



**BUFO**

## Prévalence et identification génétique d'un champignon parasite des Amphibiens dans l'herpétofaune d'Alsace

Rédaction : Claude Miaud<sup>1</sup> et Claudine Montgelard<sup>1</sup>

24/03/2015

Avec le soutien financier de :

Conseil Général



Haut-Rhin



---

<sup>1</sup> UMR 5175 CEFE, Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive, Biogéographie et écologie des vertébrés, campus du CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier

## 1. État des connaissances :

### 1.1. *Chytridiomycose et déclin des amphibiens :*

Depuis plusieurs années, les populations de nombreuses espèces d'Amphibiens disparaissent dans le monde (Houlahan *et al.*, 2000 ; Gascon, 2007). Parmi les nombreux facteurs affectant les Amphibiens (perte d'habitat, pollutions, espèces envahissantes,...) un champignon d'eau douce (Règne Fongi, Classe des Chytridiomycètes et Ordre des Rhizophydiales) appelé *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd* dans la suite du texte), provoque des mycoses mortelles chez de nombreuses espèces (Berger *et al.*, 1998). Les effets de *Bd* ont été particulièrement dramatiques en Amérique Centrale comme dans les forêts du Costa Rica où les deux tiers des 110 espèces de grenouilles arlequins (du Genre *Atelopus*) auraient disparu dans les années 1980 et 1990. Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer l'émergence de *B. dendrobatidis* au cours des dernières années :

La première est une introduction récente dans de nouvelles aires géographiques, notamment par le biais d'introductions d'espèces exotiques (Daszak *et al.*, 2003). En effet, celles-ci peuvent transmettre aux espèces sympatriques<sup>2</sup> des agents pathogènes mortels comme c'est le cas avec la peste de l'écrevisse ou encore le virus de la maladie aléoutienne<sup>3</sup> du Vison. Weldon *et al.* (2004) proposent le Xénope commun (*Xenopus laevis*) comme vecteur potentiel de transmission inter continent. En effet, *Bd* est très présent dans les populations africaines de Xénope commun, sans toutefois provoquer de morbidité évidente. Le commerce de cette espèce, couramment utilisée en laboratoire et déplacée d'un continent à l'autre, pourrait expliquer en partie l'expansion rapide de ce pathogène (Hansen, 1960). *Bd* infecte également la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*), mais l'infection est asymptomatique (Daszak *et al.*, 2004 ; Ouellet *et al.*, 2005). Cette espèce, introduite dans de nombreux pays du monde au cours du siècle précédent (Kupferberg, 1997), pourrait donc être également un vecteur de transmission de *Bd* (Hanselmann *et al.*, 2004). La contamination d'un amphibien autochtone (Triton alpestre) par des têtards de Grenouille taureau porteurs de *Bd* a été

---

<sup>2</sup> Espèces qui vivent dans une même aire géographique.

<sup>3</sup> Le virus de la maladie aléoutienne est appelé A.D.V. pour Aleutian Disease. Elle doit son nom au vison de couleur aléoutienne (gris-bleu), qui est porteur d'une anomalie génétique qui le rend plus sensible aux infections.

montrée expérimentalement (Miaud *et al.*, soumis). Le rôle de l'homme dans la transmission de *Bd* dans les populations d'amphibiens a été montré récemment d'une manière spectaculaire avec la contamination de l'Alyte de Majorque (*Alytes muletensis*) au cours d'un programme de renforcement de ces populations (Walker *et al.*, 2008). Une étude récente de Lips *et al.* (2008) démontre que *Bd* a été introduit en différentes régions d'Amérique Centrale et du Sud à la fin des années 1970, causant des extinctions multiples d'Amphibiens au cours des 30 dernières années. Enfin, l'étude génétique des lignées de *Bd* présentes dans les lacs de montagne de la Sierra Nevada (Californie) argumente pour un nouveau champignon pathogène (faible diversité, pas de spécificité d'hôte amphibien, faible corrélation entre génotype du fungus et localisation géographique, disparition de populations locales de grenouilles par une seule lignée génétique de fungus) avec des migrations favorisées par l'Homme (Morgan *et al.*, 2007).

Une hypothèse alternative (et non exclusive de la première) est que *Bd* est un pathogène cosmopolite et que des changements environnementaux récents auraient créé des conditions plus favorables à son développement et/ou augmenté sa pathogénicité. Un argument pour cette hypothèse est donné dans l'étude de Morgan *et al.* (2007) qui ont découvert l'existence de lignées génétiques de *Bd* diverses et recombinantes dans certains lacs. L'existence de ces lignées à long terme implique la possibilité de mécanismes de résistance (sporangies) et de dispersion rapide. En Amérique du Nord, la donnée la plus ancienne de présence de *Bd* dans les populations d'Amphibiens date de 1961 (échantillons de musées) sans information précise sur les mortalités induites par ce pathogène (Ouellet *et al.*, 2005).

Selon Pounds *et al.* (1999), les changements climatiques pourraient être à l'origine des épizooties de Chytrides observées au Costa Rica. En effet, de nombreux animaux ectothermes, dont font partie les Amphibiens, doivent régulièrement accroître leur température corporelle en s'exposant au soleil (Freed, 1980). À ces températures (30°C), de nombreux pathogènes comme *Bd* sont tués, ce qui permet à l'hôte d'échapper à l'infection (Woodhams *et al.*, 2003). *Bd* se développe entre 6 et 28 °C et meurt au delà de ces températures (Piotrowski *et al.*, 2004). Avec le réchauffement observé de l'atmosphère, l'évaporation et la capacité de l'air à retenir l'eau augmentent, favorisant la formation d'une couverture nuageuse plus importante et donc

paradoxalement faisant disparaître les oasis ensoleillées dans la forêt. Combiné à une réduction de l'hygrométrie, ce phénomène influence le comportement des Amphibiens qui resteraient plus souvent dans des niches fraîches et humides, où règnent des conditions optimales pour le développement de *Bd* (entre 17 et 23°C). L'augmentation de la température limiterait également la disponibilité en eau, incitant les Amphibiens à se rassembler dans les mêmes points d'eau, augmentant ainsi les risques de transmission du pathogène.

Les changements environnementaux pourraient également diminuer la capacité de défense des amphibiens. Ils sont capables de lutter contre de telles infections en produisant des peptides antimicrobiens (Rollins-Smith *et al.*, 2002). Cependant, des stress environnementaux (liés par exemple à une augmentation du pH) peuvent provoquer une immunosuppression et inhiber la production de ces peptides (Simmaco *et al.*, 1997, Ouellet *et al.*, 2005).

Enfin, des facteurs biotiques pourraient être mis en cause. La maladie se propage par l'intermédiaire d'une zoospore aquatique qui pénètre dans les cellules kératinisées de la peau des Amphibiens. Au bout de 10 à 18 jours, elle provoque une infection étendue sur la peau, une érosion de l'épiderme et d'occasionnelles ulcérations, fatales à l'animal (Berger *et al.* 1998). Chez les têtards, *Bd* peut également attaquer les parties buccales kératinisées, sans provoquer de mortalité apparente (Fellers *et al.*, 2001). Les zoospores ne peuvent survivre que 7 semaines en l'absence d'hôte amphibien, ce qui devrait compromettre sa survie au cours de l'hiver (Johnson & Speare, 2003 ; mais voir la remarque plus haut à propos de la possibilité de l'existence de formes de résistance, Morgan *et al.*, 2007). La persistance de *Bd* en dehors d'un hôte amphibien accroît considérablement la probabilité d'extinction de l'espèce hôte (Mitchell *et al.*, 2008). La présence d'espèces réservoirs (e.g. Grenouille taureau), avec un grand nombre de têtards présents en permanence dans l'eau (têtards hivernant dans l'eau), ou le Xénope commun, exclusivement aquatique, augmente la probabilité de contact avec la zoospore et donc la survie et la transmission de *Bd*. *Bd* est d'autre part capable de vivre de manière saprophyte sur des amphibiens morts (Longcore *et al.*, 1999).

L'avancée des connaissances épidémiologiques sur *Bd* apporte donc un tableau paradoxal, avec des régions du monde où sont observées des mortalités massives, et de nombreuses autres où *Bd* est largement répandu sans mortalité évidente<sup>4</sup>.

