qui n'avaient pas été identifiés au départ, donc on a eu une intervention qui a un peu « glissé » dans l'espace et donc dans le temps. On constate un stress de l'espèce, qui entraîne un dérèglement du cycle biologique et qui cause des reproductions précoces : il n'y a plus de gros mâles chanteurs, mais par contre on a remarqué que les individus se reproduisent plus tôt pour s'adapter à la pression de chasse. On a encore en 2011 un effectif de têtards et de juvéniles qui peut être localement très élevé, d'où l'importance de ne laisser aucune ponte. Et puis, certains sites ne sont pas entretenus, et donc difficiles d'accès, ou même impraticables. Enfin, on a un étang avec de la Grenouille-taureau dont le propriétaire a refusé catégoriquement qu'on intervienne... donc, cette année, ça va être la police de l'environnement qui va s'en occuper s'il dit toujours non.

Le problème d'accès aux étangs pour la mise en œuvre du tir, pour vous donner une idée, ce peut être des touradons de végétation le long des berges, qui sont un paradis pour les grenouilles-taureaux – c'est dangereux en plus pour se déplacer lors du tir de nuit, le Président des Gardes chasse peut en témoigner.; on a ces problématiques d'étangs totalement à l'abandon, avec des arbres morts en travers depuis la tempête de 1999 ; et puis également, la problématique du développement des espèces végétales envahissantes, notamment des jussies, qui rendent impossibles les actions de piégeage, et inefficace le tir...

Les **pistes pour la suite**, c'est de renforcer la communication pour les propriétaires d'étangs, de bien surveiller les pontes, de continuer la pression sur les juvéniles et de développer des moyens de veille pérennes. Je pense notamment qu'on a un secteur en particulier (bassin versant de la Doue = secteur 1) où on n'a toujours pas de technicien-rivière, or si on avait un technicien au quotidien, il pourrait faire de la veille. Il faut poursuivre ce programme jusqu'à l'éradication totale, car, comme on l'a dit tout à l'heure, à partir de quelques individus on peut voir une population envahissante se reconstituer ; il faudra aussi renouveler les contrôles de présence par la technique de l'ADN environnemental.

Par ailleurs, on voudrait pouvoir aider à organiser une opération similaire sur le noyau de présence de Thiviers, qui est hors Parc mais très proche, et sur lequel rien n'a été fait jusqu'à maintenant ; même si nous Parc, pour des raisons de moyens humains, financiers et d'aire de compétence, pouvons difficilement aller aussi sur ce secteur. Donc il faudrait qu'il y ait une prise en charge locale sur la durée ; on peut faire du transfert de savoir-faire au début, mais c'est à peu près tout. *Ndlr : les échanges qui ont eu lieu au cours de ce séminaire ont conduit le Parc à effectuer ce « transfert d'expérience » dès l'été 2012 vers le technicien rivière de la communauté de communes concernée, et à engager fortement la lutte sur ce noyau de présence de Thiviers, grâce à la mobilisation des garde-chasse particuliers, moins « occupés » maintenant sur le Parc. Un inventaire par écoute et observation a révélé qu'une petite trentaine de plans d'eau répartis sur 4 communes étaient occupés, parfois très fortement (plusieurs couples, plusieurs pontes par étang et localement très fortes densités de têtards). Le piégeage a été mis en place sur 8 plans d'eau. Plusieurs pontes ont été détruites, et ce sont pas moins de 14.487 individus qui ont été détruits par tir et piégeage, tous stades confondus ! (dont 7.768 têtards, 2.242 métamorphoses, 4.343 juvéniles, 64 sub-adultes, 54 mâles, 16 femelles). L'opération va devoir là aussi s'inscrire dans la durée.*

Je voulais aussi faire remarquer – parce que Claude Miaud a dit tout à l'heure que quand il n'y a plus d'amphibiens, il n'y a plus de problème de chytrides – que chez nous, s'il y avait moins d'étangs, il y aurait sans doute moins de Grenouilles taureaux. Le Parc développe depuis peu une politique d'accompagnement à la mise en à-sec prolongé ou à la suppression d'étangs, pour baisser les densités, en particulier sur le secteur 1. Après, ça veut aussi dire qu'on n'aura plus les autres amphibiens, mais il y a assez de zones humides sur le territoire ; et c'est aussi une approche importante, à terme, pour améliorer les problèmes de qualité d'eau, qui sont sérieux...

