

BUFO

INPN Inventaire
National du
Patrimoine
Naturel



Recherche et inventaire de la Grenouille des champs
Rana arvalis (Amphibia: Ranidae) à l'aide de l'ADN
environnemental en France.



Décembre 2019

Avant-propos

Rédaction et coordination : Jean-Pierre Vacher, responsable scientifique, association BUFO.
jp.vacher@bufo-alsace.org

Ce projet porté par l'association BUFO est le fruit d'un large partenariat qui a impliqué plusieurs structures et personnes, qui ont notamment prélevé les échantillons sur le terrain :

- Alain Fizesan, Jacques Thiriet et Jean-Pierre Vacher, association BUFO.
- Victoria Michel et Jean-Pierre Irlinger, Conservatoire des sites alsaciens.
- Florence Alderweireld, Alexandra Janczak et Cédric Vanappelghem, Conservatoire des espaces naturels du Nord et du Pas-de-Calais.
- Nicolas Caron, Thomas Cheyrezy, Jérémy Lebrun et Guillaume Meire, Conservatoire des espaces naturels de Picardie.
- Sandra Pedurthe et Maud Gironde-Ducher, Office national des forêts DT Grand Est groupe Est.
- Gérald Duhayon, Julien Masquelier et William Cheyrezy, Parc naturel régional de Scarpe-Escaut.
- Virginie Callipel, Julien Leroy, Damien Santer et Corinne Sauvage, Conseil départemental du Nord.
- Stéphanie Rondel, Groupe ornithologique et naturaliste du Nord – Pas-de-Calais.
- Charlotte Debrabant, Vincent Pilon et Pierre Thellier, Eden 62.
- Benjamin Blondel et Maxime Lecardonnell, Syndicat mixte Baie de Somme – Grand Littoral Picard.
- Alix Michon, Ligue pour la protection des oiseaux de Franche-Comté.
- Eelco Wallaart et Jan Warmink, Sylphium.

Table des matières

1	Introduction	4
1.1	Contexte	4
1.2	État des connaissances	6
1.2.1	Aisne	6
1.2.2	Bas-Rhin et Haut-Rhin	6
1.2.3	Territoire de Belfort	6
1.2.4	Nord	7
1.2.5	Pas-de-Calais	7
1.2.6	Somme	7
1.3	Synthèse des connaissances	8
2	Matériel, méthodes et déroulé du projet	9
2.1	Aire d'étude	9
2.2	Méthodes d'inventaire	10
2.2.1	ADN environnemental	10
2.2.2	Enregistrements automatisés	12
2.2.3	Inventaires visuels	12
2.3	Analyse de l'ADNe	12
3	Résultats	13
3.1	ADNe	13
3.1.1	Contrôles positifs	13
3.1.2	Nord	13
3.1.3	Bas-Rhin	13
3.1.4	Territoire de Belfort	16
3.2	Inventaire acoustique	16
3.3	Inventaires visuels	16
4	Discussion	17
5	Conclusion - synthèse nationale	20

Chapitre 1

Introduction

1.1 Contexte

La Grenouille des champs, *Rana arvalis*, est une espèce d’amphibien anoure terrestre eurasiatique largement répandue en Europe centrale et septentrionale et dans le nord-ouest de l’Asie (Glandt, 2006). Elle atteint sa limite occidentale en France, où elle est considérée comme l’une des trois espèces d’amphibiens les plus rares et les plus menacées au sein du territoire métropolitain (Godin et Thiriet, 2012; UICN *et al.*, 2015) (Fig. 1.1). Elle est classée dans la catégorie “En danger” de la Liste rouge nationale des Amphibiens menacés (UICN *et al.*, 2015), “Présumée disparue” dans la Liste rouge des Amphibiens d’Alsace (Vacher, 2015), “Éteinte” en Franche-Comté (Paul, 2011), et “En danger critique d’extinction” dans la Liste rouge du Nord – Pas-de-Calais (Godin et Quevillart, 2015) ainsi que dans la Liste rouge de Picardie (Picardie Nature (coord.), 2016). Elle n’est actuellement présente de manière certaine que dans quatre départements : Nord, Somme, Pas-de-Calais (Hauts-de-France) et Bas-Rhin (Grand Est) (Blondel, 2014; Godin et Thiriet, 2012) (Fig. 1.1). Acquérir des connaissances sur la répartition de cette espèce est crucial car son statut dans notre pays est très défavorable et il est ainsi difficile de préconiser des opérations de gestion ou de sauvegarde tant les populations connues sont déconnectées.

La Grenouille des champs est une espèce extrêmement discrète, ce qui rend sa détection sur le terrain très difficile. Par exemple, dans la vallée du Rhin, elle est passée inaperçue durant des années avant sa redécouverte en 2018 par le biais d’un enregistrement sonore. Ainsi, nous pensons qu’il est encore possible de détecter cette espèce dans des secteurs de présence historique où les habitats paraissent encore favorables. Il est cependant incertain de mettre en place

des opérations d’inventaire ou de suivi d’espèces élusives et rares. Depuis peu, la technique de détection d’espèces par ADN environnemental (ADNe) s’est développée (Thomsen *et al.*, 2012), et semble particulièrement adaptée pour détecter les espèces rares et difficiles à trouver par des méthodes traditionnelles d’inventaires (Eiler *et al.*, 2018). Ainsi, il nous est apparu pertinent de mettre en place un protocole d’échantillonnage à l’échelle nationale basé sur cette méthode afin de tester sa pertinence pour parfaire les connaissances sur cette espèce, et savoir si l’ADNe pourrait être envisagé dans le cadre de la mise en place de suivis de la Grenouille des champs sur certains sites importants pour la conservation de l’espèce.