L'accumulation d'études de génétique de *Bd* originaires de différentes régions du monde et d'expériences d'inoculation sur de nombreuses espèces servent à avancer dans la résolution de ce paradoxe : L'équipe de Matthew Fisher de l'Imperial College de Londres a réalisé le séquençage du génome complet (24 millions de nucléotides) de 20 isolats de *Bd* collectés en Afrique du Sud, Amérique du Nord et centrale, Australie et Europe, sur 11 espèces d'amphibiens (Farrer *et al.*, 2011). Huit de ces isolats proviennent de régions du monde où des mortalités massives sont documentées. La comparaison des génomes met en évidence trois lignées très divergentes. Le premier regroupement comprend les isolats récoltés sur les cinq continents et associés à des mortalités (lignée *Bd*-GPL). L'isolat récolté en Suisse forme un autre groupe. Enfin, les isolats d'Afrique du Sud et d'Espagne (Majorque) forment le troisième groupe. Des chercheurs japonais, chinois et américains ont récemment confirmé l'existence de lignées originales infestant des espèces endémiques au Japon, en Chine et au Brésil. Des expériences d'inoculation confirment la forte virulence de la lignée *Bd*-GPL par rapport aux autres lignées identifiées. Enfin, la connaissance du génome des lignées a mis en évidence un phénomène de recombinaison (mélange de génomes) au sein de la lignée *Bd*-GPL, à une date très récente (xx<sup>e</sup> siècle, donnée revue récemment pour une date un peu plus ancienne, i.e. 200-300 ans, M. Fisher, comm. pers.).

Le scénario qui apparaît est que ce champignon parasite des amphibiens existe sous la forme de nombreuses lignées réparties sur tous les continents, avec une coévolution hôte-parasite permettant le maintien de cette interaction. Des amphibiens comme la Grenouille taureau, les grenouilles « vertes » et le Xénope lisse font l'objet depuis le xix<sup>e</sup> siècle d'un commerce intensif pour la consommation et la recherche médicale. Ces espèces, récoltées sur

---

<sup>4</sup> Un bon exemple, étudié par Benedikt Schmidt, chercheur à l'Université de Zurich, est la situation de l'Alyte accoucheur en Suisse. Cet amphibien a vu ces populations décliner de 50 % au cours des vingt-cinq dernières années, sans dégradation de leurs habitats, l'une des causes majeures de la disparition des amphibiens en Europe. *Bd* est largement répandu en Suisse, mais aucune mortalité massive n'a jamais été observée sur le terrain dans ce pays. Toutefois, les quatre jeunes Alytes métamorphosés trouvés morts à ce jour présentaient une forte charge de zoospores de *Bd*.

des marchés en Asie ou dans des fermes d'élevage, comportent souvent des charges en zoospores de *Bd* importantes. Relâchées ou échappées dans la nature, elles ont favorisé le contact avec des lignées de *Bd* préexistantes et, ainsi, l'apparition d'une lignée recombinée hyper-virulente. C'est cette lignée qui est présente dans tous les sites où des mortalités sont observées à ce jour dans le monde, incluant les lacs pyrénéens.

---

***En résumé, les données récoltées actuellement permettent de décrire la situation suivante :***

- *Bd* est un champignon parasite des amphibiens, **cosmopolite**.
  - *Bd* est un champignon parasitant quasiment **toutes les espèces d'amphibiens**.
  - *Bd* présente une **virulence variable** entre les espèces d'amphibiens.
  - *Bd* présente des lignées génétiques de virulence variable.
  - Une **lignée – Bd-GPL** – est impliquée dans de **nombreuses mortalités** de par le monde.
  - Il existe des lignées « **endémiques** », c'est-à-dire limitées à certaines zones géographiques (e.g. Brésil, Asie)
  - **Bd-GPL est observée** dans de nombreuses régions du monde mais **sans mortalité actuelle**.
  - La structure génétique de *Bd-GPL* indique un événement de **recombinaison** et une origine de cette lignée relativement **récente** (environ 200-300 ans).
  - *Bd-GPL* aurait été **introduite** dans de nombreuses régions du globe via les **activités humaines** (transport d'amphibiens).
  - *Bd-GPL* pourrait avoir provoqué des mortalités non enregistrées dans le passé.
  - *Bd-GPL* dans la plupart des régions du globe entre en **compétition** avec des lignées de *Bd* **autochtones** et les remplace (e.g. Europe, Amérique du Nord). L'absence de mortalité massive proviendrait d'une **résistance acquise** par les populations d'amphibiens exposées (survie des animaux résistants) et/ou une certaine résistance due à l'exposition passée à une lignée autochtone.
  - L'observation de mortalité massive (montagne, Amérique centrale) proviendrait de l'exposition d'animaux vivants dans des environnements relativement isolés les ayant mis peu en présence de lignées natives de *Bd*. Les **conditions environnementales** peuvent aussi influencer la **virulence** de *Bd*.
-

## **1.2. Épidémiologie de *Bd* en Europe :**

Le premier cas de déclin attribuable à la chytridiomycose en Europe a été observé en 2001 (revue dans Miaud, 2013). L'émergence de *Bd* dans des populations d'Alyte accoucheur (*Alytes obstetricans*) en 1997 dans le Parc naturel de Peñalara (Montagne de la Sierra de Guadarrama près de Madrid) a provoqué la mort de milliers de jeunes métamorphosés (Bosch *et al.*, 2001). Connu dans 30 localités du Parc, l'Alyte n'est maintenant présent que dans 2 seulement, avec des mortalités observées en cours. La mortalité de la Salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*) a été observée dans ce Parc en 2001 (Bosch & Martínez-Solano 2006), puis en 2004 pour le Crapaud commun (*Bufo bufo*) (Bosch & Martínez-Solano, 2006, Bosch & Rincón, 2008). A ce jour, *Bd* a été trouvé dans la plupart des pays Européens, sans observation de mortalité massive (Garner *et al.* 2005, 2006, Scalera *et al.* 2008 ; Ficetola *et al.*, 2011).

En 2006 une étude de la prévalence de *Bd* a été menée dans le Parc National des Pyrénées (Walker *et al.*, 2006). Parmi 19 populations d'*Alytes obstetricans* testées, 5 étaient positives pour *Bd* avec une prévalence de 0.74 (0.54 - 0.88, n = 27) par exemple dans le Lac Ansabere dans la Vallée d'Aspe. L'occurrence de la chytridiomycose dans le lac du Puits d'Arious était associée avec des mortalités d'Amphibiens métamorphosés récemment (*Alytes obstetricans* et *Salamandra salamandra*). Ces résultats sont à relier à des observations de mortalités massives d'*Alytes obstetricans* post-métamorphiques observées dans la vallée de l'Echo (versant espagnol) depuis 2003, où la population a maintenant quasiment disparu. L'étude de la prévalence de *Bd* dans le massif pyrénéen (versants français et espagnol) confirme ces épisodes de mortalité massive (D. Schmeller, comm. pers.).

En 2006, Garner *et al.* ont identifié *Bd* sur des Grenouilles taureaux capturées en Gironde et en Loir-et-Cher. Ouellet *et al.* (2012) viennent de montrer la présence de *Bd* (analyses histologiques) chez des grenouilles du complexe des Grenouilles vertes<sup>5</sup> vivant en sympatrie avec la Grenouille taureau. Cette donnée supplémentaire confirme le rôle de réservoir, et donc de disséminateur potentiel de *Bd*, que pourraient jouer ces Grenouilles vertes.

---

<sup>5</sup> Les Grenouilles vertes du genre *Pelophylax* sont rassemblées sous le nom générique de *Pelophylax* kl. du fait de leur difficulté de détermination sur le terrain. Seules les Grenouilles des Balkans *Pelophylax kurtmuelleri* et éventuellement les Grenouilles rieuses (*P. ridibundus*) sont traitées au niveau spécifique dans ce rapport.

Selon l'étude épidémiologique lancée en 2011 en France<sup>6</sup> dans le cadre du programme européen RACE<sup>7</sup>, et permise par l'implication de très nombreuses structures (Parcs nationaux et régionaux, réserves, conservatoires, départements, ONG, entreprises privées) *Bd* est présent dans toutes les régions de France, avec une occurrence globale<sup>8</sup> de 32 % et une prévalence<sup>9</sup> moyenne de 16 % dans les sites où *Bd* est observé (Miaud, 2013).

*Bd* est détecté sur la plupart des espèces (11 anoures et 7 urodèles) avec des prévalences très variées, allant de 16 % chez les grenouilles « vertes » à moins de 5 % chez la grenouille rousse, le crapaud commun et les tritons. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles observées à ce jour dans 9 autres pays d'Europe occidentale.