Je vous remercie pour votre attention, et je remercie nos différents chargés d'études, auteurs des différentes diapositives que j'ai utilisées.

QUESTIONS

Aurore Connet, Parc de la Brenne : J'avais juste une question sur la technique de l'ADN environnemental, et notamment sur le coût de cette action et le temps passé entre le prélèvement et le résultat...

C'est le sujet, normalement, de l'intervention suivante. Je propose qu'on réserve la question pour la reposer au terme de l'intervention de Tony. En tout cas, ce que je peux dire, c'est que c'est simple, rapide, et que c'est économiquement très abordable. Surtout par rapport au temps que représente un contrôle nocturne traditionnel, pour une fiabilité moindre.

Précision de Fabrice Chateau, directeur du PNRPL : Là où c'est surtout intéressant, je pense, c'est pour la preuve « par le négatif »

Fabienne Renard-Laval : Tony nous expliquera la méthode tout à l'heure. En attendant, nous avons un « invité surprise », qui ne figurait pas à l'ordre du jour mais a bien voulu nous faire partager une autre expérience de lutte contre la Grenouille taureau. Il s'agit de Gabriel Michelin, du Comité Départemental de Protection de la Nature du Loir et Cher, qui s'occupe, lui, de la lutte contre la Grenouille-taureau sur le seul noyau de présence français qui est hors Aquitaine, on l'a vu précédemment sur une carte, c'est-à-dire en Sologne. Gabriel nous fait le plaisir de nous faire un petit point sur leur approche.

avec l'aimable autorisation de l'auteur, Benoît Wibaux, Directeur adjoint de la délégation de Brive de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne

Gabriel MICHELIN (Comité Départemental de Protection de la Nature et de l'Environnement du Loir et Cher)

La lutte contre la grenouille-taureau en Sologne

Le programme d'éradication de la Grenouille taureau en Sologne est financé par le Pays de Grande Sologne (Leader), la Région Centre, la Direction Régionale de l'Environnement et le Conseil Général du Loir-et-Cher. Le Syndicat d'Entretien du Bassin du Beuvron assure la maitrise d'ouvrage et le Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement réalise la maîtrise d'œuvre.

« Il n'était pas prévu que je parle, mais je n'ai pas pu résister, j'ai amené une petite présentation... (rires)

La Grenouille taureau a été découverte en Sologne en 2002, son introduction daterait des années 90. Actuellement, la colonisation s'étend sur 3 communes : une partie de Neung sur Beuvron et Yvoy le Marron et essentiellement Chaumont sur Tharonne.

Nous avons alors mis en place des actions de lutte et d'éradication, sur ce territoire, et sur la base des principes déjà évoqués pour le Parc Périgord-Limousin : veille environnementale, prospection et prélèvements de pontes, tirs nocturnes, vidanges et pêches contrôlées d'étangs (pêche à la senne), qui fonctionnent très bien (avec l'accord des propriétaires), et des barrières de piégeage équipées de pots de capture.

Entre 2002 et 2011, cette campagne d'action a donné les **résultats** suivants :

- une baisse sensible des effectifs « adulte », c'est-à-dire d'un poids supérieur à 100 grammes, avec une moyenne passant de 9 à 2 adultes par site colonisé ;
- une baisse du poids moyen des adultes (pour l'anecdote, le plus gros adulte mesuré pesait 851 grammes), de 461 à 175 grammes ;
- une diminution du nombre de sites ayant eu une présence de l'espèce, de 86 à 27, accompagnée de densités de populations plus faibles. L'indice d'abondance des adultes est ainsi tombé à 0,04 chances de trouver un adulte sur un site initialement connu colonisé ;
- 102 adultes, dont 73 mâles, ont été éliminés ;
- la prospection et le prélèvement de pontes ont permis de limiter de 10 à 3 le nombre de sites où la présence de têtards était avérée.

Pendant cette campagne, nous nous sommes aussi tenus informés d'évolutions techniques telles que la **méthode de l'ADN environnemental** à partir de prélèvements d'eau, mise au point par Spygen (et détaillée plus loin).