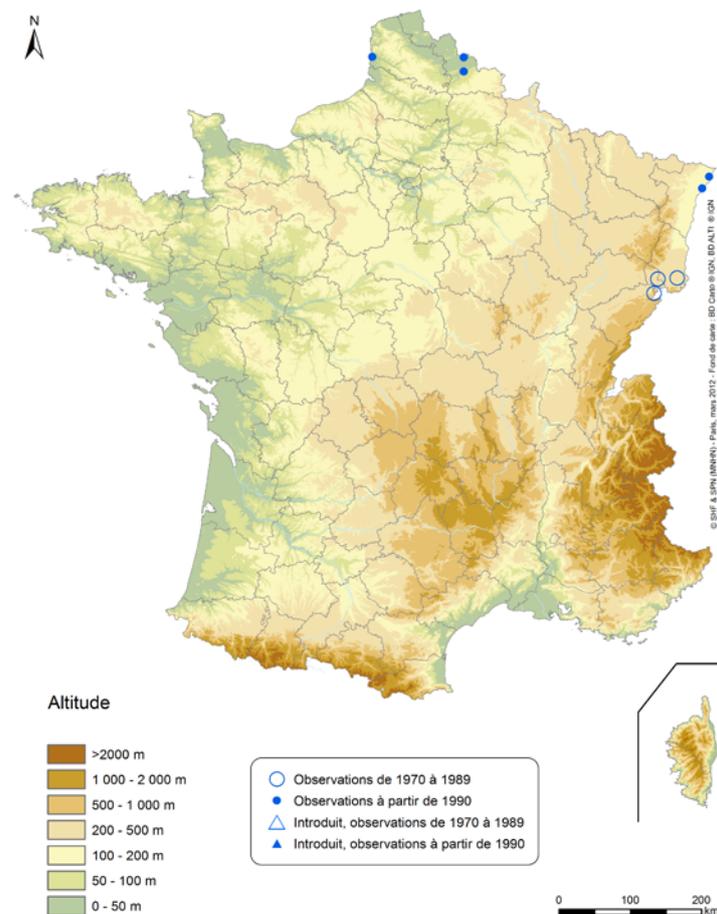


FIGURE 1.1 – Carte de répartition de la Grenouille des champs extraite de l’atlas de répartition publié en 2012 (Lescure et de Massary, 2012).

1.2 État des connaissances

1.2.1 Aisne

La Grenouille des champs a été mentionnée dans au moins 12 communes du département au début du 20^{ème} siècle (Lantz, 1924). L'espèce semble avoir disparu du département, et le dernier atlas de répartition national ne l'y mentionne pas (Godin et Thiriet, 2012).

1.2.2 Bas-Rhin et Haut-Rhin

L'atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles d'Alsace publié en 2010 mentionne trois observations de l'espèce dans la région au cours des années 2000. Une observation d'un individu juvénile en 2006 dans la Réserve naturelle nationale d'Offendorf (Thiriet et Vacher, 2010; Vacher *et al.*, 2008; Vacher, 2010), et deux observations d'individus subadultes dans la commune de Fort-Louis dans un site géré par le Conservatoire des sites alsaciens en 2009 (Thiriet et Vacher, 2010; Vacher *et al.*, 2008; Vacher, 2010). En 2018, un bénévole de l'association (Jean-Sébastien Carteron) a pu enregistrer un chant de Grenouille des champs sur le site d'Offendorf, permettant ainsi de confirmer et d'actualiser sa présence dans ce site. Hormis cette observation, des recherches concentrées durant la période d'activité de l'espèce ont été menées par l'association BUFO au cours des dix dernières années, dans les sites de présence historique de l'espèce dans le Bas-Rhin et dans le Haut-Rhin, mais aucun indice de présence n'a été trouvé durant ces sessions, indiquant un recul fort de l'espèce dans la haute vallée du Rhin. Ce patron d'extinction dans cette région n'est pas exclusif à l'Alsace, puisqu'il est également observé sur la rive droite du Rhin dans le Bade-Wurtemberg où l'espèce a disparu de plusieurs sites de présence historique (Laufer et Pieh, 2007).

1.2.3 Territoire de Belfort

La Grenouille des champs était connue dans les années 1960 et 1970 dans des étangs du sud du Sundgau, région qui s'étend sur le Territoire de Belfort (Pinston *et al.*, 2000; Schneider, 2004). Un enregistrement datant de 1965 réalisé dans un étang de pêche à Faverois a été publié (Schneider, 2004), mais l'espèce n'y a jamais été retrouvée depuis. Une donnée basée sur un chant entendu en 1995 avait été rentrée dans la base de donnée régionale et cartographiée (Pinston *et al.*, 2000). Cependant, cette dernière donnée n'a jamais pu être validée faute d'enregistrement, de photographie ou de spécimen récolté qui aurait permis de confirmer l'identification. Sans

nouvelles observations de l'espèce malgré des recherches ciblées, elle est actuellement considérée comme disparue du département (Paul, 2008, 2011).

1.2.4 Nord

L'espèce est connue depuis 1999 dans deux tourbières de la vallée de la Scarpe, à Vred et Marchiennes (Caby *et al.*, 2000; Godin *et al.*, 2008; Rondel *et al.*, 2006). Depuis, ces deux populations font l'objet d'un suivi annuel qui a permis de décrire le préférendum écologique de l'espèce pour sa reproduction (Rondel *et al.*, 2013). Ces deux localités formeraient, en l'état actuel des connaissances, la plus importante population de Grenouille des champs de France et revêtent donc un intérêt patrimonial majeur pour la conservation de l'espèce. Pour l'en attester, les deux populations du département ainsi que celles du Pas-de-Calais et de la Somme ont été intégrées à un programme de recherche génétique concernant l'espèce et menée par une équipe de chercheurs belges. L'objectif de cette étude pour les populations des Hauts-de-France est d'évaluer la taille génétique des différentes populations échantillonnées, d'en mesurer le degré d'isolement génétique, leurs origines phylogénétiques et de conclure sur leur viabilité à plus ou moins longue échéance afin d'envisager, le cas échéant, un éventuel programme de renforcement de population.

1.2.5 Pas-de-Calais

La Grenouille des champs a été découverte récemment dans le département, dans le marais de Balançon à Merlimont (Godin et Thiriet, 2012). La découverte a été réalisée par le CEN Nord – Pas-de-Calais dans le cadre de ses missions d'animation du site Natura 2000. La délimitation précise de la zone de présence de l'espèce dans ce site reste encore assez floue en raison des difficultés d'accès à certaines propriétés privées. Le préférendum écologique dans les zones connues a été décrit et ne semble pas identique à celui rapporté en Scarpe-Escaut (Erreca et Caliot, 2012). La taille de la population n'est pas connue compte tenu des difficultés d'accès aux zones favorables représentant quelques centaines d'hectares.

1.2.6 Somme

L'espèce a été découverte récemment dans la Somme dans le marais de Romaine à Ponthoile, non loin au sud de Merlimont, et par la suite dans des marais connexes (commune de Ponthoile également, mais aussi commune de Forest-Montiers) (Blondel, 2014). Il s'agissait de juvéniles de

l'année, ce qui indique qu'il existe une population reproductrice dans ce site. Les prospections menées au cours des années suivant la découverte de l'espèce ont pu montrer une forte activité des mâles chanteurs durant la période de reproduction laissant supposer la présence d'une population assez conséquente dans ce site.