Du fait des connaissances acquises sur *Bd* de part le monde, on doit s'intéresser :

- aux espèces potentiellement réservoirs de *Bd* : la Grenouille taureau *Lithobates catesbeianus*, acclimatée en Gironde et en Loir-et-Cher, et la Grenouille des Balkans *Pelophylax kurtmuelleri*, acclimatée dans le Var, sont porteuse de *Bd* avec une prévalence importante. Le Xénope lisse, acclimaté dans le Centre-Ouest, présente une très faible prévalence. Les Grenouilles « vertes » forment un complexe hybridogénétique en France avec de nombreuses introductions volontaires ou involontaire d'animaux capturés dans plusieurs pays du paléarctique. Leur rôle dans la dissémination ou le maintien de *Bd* dans les populations d'amphibiens n'est pas connu.
- Il n'y a actuellement pas d'observation de mortalité massive attribuable à la chytridiomycose en France, sauf dans des lacs isolés des Pyrénées. Pour ces lacs, il faut élucider comment la lignée virulente a pu infester les amphibiens de ces sites reculés d'altitude.
- Pour le reste de la France, il faut élucider l'importance de la répartition du champignon et l'existence de différentes lignées, natives ou non, virulentes ou non. Enfin, la connaissance des causes des résistances observées (co-évolution, pré-exposition) permettra la mise en œuvre d'une prévention quand à l'exposition à d'autres lignées ou espèces de champignon (ou autres parasites pathogènes) auxquelles les populations d'amphibiens ne manqueront pas d'être exposées, comme le montre l'arrivée de *Batrachochytrium salamandrivorans* aux Pays-Bas (Martel *et al.*, 2013 ; Martel *et al.*, 2014).

---

<sup>6</sup> Plus de 300 populations échantillonnées.

<sup>7</sup> (Risk Assessment of Chytridiomycosis to European Amphibian Biodiversity ; <http://www.bd-maps.eu/>)

<sup>8</sup> Nombre de sites avec au moins un individu *Bd+* par rapport au nombre total de sites échantillonnés.

<sup>9</sup> Nombre d'individus *Bd+* par rapport au nombre d'individus par site.



## **2. Les études réalisées en Alsace :**

Le peuplement d'amphibiens est composé de 18 espèces dans la région. Il se compose de 5 espèces d'urodèles, et de 13 espèces d'anoures. Parmi elles se trouvent les espèces les plus rares et menacées de France (Comité français de l'UICN, 2009), à savoir la Grenouille des champs, le Pélobate brun et le Crapaud vert. Le Crapaud accoucheur est rare et localisé en Alsace, et nous avons vu plus haut que cette espèce est la cible de mortalité causée par *Bd* en France continentale (Pyrénées). Une autre espèce concernée par la mortalité causée par *Bd* en France, la Salamandre tachetée, fait partie du peuplement d'amphibiens d'Alsace, et se rencontre principalement dans les forêts des Vosges ainsi que dans l'ouest du massif de Haguenau.

La découverte de l'espèce de Chytride *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel *et al.*, 2014) hautement virulente pour la Salamandre tachetée aux Pays-Bas et en Belgique est maintenant une forte préoccupation dans cette région. Les premières analyses réalisées en France sur la présence potentielle de ce nouveau pathogène sont réalisées en Alsace.

L'association BUFO et le Laboratoire LECA de l'Université de Savoie ont réalisé une étude sur la prévalence du *Bd* chez les amphibiens d'Alsace entre 2009 et 2013, dont les résultats résumés sont donnés ci-dessous (Vacher *et al.*, 2013) :

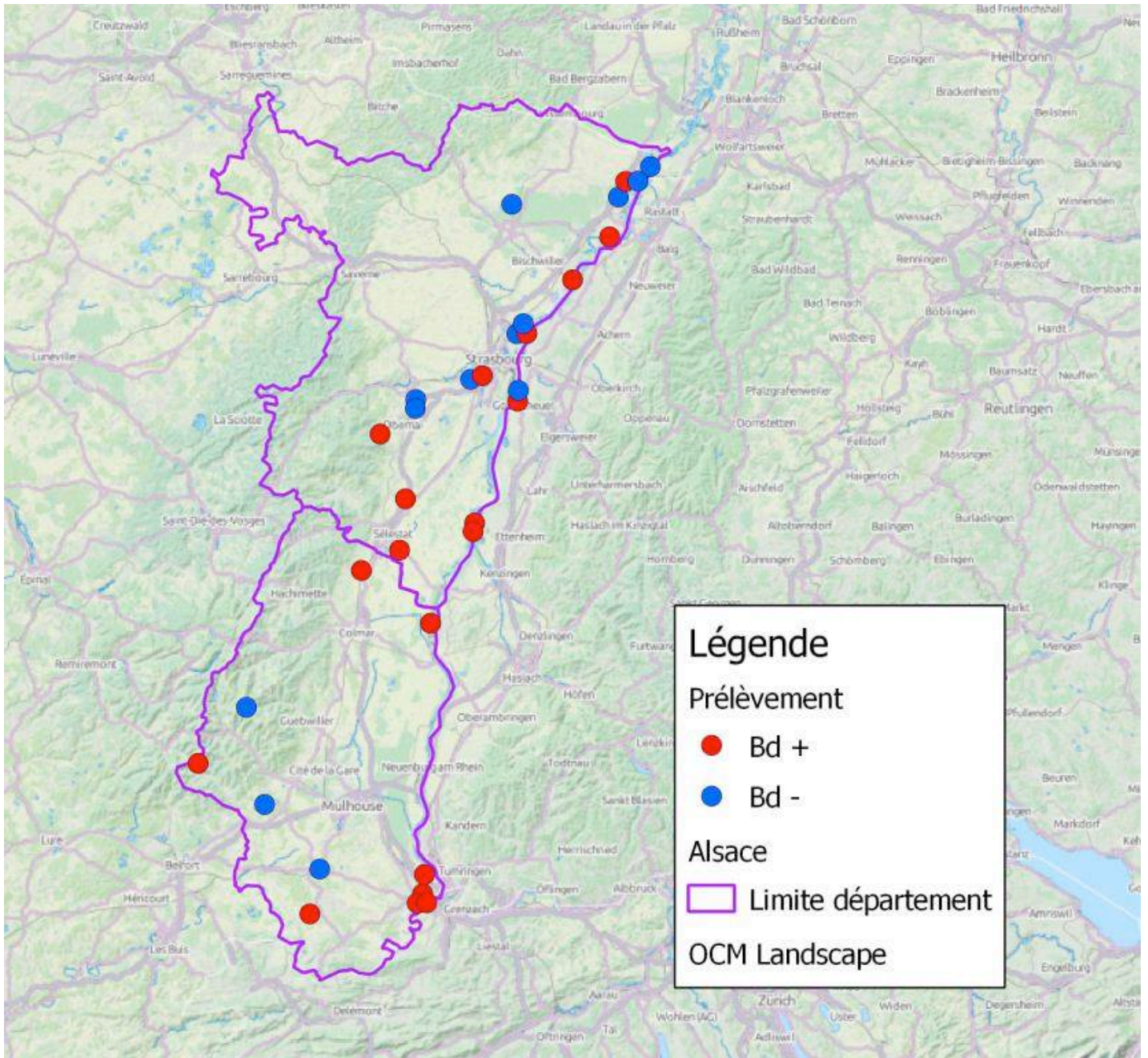
### **2.1 Prévalence de *Bd* :**

De 2009 à 2013, 33 sites aquatiques ont été échantillonnés en Alsace (23 dans le Bas-Rhin et 10 dans le Haut-Rhin), 12 anoures et trois urodèles ont fait l'objet de frottis cutanés, soit 15 des 18 espèces d'Alsace, pour un total de plus de 750 échantillons (Tableau 1a et figure 1).

Chez les Anoures, 5 espèces sont trouvées porteuses de *Bd* : les Grenouilles « vertes », Le Sonneur à ventre jaune, l'Alyte accoucheur, la Grenouille des champs, et la Rainette verte.

*Bd* a été détecté dans les 8 populations de Grenouilles « vertes » échantillonnées (occurrence = 100 %), et dans 4 des 6 populations de Sonneur à ventre jaune (66 %). Le nombre de populations échantillonnées ne permet pas d'estimer cette occurrence chez les autres espèces.

La prévalence la plus forte observée est dans une population de Sonneur à ventre jaune (70 %). Elle est de 50, 31 et 3 % dans trois autres populations de cette espèce.



**Figure 1** : Répartition de *Batrachochytrium dendrobatidis* en Alsace

Chez les Grenouilles « vertes », cette prévalence varie de 53 à 13 %. La Rainette verte présente une prévalence relativement faible (7 %).

Le Crapaud vert, le Crapaud calamite, le Crapaud commun, la Grenouille agile et la Grenouille rousse ne présentent pas de chytride sur leur épiderme.