En 2011, nous avons notamment procédé à une comparaison des méthodes classiques d'observation avec la méthode de l'ADN environnemental.

Première constatation, cette dernière nous a permis de découvrir de nouveaux sites colonisés qui avaient auparavant échappé à notre veille classique.

Par ailleurs, les analyses effectuées sur 32 sites recensés depuis le début de l'action démontrent que l'action d'éradication fonctionne, car 8 étangs colonisés en 2010 et au début de

la campagne de 2011 ne l'étaient plus à la fin de l'été.

Enfin, la méthode de l'ADN environnemental a démontré plusieurs avantages :

- elle est 2,5 fois plus rapide que la méthode traditionnelle ;
- elle s'avère 2,3 fois moins chère ;
- elle permet une détection plus fine ;
- elle peut être mise en œuvre de jour et indépendamment des conditions climatiques.

On voit, sur ces deux cartes, les apports de la méthode, qui a donc permis d'évaluer les résultats de 8 ans d'action, mais aussi de signaler des sites colonisés jusqu'alors inconnus. Un « faux-négatif » a été révélé, il s'agit d'un site colonisé mais non révélé par la méthode ADNe. Cette réponse s'explique par une eau très chargée en silice, fixant ainsi l'ADN en suspension et empêchant ainsi sa détection en laboratoire. Depuis, le protocole a évolué, pour éviter de nouveau ce problème.

Les **perspectives** pour 2012 sont :

- accentuer les actions de tir sur l'espèce ;
- renforcer la veille environnementale, en nous appuyant notamment sur l'usage de la méthode de l'ADN environnemental*, notamment sur la périphérie du secteur colonisé ;
- sensibiliser les propriétaires à la nécessité d'agir contre cette espèce invasive.

Pour conclure, on notera que, par rapport à ce que Fabienne Renard-Laval nous a présenté sur le Parc Périgord-Limousin, des approches similaires ont donné des résultats semblables.

Je vous remercie de votre attention. »

* en 2012, la méthode ADN environnemental a été utilisée sur 33 grands étangs, la présence de l'espèce a été détectée uniquement sur 2 étangs. Des actions de tirs ont pu être déclenchées, permettant l'élimination d'une femelle adulte sur l'un des deux.

(Relectures et modifications : Gabriel Michelin, Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement ; Dominique Béguin et Marcelline Charpentier, Syndicat d'Entretien du Bassin du Beuvron)

Tony Dejean
(Docteur de l'Université de Grenoble, président de la société Spygen)

Application de la méthode de l'ADN environnemental à l'inventaire de la Grenouille taureau et adaptation de l'outil ADNe à la connaissance de la biodiversité

« Je suis parti de la coordination de la lutte contre la Grenouille taureau en Périgord Limousin en tant qu'agent du Parc, pour au final développer la méthode de l'ADN environnemental dans le cadre de ma thèse avec le laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA).

Les espèces vivantes libèrent sans cesse de grande quantité d'ADN dans leur milieu de vie (de l'ADN est contenu par exemple dans l'urine et les fèces). On appelle ADN environnemental les fragments d'ADN extracellulaire qui peuvent être ainsi trouvés dans l'eau et le sol. Certains fragments peuvent porter une information suffisante pour identifier l'organisme dont provient cet ADN.

Le principe de cette nouvelle méthode est de prélever sur le site étudié des échantillons d'eau de quelques millilitres et de rechercher dans ces prélèvements des fragments d'ADN spécifiques de l'espèce cible.

L'**objectif** recherché avec le développement de cet outil moléculaire était d'optimiser la détection d'espèces rares et discrètes, afin de permettre notamment une détection précoce d'espèces exotiques envahissantes, autorisant de meilleures chances d'éradication, une baisse de l'impact de l'espèce sur l'écosystème, une baisse également du coût des actions de lutte, et enfin un amoindrissement de l'impact sur l'écosystème de ces actions de lutte.