1.3 Synthèse des connaissances

Les découvertes de l'espèce dans le Pas-de-Calais et dans la Somme sont récentes (>2010) et suggèrent qu'il existe possiblement d'autres sites de présence dans ce secteur. De plus, la redécouverte de l'espèce dans la Bas-Rhin en 2018 par le biais d'un mâle chanteur indique que l'espèce n'a pas disparu de la région et qu'il serait donc important de continuer les recherches dans les secteurs favorables de la bande rhénane, mais aussi du Sundgau. En France, la Grenouille des champs est une espèce très discrète et difficile à découvrir sur le terrain, du fait de sa rareté, d'effectifs faibles, de la phénologie de reproduction marquée par une très courte période de chant, et des risques de confusion avec les deux autres espèces de grenouilles brunes avec lesquelles elle cohabite (Grenouille agile *Rana dalmatina* et Grenouille rousse *Rana temporaria*). Cependant, grâce au travail de suivi mené dans le Nord depuis plusieurs années et à la description du site de la Somme, nous disposons d'indications écologiques assez précises pour caractériser les zones potentiellement favorables à l'espèce et ainsi orienter les prospections (Blondel, 2014; Godin *et al.*, 2008; Rondel *et al.*, 2013). Ainsi, l'utilisation de la technique de l'ADN environnemental semble toute indiquée pour l'inventaire de cette espèce, aussi bien pour la rechercher dans des sites de présence historique que dans des nouveaux sites. C'est pourquoi nous avons décidé de nous lancer en 2019 dans un projet de recherche basé sur l'ADNe en France.

Chapitre 2

Matériel, méthodes et déroulé du projet

2.1 Aire d'étude

Nous avons défini 50 sites de prélèvement à travers l'aire connue de l'espèce en France (Fig. 2.1 et Tab. 1 et 2). Dans les Hauts-de-France, la stratégie de sélection des sites a principalement visé des secteurs potentiellement favorables à l'espèce non loin de zones d'occurrence déjà connues. Dans le nord-est, la stratégie était de sélectionner des sites de présence historique de l'espèce. Ainsi, le territoire d'étude concerne les départements suivants :

- Aisne
- Nord
- Pas-de-Calais
- Bas-Rhin
- Haut-Rhin
- Somme
- Territoire de Belfort

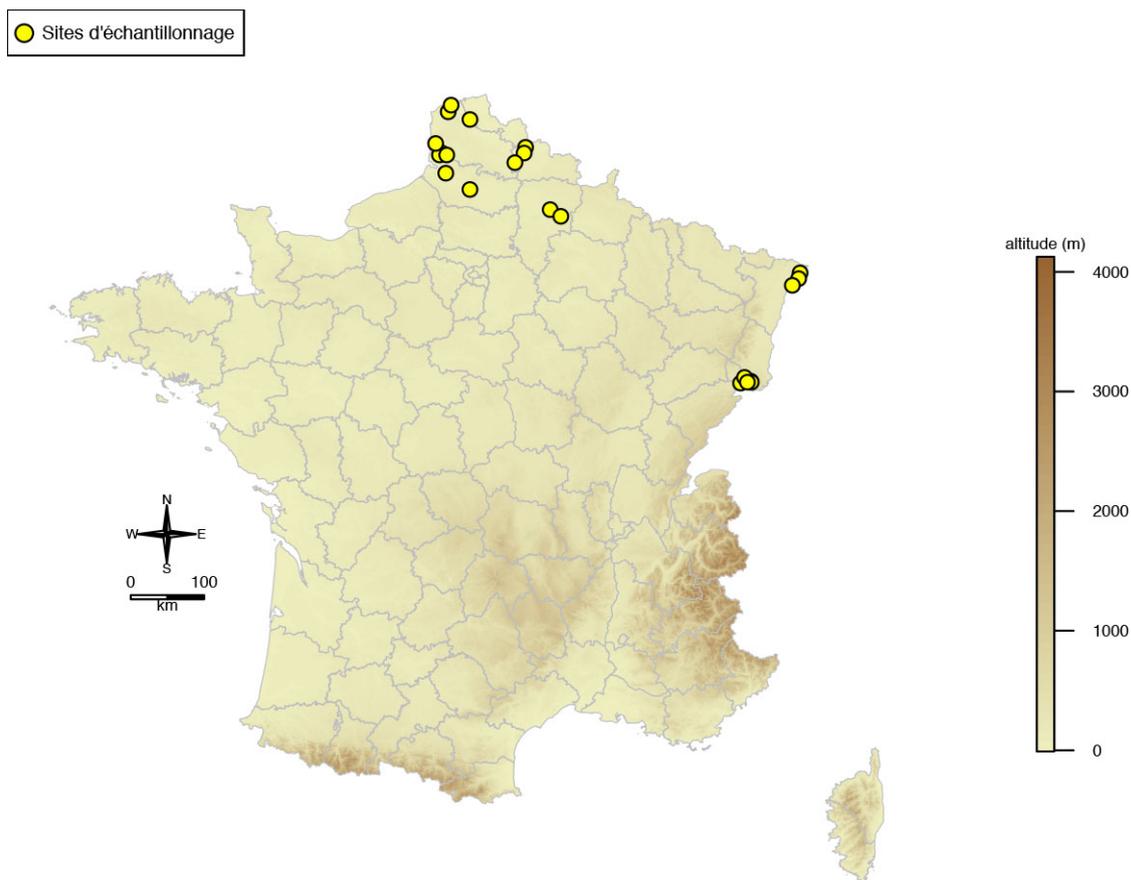


FIGURE 2.1 – Carte de localisation des secteurs prévus pour l'échantillonnage d'ADNe en 2019. Sources cartographiques : OPENSTREETMAP/BD ALTI®75.

2.2 Méthodes d'inventaire

2.2.1 ADN environnemental

Nous avons utilisé un kit de prélèvement délivré par le laboratoire Sylphium (Pays-Bas) pour échantillonner l'eau des zones humides sélectionnées. Ce kit consiste en un filtre au travers duquel on fait couler l'eau prélevée à l'aide d'une seringue de 60 ml. Il est possible de procéder à plusieurs prélèvements dans une même mare, le procédé étant seulement limité par le niveau de saturation du filtre, qui ne permet plus le passage de l'eau une fois qu'il est saturé. En général, de un à cinq prélèvements d'eau de 60 ml étaient filtrés par site. Une fois le prélèvement effectué, l'ADN contenu dans les filtres est fixé à l'aide d'une solution à l'acétate de sodium. Les filtres sont ensuite stockés à température ambiante jusqu'à leur envoi au laboratoire Sylphium.

Nous avons organisé une réunion dans le Nord le 2 avril 2019 qui s'est déroulée en deux parties, une première en salle qui a permis aux différents participants de faire connaissance et

de discuter autour de la thématique de l'ADNe, puis sur le terrain où nous avons mené deux ateliers de collecte d'eau à l'aide du kit Sylphium (Fig. 2.2).



FIGURE 2.2 – Réunion sur le terrain le 2 avril 2019 à la tourbière de Vred, démonstration du prélèvement d'eau à l'aide du kit Sylphium aux participants au projet. © JP Vacher.