**Tableau 1a:** Prévalence de *Bd* chez les amphibiens d'Alsace.

Espèces	Bas-Rhin				Haut-Rhin			
	67	67	67	67	68	68	68	68
<b>Anoures</b>								
<i>Pelophylax kl</i>	10/30	7/30	4/31	11/29	10/34	8/15	6/14	11/30
<i>Bombina variegata</i>	1/30	0/30	21/30	15/30	0/12	8/26		
<i>Alytes obstetricans</i>	-	-	-		1/4	-		
<i>Pelobates fuscus</i>	0/6	0/2	-		-	-		
<i>Bufo viridis</i>	0/30	-	-		-	-		
<i>Bufo calamita</i>	0/19	0/12	-		-	-		
<i>Bufo bufo</i>	0/30	-	-		-	-		
<i>Rana arvalis</i>	1/2	-	-		-	-		
<i>Rana dalmatina</i>	0/30	-	-		-	-		
<i>Rana temporaria</i>	-	-	-		0/29	-		
<i>Hyla arborea</i>	2/30	-	-		-	-		
<b>Urodèles</b>								
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	1/10	-			1/30	1/11		
<i>Triturus cristatus</i>	0/11	0/30			-	-		
<i>Lissotriton vulgaris</i>	0/9	2/30			-	-		

Les effectifs chez l'Alyte accoucheur (N = 4), le Pélobate brun (N = 8) et la Grenouille des champs (N = 2) ne permettent pas d'estimer une prévalence.

Chez les Urodèles, 2 des 3 espèces sont porteuses de *Bd* : le triton alpestre et le triton ponctué. L'occurrence est de 100 % (N = 3) chez le triton alpestre.

La prévalence varie de 3 à 10 % chez le triton alpestre, et elle est de 6 % chez le triton ponctué.

Le triton crêté ne présente pas de chytride dans les deux populations échantillonnées.

## 2.2. Prévalence de *Bs* :

Grâce au protocole publié fin 2013 par Blooi et al (2013), nous avons pu tester la présence de la nouvelle espèce de champignon parasite des amphibiens, le *Batrachochytrium salamandrivorans*. Cette espèce utilise préférentiellement des hôtes Urodèles (Martel et al., 2014) aussi avons-nous ciblé la Salamandre tachetée et le Triton alpestre. Pour ce dernier, nous

avons utilisé les lysats des analyses précédentes utilisées pour *Bd*. Pour les nouveaux prélèvements (*S. salamandra*), nous avons aussi testé la présence de *Bd* (Tableau 1b).

L'analyse de 11 Tritons alpestres (prélèvements de 2011) et de 95 salamandres tachetées (prélèvements de 2014) n'a pas révélé par présence de *B. salamandrivorans*.

**Tableau 1b:** Prévalence de *Bs* chez les Urodèles d'Alsace. *Bd* = *B. dendrobatidis*. ; *Bs* = *B. salamandrivorans*. Le rapport correspond au nombre d'individu positif/nombre d'individus testés.

Espèces	date de prélèvement	commune	<i>Bd</i>	<i>Bs</i>
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	24/06/2013	Ermensbach	1/11	0/11
<i>Salamandra salamandra</i>	9/02/2011	Sainte-Croix-aux-Mines	0/15	0/15
<i>Salamandra salamandra</i>	5/10/2014	Bitschwiller-lès-Thann	0/37	0/37
<i>Salamandra salamandra</i>	23/04/2014	Orschwir	0/43	0/43

### 2.3. Réseau de surveillance :

Il n'y a pas eu de déclaration de mortalités massives d'amphibiens en Alsace via le site [www.alerte-amphibien.fr](http://www.alerte-amphibien.fr) en 2012, 2013 et 2014.

### 3. Identification des lignées de *Bd* :

L'association BUFO et le Laboratoire Biogéographie et Ecologie des Vertébrés de l'UMR CEFE de Montpellier se sont associés pour réaliser l'étude sur l'identification des lignées du *Bd* chez les amphibiens d'Alsace en 2013-2014, et dont les résultats sont présentés ci-dessous :

#### 3.1 Identification des souches de *Bd* :

Les échantillons utilisés sont les lysats d'ADN qui avaient été testés positifs au Chytride par qPCR au cours des études sur la prévalence de *Bd* chez les amphibiens d'Alsace.

Le choix du marqueur génétique s'est porté sur l'ITS (Internal Transcribed Spacer). C'est un marqueur très classique des phylogénies moléculaires de champignons et de plus la majorité

des phylogénies actuelles effectuées sur *Bd* ont été faites à partir de ce marqueur (Bataille *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2012 ; Schloegel *et al.*, 2012).

La méthode de nested PCR a été utilisée pour amplifier un fragment d'ITS. Cette méthode est très efficace car elle permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la PCR. Elle consiste à faire une première amplification classique avec un couple d'amorces amplifiant un morceau plutôt large et à une température d'hybridation assez faible de sorte que l'amplification ne soit pas trop spécifique. On effectue ensuite une ré-amplification du produit PCR obtenu avec un couple d'amorces plus spécifique et à une température plus élevée. Cela a normalement pour effet d'amplifier uniquement la zone voulue. Ici, les amorces "larges" sont les couples ITS1F/ITS4 ou Bd18SF1/Bd28SR1 dont les températures d'hybridation sont de 50 et 55°C respectivement. Ces deux couples d'amorces sont assez généralistes pour s'adapter à la plupart des espèces de champignon et permettent d'obtenir par PCR un fragment d'environ 500 pb. La ré-amplification s'effectue ensuite avec le couple d'amorce Bd1a/Bd2a avec des températures de 60 ou 65°C (soit 10°C supérieures à la température d'hybridation des amorces utilisées en première amplification) et permet d'obtenir un fragment de 250 pb (Tableau 2).

**Tableau 2** : Séquences des amorces utilisées pour l'identification de *Bd*

Nom	Séquence
Bd18SF1	5'-TTTGTACACACCGCCCGTCGC-3'
Bd28SR1	5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'
Bd1a	5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3'
Bd2a	5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'
ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGCGAAGTA-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Les produits PCR ont ensuite été séquencés selon le principe de la méthode Sanger (société MWG). Les séquences sont obtenues sous forme de pics d'absorption (électrophorégramme) et la séquence a été déterminée avec le logiciel CodonCode. Lorsqu'une position présentait deux pics et que le plus faible atteignait la moitié du pic le plus haut, la base considérée a été déterminée comme ambiguë et codée selon le code IUPAC. L'alignement des séquences a été effectué avec les logiciels Seaview et Bioedit en incorporant des séquences de *Bd* du monde entier obtenues sur le site GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Une fois les séquences alignées, les haplotypes existant en France ont été déterminés. La majeure partie de la variabilité des séquences résidant dans des indels<sup>10</sup>, ceux-ci ont été codés à l'aide du logiciel FastGap afin que les logiciels d'analyses phylogénétiques puissent prendre en compte cette information sur les indels.

L'analyse des séquences a ensuite été faite suivant deux approches différentes. La première a consisté à faire un arbre de maximum de vraisemblance sur les données obtenues pour l'Alsace et la France, ainsi que sur l'ensemble des données mondiales. La seconde approche a été de construire un réseau avec le logiciel Network qui utilise le principe de maximum de parcimonie. Contrairement à l'arbre phylogénétique, le réseau met en évidence les différences génétiques existant entre les haplotypes. De la même manière, les données sont analysées à l'échelle de la France puis à l'échelle mondiale.

### **3.2 Echantillons utilisés pour la France :**

Afin de pouvoir comparer éventuellement des lignées identifiées en France, nous avons fait un sous-échantillonnage dans les prélèvements conservés au laboratoire. La liste des échantillons (lysats d'ADN obtenus positifs à la détection de *Bd* dans nos études antérieures) et utilisés pour l'analyse de l'identification des lignées (haplotypes d'ITS, cette étude) est donnée dans le tableau 3.

---

<sup>10</sup> Désigne une insertion ou une délétion dans une séquence d'acide nucléique par rapport à une séquence de référence. Mis en évidence lorsqu'on effectue des comparaisons au moyen de programmes d'alignement de séquences.