Il existe deux grandes approches dans la mise en œuvre de l'ADN environnemental :

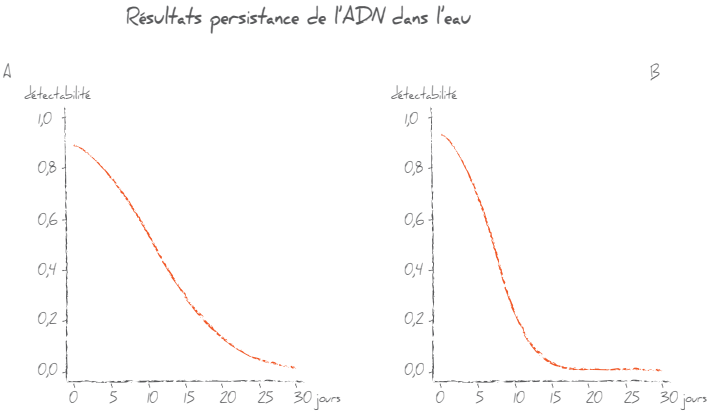
- L' « eDNA barcoding » qui permet de détecter la présence d'une espèce-cible ;
- L'« eDNA metabarcoding », qui permet de détecter simultanément plusieurs espèces appartenant à un même groupe, dans un échantillon environnemental.

Parlons du barcoding.

Pour ce qui concerne la détection de la Grenouille taureau, nous avons par exemple procédé à 3 prélèvements d'eau sur 9 plans d'eau. L'ADN a été extrait, puis amplifié avec une amorce spécifique. La présence de l'espèce cible a été révélée à l'aide d'un gel d'électrophorèse.

Cette technique a permis de détecter l'espèce, même à une très faible densité. J'ai pu m'en assurer pendant le doctorat, en m'appuyant sur un test comparatif à grande échelle (49 sites situés sur le territoire du PNRPL). L'inventaire classique révélait 7 sites colonisés par la Grenouille taureau, tandis que la méthode de l'ADN environnemental permettait d'en détecter 38. Cette méthode procure donc une meilleure détectabilité, ce qui lui permet donc de mieux contrôler l'efficacité d'un programme de lutte.

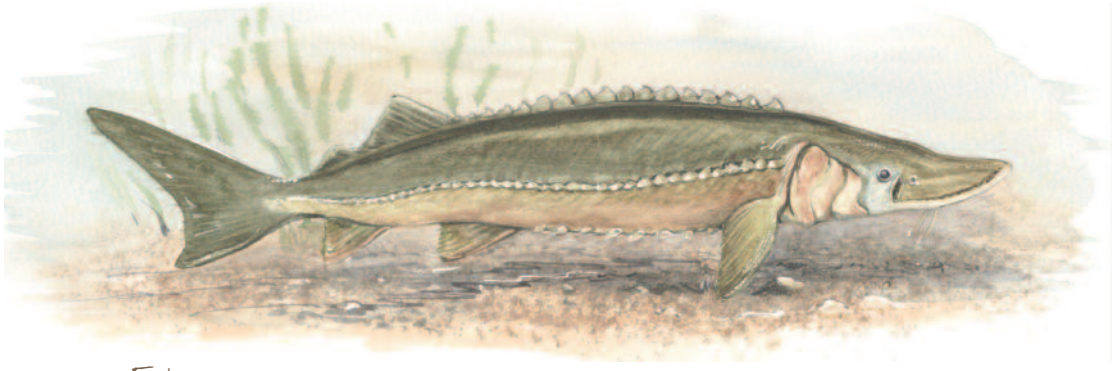
Une des clés de la validation de la méthode reposait sur la connaissance de la persistance de l'ADN en milieu aquatique. Nous avons donc effectué un test sur 30 jours avec des prélèvements quotidiens avec une espèce spécifique, l'esturgeon. Il s'est avéré que la persistance de l'ADN en milieu aquatique est relativement courte, d'une quinzaine de jours en milieu naturel.



Au début, nous avions établi qu'il fallait travailler à partir de 3 prélèvements d'eau de 15 ml. Avec l'avancée de la maîtrise de la méthode, nous avons évolué vers un nouveau protocole, basé sur 20 prélèvements de 50 ml, sur lesquels sont à nouveau prélevés 6 échantillons de 15 ml.

L'approche utilisée est particulièrement pertinente pour le suivi d'espèces menacées ou envahissantes. Elle a déjà été testée sur le Vison d'Europe, le Pélobate brun, la Loche d'étang, le Campagnol amphibie, la Cistude d'Europe, l'Ecrevisse de Louisiane, la Xénope lisse, et bien sûr la Grenouille taureau.