Contrôles positifs Nous avons prélevé quatre échantillons utilisés comme contrôles positifs. Les deux premiers ont été prélevés à proximité immédiate de pontes de grenouilles des champs lors de la sortie de terrain du 2 avril 2019. Les troisième et quatrième ont été prélevés exactement au même endroit mais plus tard en saison, dans l'idée de détecter de l'ADN issu des têtards (Fig. 2.3). C'est durant cette période où les larves sont libres dans l'eau que l'ensemble des prélèvements ont été réalisés dans les 50 sites.

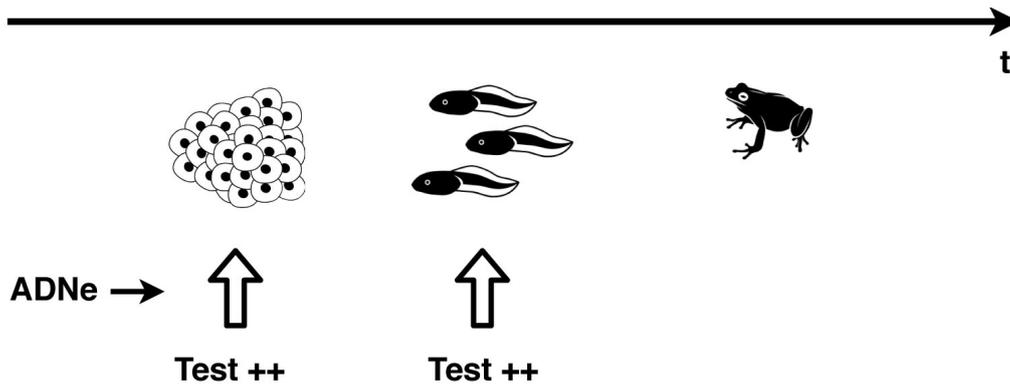


FIGURE 2.3 – Diagramme montrant la séquence de prélèvement d’ADNe selon la phénologie de l’espèce étudiée.

2.2.2 Enregistrements automatisés

En complément aux inventaires d’ADNe et aux inventaires traditionnels, des enregistreurs automatiques fixes ont été mis en place par l’Office national des forêts aux abords de deux mares dans la Réserve biologique dirigée (RBD) du massif forestier d’Offendorf (67).

2.2.3 Inventaires visuels

L’association BUFO et l’ONF ont également organisé plusieurs sessions d’inventaires visuels selon des méthodes de recherches traditionnelles d’amphibiens, c’est-à-dire prospection à vue de nuit à l’aide de lampes frontales aux abords des mares et dans les habitats terrestres attenants au moment de la période d’activité des amphibiens. Ces inventaires ont été menés dans la Réserve naturelle nationale d’Offendorf, dans la Réserve biologique dirigée d’Offendorf et dans le site du Conservatoire des sites alsaciens de la Moder à Fort-Louis, ces trois sites se trouvant dans le Bas-Rhin. Ces sites ont également fait l’objet de prélèvements d’ADNe.

2.3 Analyse de l’ADNe

L’analyse ADNe a été réalisée par la société Sylphium, basée aux Pays-Bas. Elle consiste en huit réplicats en qPCR. Lorsqu’au moins un réplicat est positif, alors l’espèce est considérée comme présente au sein de l’échantillon. Le nombre de réplicats positifs est proportionnel à la quantité d’ADN contenue dans l’échantillon. Ainsi, un résultat à 1/8 indique que très peu d’ADN était présent dans l’échantillon, dénotant soit un faible effectif d’individus au sein du site de prélèvement, soit que l’opérateur a effectué le prélèvement loin de là où se trouvait la plus grande concentration d’ADN. À l’inverse, un résultat à 8/8 indique que l’ADN était présent en forte quantité dans l’échantillon.

Chapitre 3

Résultats

3.1 ADNe

La Grenouille des champs a été détectée au sein de quatre sites sur les 50 échantillonnés, soit un taux de détection positive de 8 % (Fig. 3.1, 3.2, 3.3).

3.1.1 Contrôles positifs

Les contrôles positifs ont bien fonctionné. Nous avons obtenu 8/8 réplicats pour les deux contrôles positifs récoltés juste à côté des pontes, et 8/8 et 5/8 pour les deux contrôles positifs récoltés au moment où les têtards étaient libres dans l'eau.

3.1.2 Nord

La Grenouille des champs a été détectée dans une nouvelle localité, dans le marais de la Marque. Dans ce site, la détection était faible, avec un réplicat sur huit en qPCR.

3.1.3 Bas-Rhin

Commune de Fort-Louis : La Grenouille des champs a été détectée dans un site géré par le Conservatoire des sites alsaciens le long de la rive gauche de la Moder dans la commune de Fort-Louis. Dans ce site, la détection était faible, avec un réplicat sur huit en qPCR. L'espèce avait été détectée à deux reprises dans ce site en 2009, par l'observation directe de deux individus subadultes. Depuis ces observations, elle n'avait jamais été retrouvée à cet endroit.