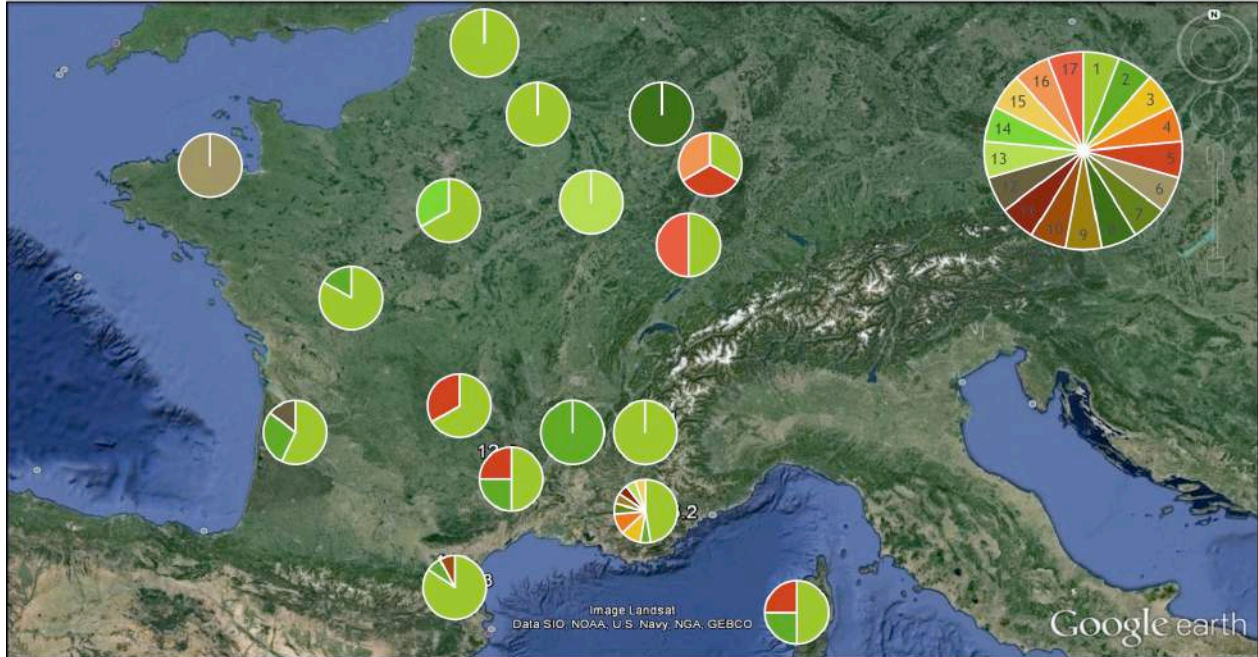
**Tableau 3 :** Échantillons disponibles (lysats avec *Bd*) et haplotypes obtenus. Les haplotypes sont marqués sous la forme NX(Y), X étant le numéro de l'haplotype et Y le nombre de séquences obtenues pour cet haplotype.

Espèce	Nombre d'échantillons Bd+	Nombre de séquences obtenus	de Haplotypes
<i>Pelophylax kl</i>	60	29	N1 (21), N2(4), N5, N12, N14(2), N16, N17
<i>Bufo bufo</i>	10	3	N1, N2, N6
<i>Lithobates catesbeianus</i>	10	0	-
<i>Triturus marmoratus</i>	1	0	-
<i>Bombina variegata</i>	2	0	-
<i>Discoglossus pictus</i>	4	3	N1(2), N10
<i>Hyla meridionalis</i>	20	7	N1(7)
<i>Bombina bombina</i>	2	1	N8
<i>Alytes obstetricans</i>	3	2	N1, N5
<i>Bufo calamita</i>	3	1	N1
<i>Pelophylax kurtmuelleri</i>	43	18	N1(7), N2, N3(2), N4(2), N7, N9, N11, N13, N15
<i>Pelophylax lessonae bergeri</i>		6	N1(4), N2, N5
<b>Total</b>	<b>158</b>	<b>70</b>	<b>17</b>

### 3.3. Identification et diversité des lignées en France :

Le protocole de séquençage a permis d'obtenir 70 séquences différentes à partir de 158 échantillons d'ADN (échantillons *Bd+* récoltés de 2009 à 2013) répartis chez 13 espèces d'Amphibiens différentes. Parmi les espèces porteuses étudiées, deux étaient introduites (*Bombina bombina* et *Pelophylax kurtmuelleri*) et 11 natives pour la France (Tableau 3). Parmi ces 70 séquences, nous avons identifié 17 haplotypes différents (i.e. des séquences qui diffèrent par au moins une base). Ces haplotypes ont une longueur variant de 164 à 221 bases (après avoir enlevé les indels).

La répartition des haplotypes est la suivante (Fig. 2 et Tableau 3) :



**Figure 2** : Distribution de la diversité des haplotypes de *Bd* en France

Les camemberts indiquent les proportions des différents haplotypes (N1 à N17) représentés suivant le code de couleur représenté en haut à droite de la carte.

Les haplotypes se distribuent :

- un haplotype unique identifié dans 11 échantillons (soit 11 haplotypes uniques),
- un haplotype (N1) identifié dans 47 échantillons,
- un haplotype (N2) identifié dans 7 échantillons,
- un haplotype (N5) identifié dans 3 échantillons
- trois haplotypes uniques (N3, N4 et N13) identifiés chacun dans 2 échantillons.

L'haplotype le plus fréquent (N1, 67 %, N = 47) est trouvé sur toutes les espèces. N2 est trouvé chez 10 % (N = 7) des échantillons. Pour les autres, les % sont < 2%.

Les amphibiens porteurs de *Bd* peuvent avoir des haplotypes différents (Tableau 3). Par exemple, les Grenouilles vertes (*Pelophylax kl.*) peuvent présenter jusqu'à 7 haplotypes différents. Des espèces comme *Bombina bombina* et *Bufo calamita* ne portent qu'un haplotype, mais les effectifs analysés sont beaucoup plus faibles et peuvent être responsables de ce résultat. C'est aussi le cas pour les espèces pour lesquelles aucune séquence n'a pu être



obtenue (Grenouille taureau *L. catesbeianus*, Triton marbré *Triturus marmoratus*, Sonneur à ventre jaune *Bombina variegata*).

### 3.4. Identification et diversité des lignées en Alsace :

La liste des échantillons (lysats d'ADN obtenus positifs à la détection de *Bd*) utilisés pour l'analyse de l'identification des lignées en Alsace est donnée dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Échantillons disponibles (lysats avec *Bd*) et haplotypes obtenus. Les haplotypes sont marqués sous la forme NX(Y), X étant le numéro de l'haplotype et Y le nombre de séquences obtenues pour cet haplotype (\* Espèce localisé en Lorraine, mais proche de l'Alsace (5 km).

	Nombre d'échantillons <i>Bd</i> +	Nombre de séquences obtenus	Département de la population	Haplotypes identifiés
<i>Pelophylax kl</i>	10	5	67	N1, N4, N5
<i>Pelophylax kl</i>	10	5	68	N1, N4
<i>Bombina variegata</i>	10	0	67	-
<i>Alytes obstetricans</i>	1	0	68	-
<i>Bombina bombina</i> *	2	1	-	N8
<i>Pelobates fuscus</i>	0	0	67	-
<i>Bufo viridis</i>	0	0	67	-
<i>Bufo calamita</i>	0	0	67	-
<i>Bufo bufo</i>	0	0	67	-
<i>Rana arvalis</i>	1	0	67	-
<i>Rana dalmatina</i>	0	0	67	-
<i>Rana temporaria</i>	0	0	68	-
<i>Hyla arborea</i>	2	0	67	-
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	1	0	67	-
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	1	0	68	
<i>Triturus cristatus</i>	0	0	67	
<i>Lissotriton vulgaris</i>	0	0	67	

\*espèce introduite en Lorraine

Nous avons obtenu des séquences pour 11 des 38 lysats d'ADN *Bd*+ testés. La ré-amplification a été bonne (10/20) à l'aide des lysats obtenus chez la Grenouille « verte ». Pour les espèces où on ne disposait que d'un ou deux lysats positifs (tableau 4), seul le *Bombina bombina* a permis d'obtenir une séquence d'ITS. Chez le Sonneur à ventre jaune où nous disposions de 10 lysats, nous n'avons pas obtenu de séquence d'ITS.

Les séquences observées en Alsace correspondent aux haplotypes les plus communs, c'est-à-dire en fréquence et dans les autres populations de France, pour les *Pelophylax* sp.. L'espèce introduite, le Sonneur à ventre de feu *Bombina bombina* porte un haplotype N8 qui lui est original : cet haplotype n'a pas été trouvé sur les 8 autres espèces d'amphibiens sur lesquels des haplotypes ont été identifiés en France (Tableau 3). Ce résultat est un argument pour le rôle des introductions (volontaires ou involontaires) de parasites et pathogènes en dehors de leur aire de répartition naturelle.

### **3.5. Arbre phylogénétique :**

Un arbre phylogénétique a été construit sur les 70 séquences françaises obtenues et en incluant les haplotypes disponibles dans Genbank (soit 170 séquences au total). L'arbre a été obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance avec le logiciel PhymI, ce qui a permis de mettre en évidence la variation qui pouvait exister au sein de *Bd* en France. On constate que les 17 haplotypes trouvés se répartissent dans 5 clades différents, les échantillons d'un même clade partageant une identité génétique entre eux supérieure à la proximité génétique des individus des autres clades (voir Figure en annexe).