Écrevisse de Louisiane



Esturgeon

Maintenant, le métabarcoding.

Cette approche, en cours de développement, permet de détecter plusieurs espèces d'un même groupe à la fois, en utilisant un couple d'amorces universelles pour révéler le groupe-cible, puis en effectuant un séquençage de nouvelle génération (NGS) de l'ADN.

Cette approche peut être effectuée à partir du prélèvement de fèces pour les espèces terrestres, ou de prélèvements de sol, tout au long de l'année, pour l'identification de la biodiversité végétale.

Elle permet également un inventaire de la batrachofaune. Nous avons par exemple mené une étude comparative sur 10 sites qui a permis de détecter les mêmes espèces qu'avec un inventaire traditionnel. L'inventaire par ADNe s'est révélé plus rapide, non impactant sur l'écosystème, et sans risque d'introduction de pathogènes ou d'espèces exotiques envahissantes.

On notera, et c'est important, qu'en milieu aquatique courant, la problématique est différente, puisque l'ADN est entraîné par le courant. Dans ces conditions, un prélèvement ponctuel s'avèrerait, forcément, peu fiable. Il convient donc de procéder à un prélèvement « intégrateur », en ayant notamment recours à des protocoles de pompage et de filtration.

Parlons maintenant des perspectives de développement. Notre objectif est multiple :

- élargir le spectre vers une approche universelle pour les vertébrés en milieu aquatique, qui permettrait de mettre en place de véritables outils de veille environnementale ;
- adapter l'approche pour les macro-invertébrés (IBGN), ce qui permettrait d'augmenter la résolution d'analyse ;
- développer l'approche pour le suivi d'espèces terrestres. Cela permettrait notamment l'identification d'espèces de chiroptères grâce aux analyses d'échantillons de guano.

Merci de votre attention.

QUESTIONS

Quels sont le délai et le coût pour une analyse avec cette méthode ?

La technique est rapide, et le délai de réponse après la réception des échantillons est de moins d'un mois. Toutefois, le délai est variable pour les espèces « nouvelles », puisque ces dernières nécessitent une définition préalable de nouveaux marqueurs génétiques. Quant au tarif, il est inférieur à 100 ¤ HT, tout compris.

Pouvez vous nous préciser le ratio entre la surface du site à analyser et le nombre d'échantillons ?

Nous préconisons 20 prélèvements à l'hectare, soit en gros un prélèvement tous les 20 mètres. Mais cela dépend aussi, bien entendu, de l'espèce cible et de la typologie du site.

Comment avez-vous vérifié la spécificité des amorces ?

Nous disposons d'un panel d'outils qui nous permettent de tester nos amorces. Ce sont des procédés de bioinformatique, faisant notamment appel à des PCR virtuelles.

Qu'en est-il des espèces végétales aquatiques ?

Le protocole est en cours de développement.

Avez-vous l'exclusivité de ces tests ?

Nous avons des licences exclusives pour 5 brevets concernant des amorces universelles utilisées pour l'approche multi spécifique. Nous n'avons pas d'exclusivité sur les approches spécifiques.
De fait, le développement de la concurrence est confronté à des facteurs limitants, tels que le savoir-faire mais aussi les équipements spéciaux. En effet, un laboratoire de biologie moléculaire classique ne peut pas, en l'état actuel des choses, faire ce travail.
Cela dit, il est évident que des concurrents arriveront sur le marché, à court ou moyen terme.

Le temps imparti aux présentations étant écoulé, Fabrice Chateau et Fabienne Renard-Laval convient l'ensemble des intervenants et des participants à poursuivre leurs échanges autour d'un apéritif convivial.

Merci aux intervenants pour la relecture de leurs interventions

Coordination/Relecture :
Fabienne Renard-Laval,
Julie Demeuldre

Conception graphique
et mise en page : terre-lune*

Illustrations : Philippe Vanardois

Impression : Rivet Presse Édition

Ce projet est cofinancé par L'Union européenne. L'Europe s'engage en Aquitaine et en Limousin avec le Fonds Européen de Développement Régional.