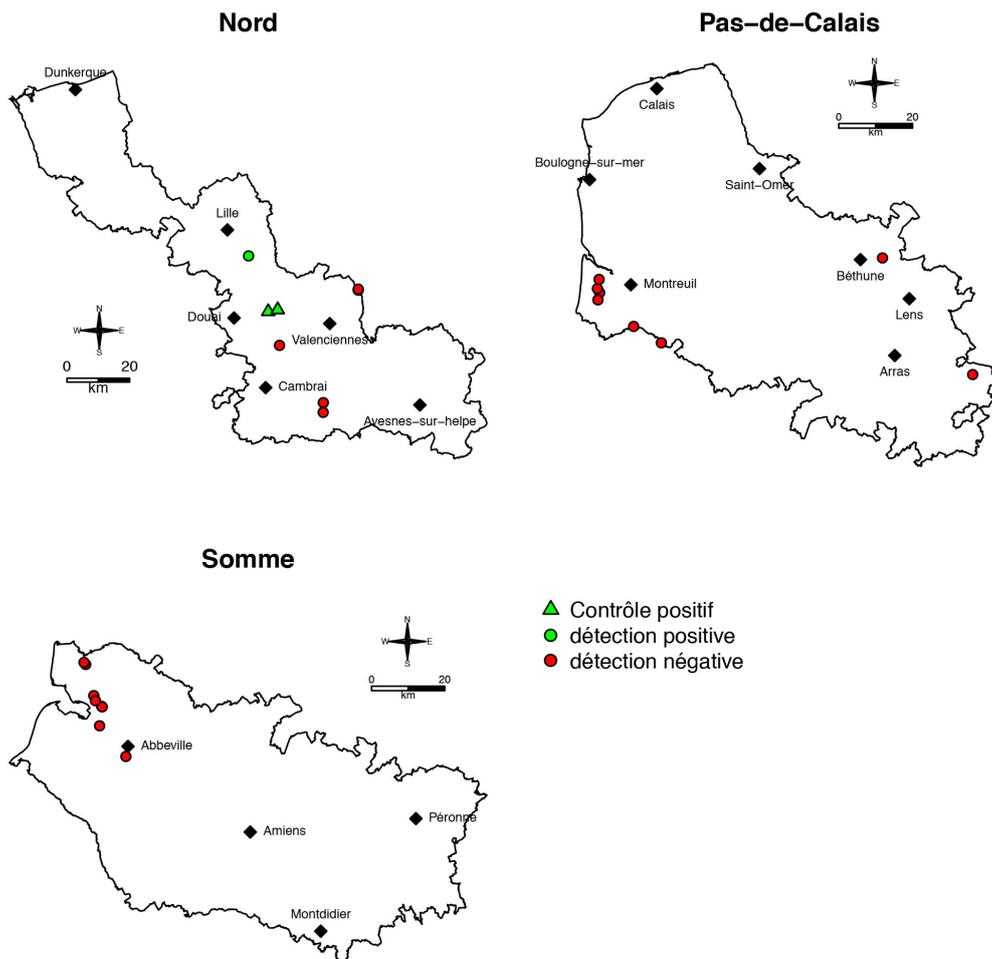


FIGURE 3.1 – Carte de localisation des résultats dans les départements du Nord, du Pas-de-Calais et de la Somme. Source cartographique : OPENSTREETMAP.

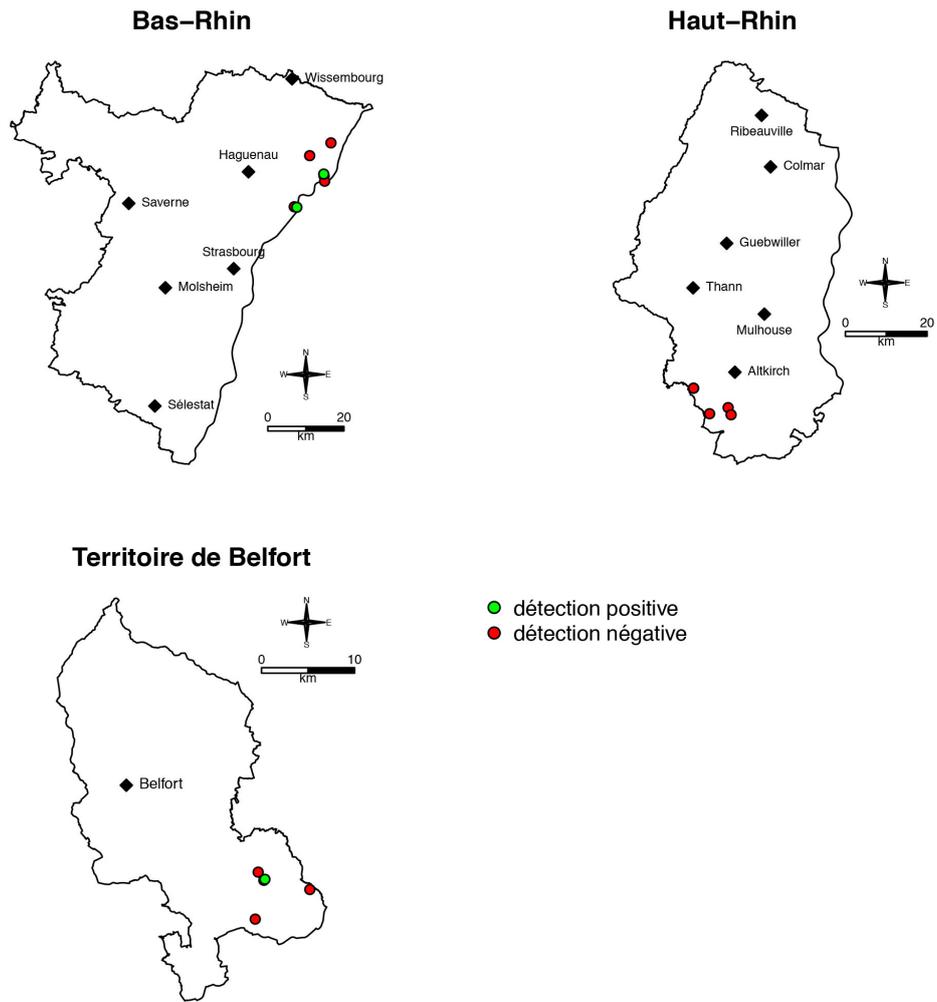


FIGURE 3.2 – Carte de localisation des résultats dans les départements du Bas-Rhin, du Haut-Rhin et du Territoire de Belfort. Source cartographique : OPENSTREETMAP.

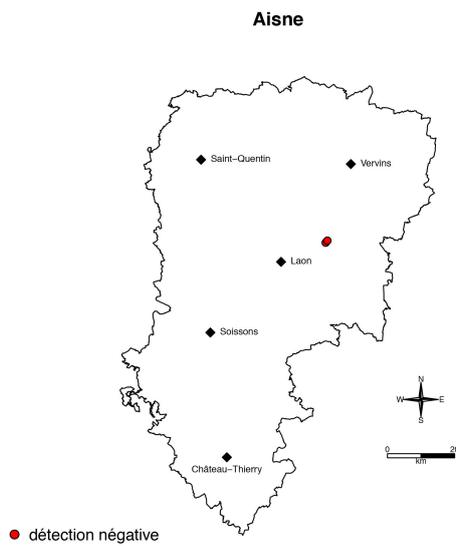


FIGURE 3.3 – Carte de localisation des résultats dans le département de l’Aisne. Source cartographique : OPENSTREETMAP.

Commune d’Offendorf La Grenouille des champs a été détectée dans une anse de bras mort au sein de la Réserve biologique dirigée de la forêt d’Offendorf. Dans ce site, la détection était faible, avec un répliat sur huit en qPCR. L’espèce était connue au sein de ce massif au sein de la Réserve naturelle nationale (RNN), mais n’avait jamais été trouvée en dehors du périmètre de la RNN. En 2006, un individu subadulte avait été observée directement au sein de la RNN, puis en 2018 un mâle a été enregistré en train de chanter au sein d’une mare de la RNN. La détection de l’espèce au sein de la Réserve biologique dirigée indique qu’elle occupe une aire plus vaste que ce qui était estimé, et qu’il faut continuer à la rechercher dans tous les plans d’eau favorables au printemps.

3.1.4 Territoire de Belfort

La Grenouille des champs a été détectée dans un étang du Sundgau belfortain dans la commune de Florimont. Dans ce site, la détection était faible, avec deux répliat sur huit en qPCR. Aucune donnée de l’espèce n’avait été enregistrée dans ce département depuis 1995. Sa découverte dans le cadre de cette étude relance ainsi l’espoir de découvrir plus de localités ces prochaines années.

3.2 Inventaire acoustique

L’analyse des sons enregistrés par les deux modules disposés dans la RBD d’Offendorf (67) n’ont pas révélé la présence de la Grenouille des champs.