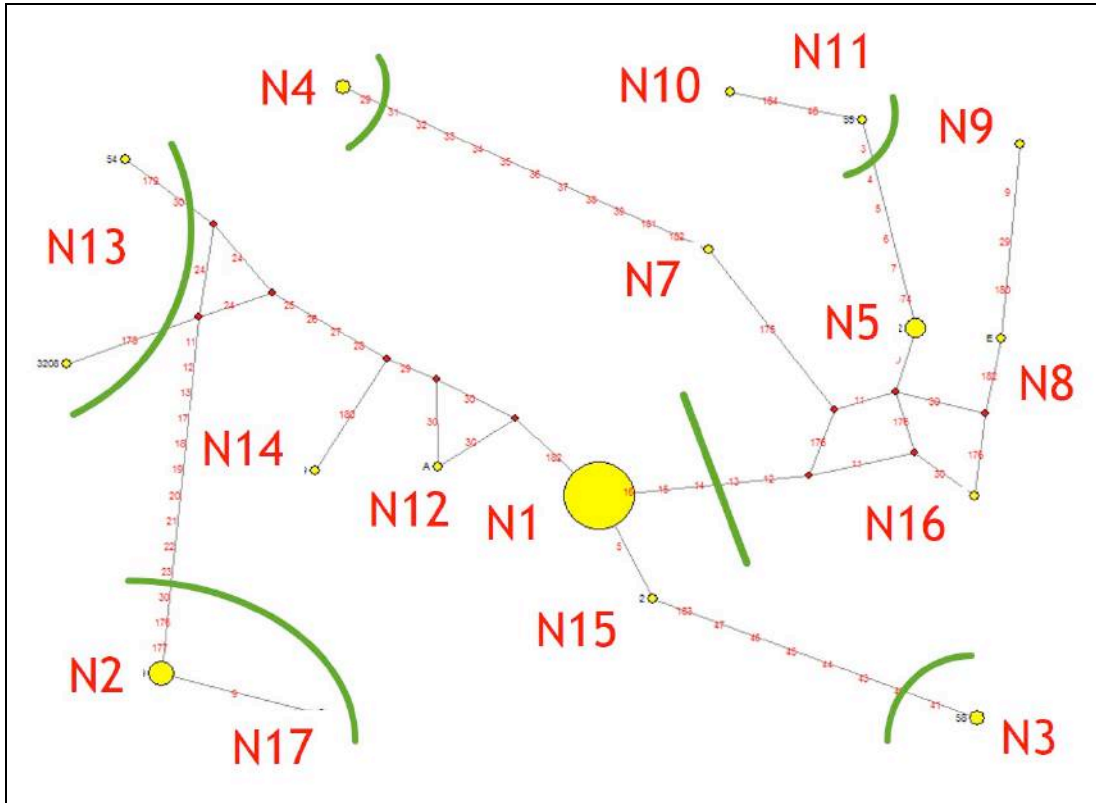
Les haplotypes portés par les G. des Balkans (N11, N13 et N15) se retrouvent dans 3 clades différents. Les haplotypes portés par la Grenouille du complexe des G. vertes *Pelophylax* kl. (N1, N2, N5, N12, N14, N16, N17) se retrouvent dans les différents clades.

Les haplotypes portés par les G. des Balkans ne sont pas trouvés portés par les grenouilles du complexe des G. vertes *Pelophylax* sp.

### **3.6. Réseau :**

Un réseau a été construit sur les mêmes données à l'aide du logiciel Network qui utilise un algorithme de distance. Le réseau obtenu (Fig. 4) donne des groupes légèrement différents de ceux trouvés précédemment. Les 17 haplotypes obtenus sont maintenant organisés en fonction des liens génétiques (nombre de bases différentes entre haplotypes, c'est-à-dire le nombre de mutations nécessaires pour passer de l'un à l'autre). La définition des groupes a été basée sur le nombre de mutations plus ou moins élevé les séparant. Avec le réseau obtenu, on considère

que 2 groupes sont différents s'ils sont séparés par au moins 8 bases différentes. On obtient ainsi les 7 groupes (Fig. 3) :



**Figure 3** : Réseau représentant les liens entre les différentes séquences de *Bd* en France. Les ronds jaunes représentent les différents haplotypes pris en compte, le diamètre du rond est proportionnel au nombre d'individus porteurs. Les points rouges représentent des haplotypes non observés et les chiffres en rouge indiquent la position des nucléotides variables.

Grâce aux données déjà publiées (Bataille *et al.* 2013, Bai *et al.* 2013, Gaertner *et al.* 2009, Gilbert *et al.* 2012, Schloegel *et al.* 2012, Tupper *et al.* 2011, Federici *et al.* 2009, Dahanukar *et al.* 2013 et Goka *et al.* 2009), il est possible d'inclure nos résultats avec les cent haplotypes différents déjà décrits, et de construire un réseau suivant la méthode décrite pour les données françaises seules. Les groupes obtenus dans ce réseau (fig. donnée en annexe) donnent une information plus géographique sur les lignées. Il est en effet possible par le biais des groupes de regarder où coexistent les lignées qui sont proches génétiquement. Comme dans le réseau

précédent, on considère que 2 groupes sont différents s'ils sont séparés par au moins 8 bases différentes.

Les 6 groupes s'individualisent avec les caractéristiques suivantes :

Les séquences obtenues en France sont restreintes à trois groupes : un groupe est constitué par les haplotypes N17, N2, N4 ainsi que par deux haplotypes non nommés présents au Japon et en Chine et définis par Gaertner *et al.* 2009 comme faisant partie de la lignée *Bd*-GPL. Parmi ce groupe trois haplotypes décrits pour la France existaient déjà alors que deux sont nouveaux. Un groupe est constitué autour de l'haplotype le plus commun N1. Il contient également, entre autres, les haplotypes N3 et N16. Ces haplotypes constitueraient les différentes variations de lignées existantes à partir de N1. Un troisième groupe, celui encadré par les individus n° 6321 et 10JN87, contient l'ensemble des haplotypes restants découverts en France. Les haplotypes de ce groupe sont tous partagés avec ceux découverts en Chine et au Japon au cours des études menées par Bai *et al.* (2012) et Bataille *et al.* (2013).

Enfin, trois groupes ne partagent aucun haplotype avec la France. Il existe donc une grande diversité haplotypique dans le monde, et la France présente un échantillon de cette diversité avec ses caractéristiques propres : parmi les 17 haplotypes décrits en France, 4 n'ont pas été décrits dans le reste du monde.

Au niveau de la répartition géographique, on constate que les haplotypes les plus répandus (N1, N2 et N5) sont présents dans toute la France et ont donc des aires de répartition chevauchantes.

#### **4. Conclusions**

Cette étude a permis d'apporter des connaissances de base (prévalence, diversité génétique) d'un parasite des amphibiens potentiellement responsable de mortalité chez les amphibiens de France.

En Alsace, cette étude complète les données accumulées au cours des dernières années sur la présence de ce champignon (Vacher *et al.* 2013), en identifiant les haplotypes d'un marqueur génétique classiquement utilisé en phylogénie des champignons. Les haplotypes rencontrés en Alsace sont aussi trouvés dans le reste de la France, portés par les Grenouilles

« vertes ». Même s'il existe maintenant un consensus chez les spécialistes de la génétique des Champignons parasites et de *Bd* en particulier pour dire que ces marqueurs ITS sont très variables et apportent une information phylogénétique confuse (M. Fischer, comm. pers.), les haplotypes rencontrés en Alsace sont connus dans des régions où la lignée identifiée est *Bd*-GPL (Gaertner *et al.* 2009).

D'autre part, une étude récente (K. Smith, 2015) avait pour objectif de recherche une lignée supposée native de Suisse, *Bd*-CH, identifiée chez un têtard d'Alyte accoucheur trouvé près de Zurich (Farrer *et al.* 2011). Avec 112 échantillons récoltés dans 10 sites connus *Bd*+, Smith (2015) a trouvé une prévalence de 43 %. Cependant, aucun des prélèvements n'a permis de retrouver *Bd*-CH. Les haplotypes d'ITS obtenus sont similaires à ceux obtenus pour *Bd*-GPL par (Gaertner *et al.* 2009), et Smith (2015) conclut que c'est *Bd*-GPL qui est présent en Suisse.

Les haplotypes trouvés en Alsace sont similaires à ceux trouvés en Suisse. Bien que nous n'ayons pas fait la démonstration directe de la présence de *Bd*-GPL en Alsace (par exemple avec le séquençage complet d'une lignée), les haplotypes observés (similaires à ceux de Suisse les attribuant à la lignée *Bd*-GPL), nous amènent à conclure que c'est la lignée *Bd*-GPL qui est observée en Alsace.

L'absence de mortalité massive d'amphibiens en Alsace malgré l'existence de plusieurs espèces porteuses de ce champignon accreditte l'hypothèse de la présence d'une lignée non (ou faiblement) virulente en Alsace, comme dans le reste de la France (à l'exception des lacs pyrénéens). Ce constat est valable pour la plupart des pays d'Europe de l'Ouest où *Bd* a été recherché (Louca *et al.* 2014 ; Balaz *et al.* 2014).