3.3 Inventaires visuels

Aucune Grenouille des champs n’a été observée lors des inventaires visuels spécifiques menés dans la RNN d’Offendorf et dans le site du Conservatoire des sites alsaciens à Fort-Louis, deux sites en bordure du Rhin (67). Cependant, d’autres espèces de grenouilles brunes, la Grenouille rousse *Rana temporaria*, et la Grenouille agile *Rana dalmatina*, ont été observées, parfois en abondance, lors de leurs déplacements terrestres sur la litière forestière durant ces sessions.

Chapitre 4

Discussion

Les contrôles positifs prélevés dans les tourbières de Marchiennes et de Vred à deux moments clés de la phénologie de l'espèce (ponte et stade larvaire) ont révélé que la méthode de détection par l'ADNe fonctionne correctement. Dans certains sites, la Grenouille des champs cohabite avec la Grenouille rousse (e.g. Nord, Sundgau), dans d'autres elle cohabite avec la Grenouille agile (Fort-Louis, Bas-Rhin), et dans au moins un cas avec ces deux espèces (Offendorf, Bas-Rhin), ce qui rend très difficile la détection des pontes et des têtards du fait de leur similitude avec ceux des autres espèces. De plus, les Grenouilles des champs restent une courte période dans l'eau pour la reproduction, de l'ordre de 15 jours (Rondel *et al.*, 2006). Les détecter à ce moment est faisable dans les stations à populations assez importantes et si l'on connaît bien la phénologie de l'espèce, pour ne pas passer trop tôt ou trop tard. Mais ce n'est pas le cas de la plupart des sites étudiés dans le cadre de ce projet. Ainsi, la stratégie adoptée d'effectuer les prélèvements durant la période où les têtards sont dans l'eau semble la plus efficace.

Malgré un effort de terrain important et une quasi synchronisation des prélèvements, le taux de détection est faible, avec seulement quatre sites positifs sur 50 testés. Il est possible que certains sites abritaient l'espèce mais que nous ne l'y ayons pas détectée (faux négatifs). L'une des limites du kit de prélèvement est que la quantité d'eau prélevée est assez faible, s'échelonnant de 60 ml à 300 ml, la limite étant que le filtre sature trop rapidement si l'eau est chargée en matière en suspension. Ainsi, dans certains sites, seulement 60 ml ont pu être prélevés, comme dans le Sundgau alsacien. À l'inverse, certains sites de la bande rhénane dans le Bas-Rhin ont bénéficié d'un plus grand volume d'eau, jusqu'à 300 ml, ce qui ne représente que cinq prélèvements. Ainsi, si l'on utilise qu'un seul kit dans une zone humide de grande surface, il est possible de prélever à un endroit où la concentration d'ADN est très faible, ou nulle (Fig. 4.1).

Trois détections positives l'ont été avec un réplicat sur huit, et une avec deux réplicats sur huit, ce qui indique qu'une très faible quantité d'ADN de Grenouille des champs a été capté dans l'eau échantillonnée. Pour les deux sites bas-rhinois, nous pensons que la faible détection est due au faible effectif de l'espèce dans les zones humides échantillonnées (Fig. 4.2). En effet, dans ces sites, l'espèce semble très rare, et cette interprétation corrobore les faibles résultats obtenus avec les autres moyens de prospection (à vue et avec enregistrements), puisque seulement trois données de l'espèce ont été enregistrées dans ces sites entre 2009 et 2018 (deux observations visuelles et un enregistrement de chant) malgré des inventaires menés chaque année dans les sites concernés. Pour les sites du Nord et du Territoire de Belfort, le faible taux de détection peut être expliqué par le même schéma d'une présence effectivement faible de l'espèce dans les sites (Fig. 4.2), mais l'autre hypothèse d'un prélèvement éloigné de la zone où se concentre les têtards (Fig. 4.1) n'est pas à exclure, notamment dans le Nord où l'espèce est bien représentée sur d'autres sites connus (i.e. témoins positifs à Marchiennes et Vred). Dans le Territoire de Belfort, le site positif est assez vaste et le filtre a été saturé rapidement lors du prélèvement, ce qui pourrait expliquer également le faible taux de détection si les larves étaient concentrées sur un autre secteur du plan d'eau (Fig. 4.1).

Si l'opération de recherche par ADNe était reconduite à l'avenir, il serait certainement intéressant d'utiliser plusieurs kits dans un même site dans le cas où la surface de la zone humide avec des secteurs favorables aux têtards est vaste, ce qui permettrait de couvrir une plus vaste surface et ainsi de s'affranchir du potentiel biais de détection dû à la compartimentation spatiale des têtards dans la zone humide.

Le fort taux de détection nulle pourrait être dû à un biais lié au site comme nous l'avons vu précédemment (Figs. 4.1 et 4.2), mais pourrait également être dû à un biais phénologique, car nous avons synchronisé (à quelques jours/semaines près) l'échantillonnage entre tous les sites. Cependant, il est possible qu'il existe des variations de phénologie entre les régions, suivant les contextes climatiques et écologiques. De telles différences ont été notées chez d'autres espèces d'amphibiens lors des recherches d'ADNe (Takahara *et al.*, 2019).

Ces résultats sont tout de même encourageants car ils permettent de confirmer la présence de l'espèce dans la région du Sundgau d'où elle n'avait plus été enregistrée depuis au moins 24 ans. Des prospections de terrain pourront ainsi être menées de nouveau dans cette région, au

moins dans l'étang à détection positive. Dans le Nord, des prospections de terrain pourront aussi être programmées dans le futur afin de mieux connaître l'état de la population présente dans le nouveau site. Comme nous avons effectué les prélèvements assez tard en saison, et la probabilité pour que l'ADN détecté était celui de têtards est forte, ce qui confirme que l'espèce se reproduit certainement dans les sites concernés.

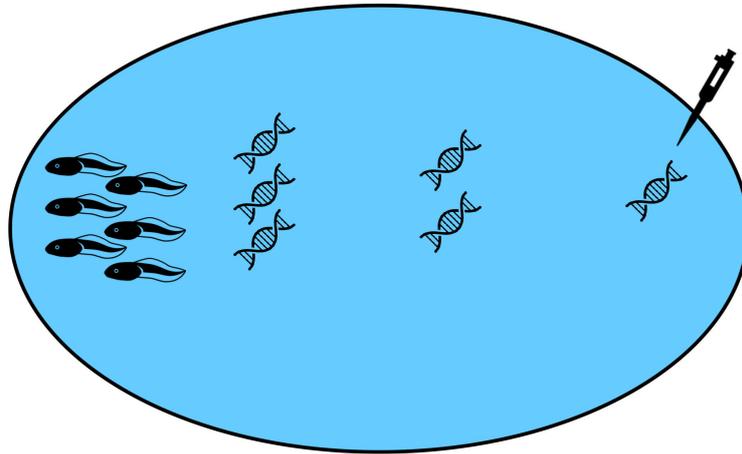


FIGURE 4.1 – Représentation schématique d'un échantillonnage d'ADNe biaisé par la distance. Plus l'on s'éloigne de la zone de concentration de l'organisme recherché, moins la concentration d'ADN dans l'eau est importante.

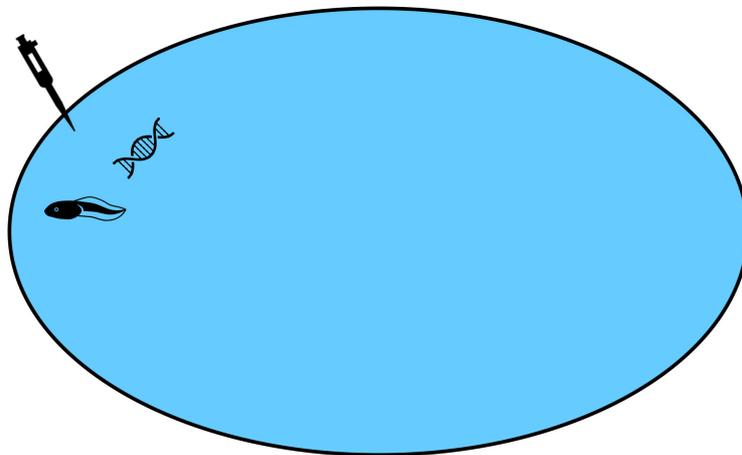


FIGURE 4.2 – Représentation schématique d'un échantillonnage d'ADNe biaisé par l'effectif. Même si l'on prélève au niveau où se trouve l'organisme recherché, la quantité d'ADN reste faible en raison de l'effectif réduit.

Chapitre 5

Conclusion - synthèse nationale

Grâce aux résultats obtenus cette année, nous pouvons dresser une carte mise à jour de la répartition actuelle de la Grenouille des champs en France (Fig. 5.1). Nous confirmons qu'elle est présente dans les départements du Bas-Rhin (ADNe), du Nord (ADNe et observations visuelles), du Pas-de-Calais (observations visuelles), de la Somme (observations visuelles) et du Territoire de Belfort (ADNe).

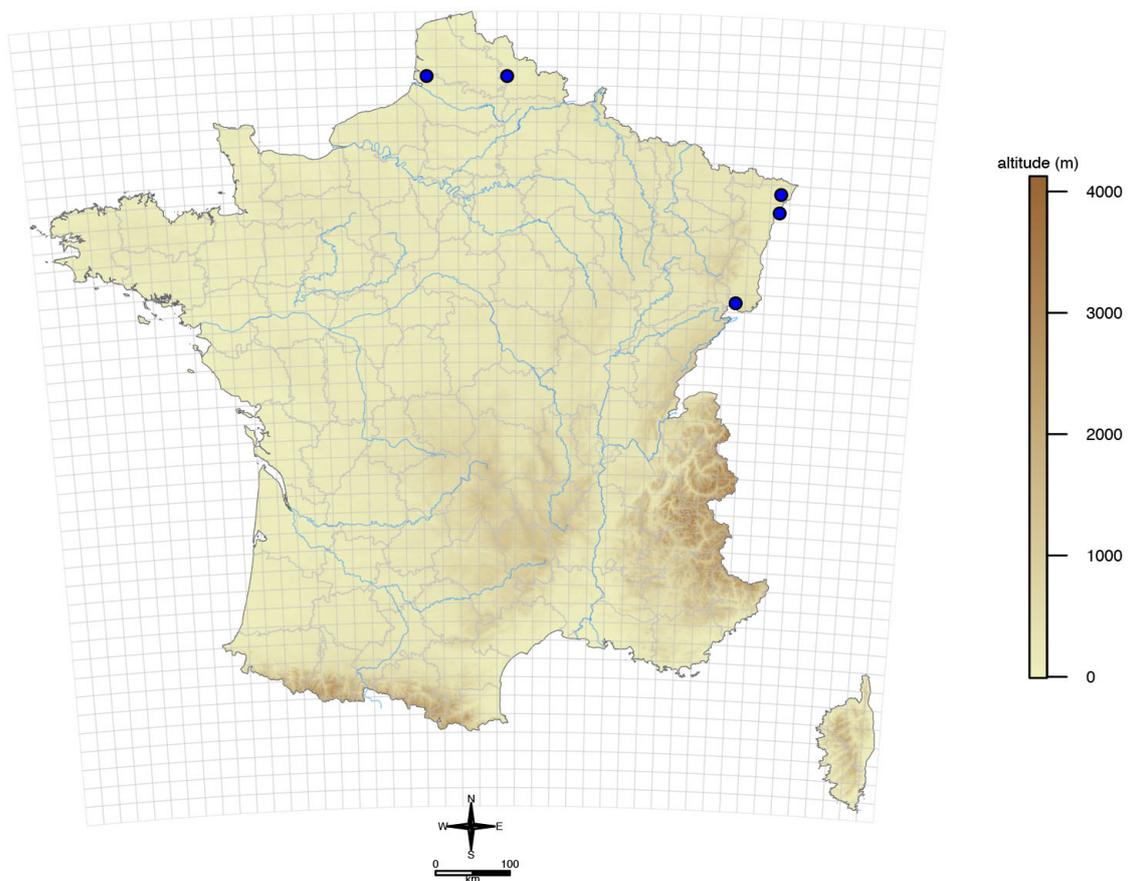


FIGURE 5.1 – Carte de répartition de la Grenouille des champs en 2019, mailles 25km x 25 km. Sources fonds cartographiques : OPENSTREETMAP/BD TOPO/BD ALTI®75.