Pour l'ensemble de ces pays, incluant donc la France et la situation de l'Alsace, il apparaît que la lignée dite *Bd*-GPL est la plus répandue. Il existe toujours l'hypothèse de lignées autochtones encore présentes mais pas détectées ou identifiées :

- Il est possible qu'une lignée native échappe à l'échantillonnage (dans le secteur ou sur une espèce) où elle est présente. L'effort d'échantillonnage consenti en France et en Alsace a cependant été conséquent et a couvert l'ensemble du peuplement herpétologique. Il est possible que la prévalence ou la charge infectante de cette lignée native soient très faibles, échappant ainsi aussi à la détection.

- Une autre possibilité, exposée par Smith (2015) lors de la non redécouverte de la lignée *Bd-CH*, est que *Bd-GPL*, relativement nouvellement introduite, soit entrée en compétition avec *Bd-CH* et la remplace maintenant.

Pour l'Alsace, on pourrait être maintenant dans cette situation où la lignée *Bd-GPL* a remplacé une (des) lignée(s) natives, comme proposé par Schloegel *et al.* (2012).

L'analyse de Salamandres tachetées de deux populations d'Alsace (Bitschwiller-lès-Thann et Orschwhir) n'a pas révélé la présence de *B. salamandrivorans*.

---

**En résumé :**

- La **prévalence de *Bd*** chez les amphibiens d'Alsace est **similaire** à celle observée pour le reste de la France (et l'Europe de l'Ouest).

- La **lignée de *Bd* observée en Alsace est *Bd-GPL***. Son arrivée serait récente (max 300 ans). Cela n'exclut pas la présence possible d'une(de) lignée(s) autochtone(s).

- La **répartition actuelle de *Bd-GPL*** s'expliquerait par sa **compétitivité** par rapport à une (des) lignée(s) autochtone(s) qu'elle aurait remplacée.

- La **lignée *Bd-GPL*** ne présente **pas en Alsace l'hyper-virulence observée** dans d'autres régions du monde, et dans quelques lacs pyrénéens : Il n'y a **pas d'épisodes de mortalité massive** attribuée à ce champignon et observée actuellement.

- Cette absence de virulence pourrait provenir d'une **prédisposition des amphibiens d'Alsace** à résister à ce parasite, du fait de **leur exposition historique** à ces champignons (lignée native ancienne).

- La mortalité provoquée par un pathogène peut s'exprimer autrement qu'une mortalité massive. Ces mortalités sont observées dans les sites aquatiques où les animaux se rassemblent et sont exposés au champignon. Les amphibiens y réalisent leur métamorphose, une phase critique où le champignon potentiellement pathogène provoque la mortalité. Mais les adultes peuvent mourir quelques jours plus tard après avoir quitté le site aquatique et échapper ainsi à l'observation. Enfin, une synergie de facteurs (climatiques, pollution, etc.) peut provoquer la mortalité des amphibiens en présence d'une lignée de champignon même hypo-virulente.

- ***B. salamandrivorans* n'a pas à ce jour été détecté en Alsace.**

---

## 5. Perspectives :

L'étude épidémiologique présentée ici avait pour origine une inquiétude de la communauté scientifique et des gestionnaires de l'environnement (et plus généralement des naturalistes amateurs et professionnels) vis-à-vis de l'émergence d'une maladie chez les amphibiens, la chytridiomycose. Les chercheurs et gestionnaires rapportaient des épisodes de mortalités massives comme celle sur les Alytes accoucheurs dans les Pyrénées (Annexe).

La mobilisation, soutenue par l'Europe (Programme Biodiversa « RACE ») ou des Régions comme l'Alsace (cette étude) a permis d'apporter des réponses importantes :

- Le champignon est **réparti largement en France**, avec des prévalences très variables entre les espèces.
- Les données obtenues en **Alsace confirment la situation observée** à l'échelle nationale.
- Le champignon est représenté en France par la lignée **Bd-GPL**.
- La lignée *Bd-GPL* n'est **pas virulente** dans l'ensemble des sites où elle est identifiée en France, à l'exception de 4 lacs pyrénéens très localisés.
- Cette lignée a colonisé toutes les populations suite à son introduction aux XVIII<sup>e</sup>-XIX<sup>e</sup> siècles, en éliminant probablement les lignées natives du champignon.
- La **virulence** du champignon peut dépendre de **conditions environnementales**, en particulier d'autres facteurs de stress ou d'activation du système immunitaire.

Le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis* **ne constitue donc pas la menace** pour la **batrachofaune alsacienne** que les premières années d'observations de la décennie 1990-2000 pouvaient laisser croire. Cependant, les études réalisées et en particulier la mise en place d'un réseau d'épidémio-surveillance sont des outils particulièrement utiles pour les temps à venir :

Le nouveau champignon *Batrachochytrium salamandrivorans* - très virulent pour la Salamandre tachetée et les tritons (Martel *et al.* 2014) - correspond à une maladie émergente. Contrairement à *Bd*, son histoire est connue quasiment simultanément à sa découverte : ce champignon est une espèce commune d'Asie, qui ne provoque pas de mortalité massive dans cette région du monde. Par contre, il est très virulent pour les salamandridés du reste du monde

(Vieux et Nouveau-Monde). Sa présence aux Pays-Bas s'explique par une introduction lors de relâchés dans la nature de salamandres d'origine asiatique utilisées en terrariophilie (Martel *et al.* 2014). Nous n'avons actuellement pas détecté ce champignon dans les deux populations de Salamandre tachetée échantillonnées en 2014. Nous espérons que l'étude réalisée en Alsace aura permis de mettre en place une information auprès de l'ensemble des acteurs de l'environnement et les outils pour la détection précoce de l'arrivée (probable) de ce pathogène sur notre territoire.

Des actions sont actuellement menées auprès de la Commission Européenne en faveur d'une meilleure prise en compte de la dimension épidémiologique pour la protection de la faune européenne, telle que des précautions sanitaires lors de l'importation d'amphibiens pour l'alimentation et l'aquariophilie de loisirs, ainsi que dans les élevages à des fins scientifiques.

Enfin, ce travail a également permis de préconiser et de faire accepter par les opérateurs de terrain, l'application systématique de protocoles de terrain (inventaires, suivis de populations, etc.) comportant des précautions sanitaires standards (Miaud, 2014, voir Annexe).



## 6. Références bibliographiques :

- Bai C, Liu X, Fisher MC, Garner TWJ, Li Y (2012) Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China. *Diversity and Distributions* 18:307-318.
- Balaz V, Voros J, Civis P, Vojar J, Hettzey A, Sos E et al. (2014) Assessing risk and guidance on monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through identification of taxonomic selectivity of infection. *Conservation Biology* 28(1):214-222
- Berger, L, et al. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9031-9036.
- M. Blooi, F. Pasmans, J. E. Longcore, A. Spitzen-van der Sluijs, F. Vercammen and A. Martel, 2013 - Simultaneous Detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* and *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibian Samples. *J. Clin. Microbiol.* 51(12): 4173.
- Bosch, J & Martinez-Solano, I. 2006 Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Penalara Natural Park (Central Spain). *Oryx* 40: 84–89.
- Bosch, J, Martinez-Solano, I & Garcia-Paris, M. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of Central Spain. *Biol. Conserv.* 97: 331–337.
- Bosch, J, Rincón, PA. 2008. Chytridiomycosis-mediated expansion of *Bufo bufo* in a montane area of Central Spain: an indirect effect of the disease. *Diversity and Distributions* 14: 637-643.
- Bovero, S, Sotgiu, G, Angelini, C, Doglio, S, Gazzaniga, E, Cunningham, AA, Garner, TWJ. 2008. Detection of chytridiomycosis caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the endangered Sardinian newt *Euproctus platycephalus* in Southern Sardinia, Italy. *Journal of Wildlife Diseases* 44: 712-715.
- Brem, F., J. R. Mendelson III, and K. R. Lips. 2007. Field-Sampling Protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* from Living Amphibians, using Alcohol Preserved Swabs. Version 1.0 (18 July 2007). Electronic document accessible at <http://www.amphibians.org> Conservation International, Arlington, Virginia, USA.
- Carey, C, Bradford, DF, Brunner, JL, Collins, JP, Davidson, EW, Longcore, JE, Ouellet, M., Pessier, AP & Schock, DM. 2003. Biotic factors in amphibian population declines. Pages 153–208 in G. Linder, S. K. Krest, and D. W. Sparling, editors. *Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressor effects*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, Florida.
- Dahanukar N, Krutha K, Paingankar MS, Padhye AD, Modak N, Molur S (2013) Endemic Asian chytrid strain infection in threatened and endemic anurans of northern western Ghats, India. *PLoS ONE* 8(10)

- Daszak, P, Cunningham, AA & Hyatt, AD. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9: 141-150.
- Daszak, P, Strieby, A, Cunningham, AA, Longcore, JE, Brown, CC & Porter, D. 2004. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Journal of Herpetology* 14: 201-207.
- Dejean, T, Miaud, C, & Ouellet M. 2007. Proposition d'un protocole d'hygiène pour réduire les risques de dissémination d'agents infectieux et parasitaires chez les amphibiens lors d'intervention sur le terrain, *Bulletin de la Société herpétologique de France* 122: 40-48.
- Dejean T., Miaud C., Ouellet M., 2010 - La chytridiomycose : une maladie émergente des amphibiens. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, 134: 27-46.
- Fellers, GM, Green, DE & Longcore, JE. 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia* 2001: 945-953.
- Fouquet, A. 2001. Des clandestins aquatiques. *Zamenis* 6: 10-11.
- Freed, AN. 1980. An adaptative advantage of basking behavior in an anuran amphibian. *Physiological Zoology* 53: 433-444.
- Garner, TWJ, Bovero S. & Bielby J. 2008. Emergence of Lethal Chytridiomycosis on Sardinia Final Report to the People's Trust for Endangered Species on Project: Is Disease an Undetected Extinction Threat to the Endangered Sardinian Newt? 14p.
- Garner, TWJ, Perkins, MW, Govindarajulu, P, Selie, D, Walker, S, Cunningham, AA & Fischer, MC. 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters* 2: 455-459.
- Garner, TWJ, Walker, S, Bosch, J, Hyatt, AD, Cunningham, AA & Fisher, MC. 2005 Chytrid fungus in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1639-1641.
- Gascon, C, Collins, JP., Moore, RD., Church, DR., McKay, JE & Mendelson, JR. III (eds). 2007. *Amphibian Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 64pp.
- Hanselmann, R, Rodriguez, A, Lampo, M, Fajardo- Ramos, Aguirre, AA, Kilpatrick, AM, Rodriguez, JP. & Daszak, P. 2004. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biological Conservation* 120: 115-119.
- Hansen, KL. 1960. The use of male southern toads and leopard frogs for pregnancy diagnosis. *Herpetologica* 16: 33-38.
- Houlahan, JE., Findlay, CS, Schmidt, BR, Meyer, AH & Kuzmin, SL. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404: 752-755.
- Johnson, ML & Speare R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases* 9: 922-925.
- Kupferberg, SJ. 1997. Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of a California river: the role of larval competition. *Ecology* 78: 1736-1751.

- Lips KR, Diffrendorf, J, Mendelson, JR & Sears, MC. 2008. Riding the Wave: Reconciling the Roles of Disease and Climate Change in Amphibian Declines. *PLoS Biology* 6: 441-454.
- Longcore, JE, Pessier, AP & Nichols, DK. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219- 227.
- Louca S, Lampo M, Doebeli M (2014) Assessing host extinction risk following exposure to *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the Royal Biological Society* 281:20132783.
- Martel, A. Spitzen-van der Sluijs, M. Blooi, W. Bert et al., 2013 - *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *PNAS* 110(38): 15325–15329
- Martel A, Blooi M, Adriaensen C, Van Rooij P, Beukema W, Fisher MC, Farrer RA, Schmidt BR, Tobler U, Goka K, Lips KR, Muletz C, Zamudio K, Bosch J, Lötters S, Wombwell E, Garner TWJ, Spitzen-van der Sluijs A, Salvidio S, Ducatelle R, Nishikawa K, Nguyen TT, Van Bocxlaer I, Bossuyt F, Pasmans F (2014) Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* 346: 630-631
- McMahon TA, Sears BF, Venesky MD, Bessler SM, Brown JM, Deutsch K et al. (2014) Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. *Nature* 511(7508): 224-227.
- Miaud C., 2013 – Un champignon menace les amphibiens. Qu’avons-nous appris de la Chytridiomycose ? *Le Courrier de la Nature* 277: 30-36.
- Miaud C., 2014 - Protocole d’hygiène pour le contrôle des maladies des amphibiens dans la nature à destination des opérateurs de terrain. Agence de l’Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Université de Savoie et Ecole Pratique des Hautes Etudes (eds), 7 p.
- Mitchell, K. M., Churcher, T. S., Garner, T. W. J. & Fisher, M. C. 2008 Persistence of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* outside the amphibian host greatly increases the probability of host extinction. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275: 329-334.
- Morgan, JAT, Vredenburg, VT, Rachowicz, LJ, Knapp, RA, Stice, MJ, Tunstall, T, Bingham, RE, Parker, JM, Longcore, JE, Moritz, C, Briggs, CJ and Taylor, JW. 2007. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PNAS* 34: 13845-13850.
- Ouellet, M, Mikaelian, I, Pauli, BD, Rodrigue, J & Green DM. 2005. Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conservation Biology* 19: 1431-1440.
- Piotrowski, JS, Annis, SL & Longcore, JE. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9-15.
- Pounds, JA., Fogden, MPL & Campbell, JH. 1999. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* 389: 611-615.
- Rollins-Smith, LA, Doersam, JK, Longcore, JE, Taylor, SK, Shamblyn, SC, Carey, C & Zasloff, MA. 2002. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental & Comparative Immunology* 26: 63-72.

- Scalera, R, Adams, MJ & Galvan, S. 2008. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations in Denmark. *Herpetological Review* 39: 199-200
- Simmaco, M, Boman, A, Mangoni, ML, Mignogna, G, Miele, R, Barra, D & Boman, HG. 1997. Effect of glucocorticoids on the synthesis of antimicrobial peptides in amphibians skin. *FEBS Letters* 416: 273-275.
- Simoncelli, F, Fagotti, A, Dall'Olio, R, Vagnetti, D, Pascolini, R & Di Rosa, I (2005) Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in water frogs of the *Rana esculenta* complex in Central Italy *Ecohealth* 2: 307-312.
- Smith, H.K., 2015 – Epidemiology of an amphibian pathogen: Distribution of an endemic lineage and distribution in an endemic island community. Master Thesis of Science in Behaviour, Evolution and Conservation, University of Lausanne, 58 p.
- Speare, R & Berger, L. 2004. Global distribution of chytridiomycosis in amphibians. Amphibians Diseases Research Group, Townsvill, Australia. Available from [www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyglob.htm](http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyglob.htm).
- Vacher J.P, C. Miaud & T. Dejean, 2013 - Une nouvelle espèce pour la fonge d'Alsace : découverte de *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & Nichols, 1999 (Fungi: Rhizophydiales), champignon parasite des Amphibiens. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle et d'Ethnographie de Colmar* 71 : 39-48.
- Walker, S, Bosch, J, James, T, Valls, JAO, Garcia, G, Rosa, GA, Cunningham, AA, Hole, S, Griffiths, RA & Fisher, MC. 2008. The threat of introduced pathogens to species recovery programs: infection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the endangered Mallorcan midwife toad. *Current Biology*.
- Weldon, KM., du Preez, LH, Hyatt, AD, Muller, R & Speare, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10: 2100-2105.
- Woodhams, DC, Alford, RA & Marantelli, G. 2003. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 65-67.

# **ANNEXES**

## Arbre phylogénétique des haplotypes de *Bd* obtenus en France

Arbre phylogénétique a été construit sur les 70 séquences françaises obtenues et en incluant les haplotypes disponibles dans Genbank (soit 170 séquences au total).

Les 17 haplotypes trouvés se répartissent dans 5 clades différents.

Les 5 clades regroupent :

- 1C, 202, 3993, 4970, 24, 55, 50 et 5079 (Haplotypes : N5, N6, N9, N10 et N11)
- 3987, 39, 9, 4613, 7, 4627 et 4606 (Haplotypes : N1 et N16)
- 58, 52 et 61 (Haplotypes : N3 et N15)
- A (Haplotype : N12)
- 54 (Haplotype : N13)

N11, N13 et N15 ; haplotypes portés par la G des Balkans *P. kurtmuelleri*

N1, N2, N5, N12, N14, N16, N17 haplotypes portés par la Grenouille du complexe des G vertes *Pelophylax kl.*

N8, haplotype porté par *Bombina bombina*







**Mortalité d'Alyte accoucheur à la métamorphose dans un lac Pyrénéens (2011)**  
**Photo M. Fisher**





**Annexe** : Miaud C., 2014 - Protocole d'hygiène pour le contrôle des maladies des amphibiens dans la nature à destination des opérateurs de terrain. Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Université de Savoie et Ecole Pratique des Hautes Etudes (eds), 7 p.