Bibliographie

- BLONDEL, B. (2014). Redécouverte de la Grenouille des champs *Rana arvalis* en Picardie (Ponthoile, 80). *Avocette*, 38(2):27–29.
- CABY, B., CONSTANTIN DE MAGNY, G., GODIN, J. et MARCHYLLIE, M. (2000). Observation de la Grenouille des champs (*Rana arvalis* Nilsson 1842) Anura, Ranidae dans le Département du Nord (France). *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, 95:5–18.
- EILER, A., LÖFGREN, A., HJERNE, O., NORDÉN, S. et SAETRE, P. (2018). Environmental DNA (eDNA) detects the pool frog (*Pelophylax lessonae*) at times when traditional monitoring methods are insensitive. *Scientific Reports*, 8(1):5452.
- ERRECA, Y. et CALIOT, L. (2012). Caractérisation de la population et de l’habitat de reproduction de la grenouille des champs (*Rana arvalis*) sur la zps du marais de balançon. Mémoire de D.E.A., Université des Sciences et Technologies de Lille 1 et Conservatoire d’espaces naturels du Nord et du Pas-de-Calais.
- GLANDT, D. (2006). *Der Moorfrosch*. Beiheft der Zeitschrift für Feldherpetologie 10. Laurenti Verlag, Bielefeld.
- GODIN, J. et QUEVILLART, R. (2015). Liste rouge des Reptiles et Amphibiens du Nord – Pas-de-Calais. Rapport technique, Centrale Herpétologique du Groupe ornithologique et naturaliste du Nord – Pas-de-Calais / Conservatoire faunistique régional.
- GODIN, J., RONDEL, S., LEMOINE, G. et MARCHYLLIE, M. (2008). The moor frog (*Rana arvalis*) in the North of France. In GLANDT, D. et JEHLE, R., éditeurs : *Der Moorfrosch/The moor frog*, pages 269–282. Zeitschrift für Feldherpetologie, Supplement 13, Laurenti Verlag, Bielefeld.
- GODIN, J. et THIRIET, J. (2012). *Rana arvalis*. La Grenouille des champs. In LESCURE, J. et de MASSARY, J. C., éditeurs : *Atlas des Amphibiens et Reptiles de France*, pages 134–135. Biotope, Mèze/MNHN, Paris.

- LANTZ, L. (1924). Quelques données récentes sur l'herpétofaune du nord-est et de l'est de la France. *Revue d'Histoire naturelle appliquée*, 5(3):54–61.
- LAUFER, H. et PIEH, A. (2007). *Moorfrosch. Rana arvalis Nilsson, 1842*, pages 397–414. Die Amphibien und Reptilien Baden-Württembergs. Ulmer, Stuttgart.
- LESCURE, J. et de MASSARY, J. (2012). *Atlas des Amphibiens et Reptiles de France*. Biotope, Mèze/MNHN, Paris.
- PAUL, J. P. (2008). Liste rouge des mammifères (hors chiroptères), oiseaux, reptiles et amphibiens de Franche-Comté. Rapport technique, LPO Franche-Comté.
- PAUL, J. P. (2011). Grenouille des champs *Rana arvalis*. <https://cdnfiles1.biolovision.net/franche-comte.lpo.fr/userfiles/publications/MonographiesLR/GrenouilledeschampsListerougeFC.pdf> - Consulté le 03-01-2019.
- PICARDIE NATURE (COORD.) (2016). *Listes rouges régionales de la faune menacée de Picardie*. Les Chiroptères, les Mammifères terrestres, les Mammifères marins, les Amphibiens/Reptiles, les Araignées "orbitales", les Coccinelles, les Orthoptères, les Odonates, les Rhopalocères et Zygènes. Rapport technique, Picardie Nature.
- PINSTON, H., CRANEY, E., PEPIN, D., MONTADERT, M. et DUQUET, M. (2000). *Amphibiens et Reptiles de Franche-Comté*. GNFC, Besançon.
- RONDEL, S., DUHAYON, G., GODIN, J. et LEMOINE, G. (2013). Bilan de trois années de suivi des effectifs reproducteurs et des habitats de reproduction de la Grenouille des champs dans la plaine de la Scarpe (Nord), perspectives de préservation. *Revue Scientifique de Bourgogne Nature*, 17:181–198.
- RONDEL, S., SCRÈVE, F., LEMOINE, G. et GODIN, J. (2006). La grenouille des champs dans la grande tourbière de Marchiennes (59). *Le Héron*, 39(4):157–163.
- SCHNEIDER, H. (2004). *Bioakustik der Froschlurche*. Supplement 6 der Zeitschrift für Feldherpetologie. Laurenti Verlag, Bielefeld.
- TAKAHARA, T., IWAI, N., YASUMIBA, K. et IGAWA, T. (2019). Comparison of the detection of 3 endangered frog species by eDNA and acoustic surveys across 3 seasons. *Freshwater Science*, Preprint.

- THIRIET, J. et VACHER, J.-P. (2010). *Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles d'Alsace*. BUFO, Colmar/Strasbourg. 273 p.
- THOMSEN, P. F., KIELGAST, J., IVERSEN, L. L., WIUF, C., RASMUSSEN, M., GILBERT, M. T. P., ORLANDO, L. et WILLERSLEV, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental dna. *Molecular Ecology*, 21(11):2565–2573.
- UICN, MNHN et SHF (2015). La Liste rouge des espèces menacées en France - Chapitre Reptiles et Amphibiens de France métropolitaine. Rapport technique, UICN France, Paris, France.
- VACHER, J.-P. (2010). Statut actuel de la grenouille des champs *Rana arvalis* Nilsson, 1842 (Amphibia : Ranidae) sur la bande rhénane en Alsace. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle et d'Ethnographie de Colmar*, 69:3–12.
- VACHER, J.-P. (2015). Les amphibiens. In HEUACKER, V., KAEMPF, S., MORATIN, R. et MULLER, Y., éditeurs : *Livre rouge des espèces menacées en Alsace*, pages 63–69. ODONAT, Collection Conservation, Strasbourg.
- VACHER, J.-P., FALGUIER, A., PINSTON, H. et CRANEY, E. (2008). The moor frog (*Rana arvalis*) in Alsace and Franche-Comté (France)-past and present distribution. In GLANDT, D. et JEHLE, R., éditeurs : *Der Moorfrosch/The moor frog*, pages 283–290. Zeitschrift für Feldherpetologie, Supplement 13, Laurenti Verlag, Bielefeld.

Table des figures

1.1	Carte de répartition de la Grenouille des champs extraite de l'atlas de répartition publié en 2012 (Lescure et de Massary, 2012).	5
2.1	Carte de localisation des secteurs prévus pour l'échantillonnage d'ADNe en 2019. Sources cartographiques : OPENSTREETMAP/BD ALTI®75.	10
2.2	Réunion sur le terrain le 2 avril 2019 à la tourbière de Vred, démonstration du prélèvement d'eau à l'aide du kit Sylphium aux participants au projet. © JP Vacher.	11
2.3	Diagramme montrant la séquence de prélèvement d'ADNe selon la phénologie de l'espèce étudiée.	12
3.1	Carte de localisation des résultats dans les départements du Nord, du Pas-de-Calais et de la Somme. Source cartographique : OPENSTREETMAP.	14
3.2	Carte de localisation des résultats dans les départements du Bas-Rhin, du Haut-Rhin et du Territoire de Belfort. Source cartographique : OPENSTREETMAP.	15
3.3	Carte de localisation des résultats dans le département de l'Aisne. Source cartographique : OPENSTREETMAP.	15
4.1	Représentation schématique d'un échantillonnage d'ADNe biaisé par la distance. Plus l'on s'éloigne de la zone de concentration de l'organisme recherché, moins la concentration d'ADN dans l'eau est importante.	19
4.2	Représentation schématique d'un échantillonnage d'ADNe biaisé par l'effectif. Même si l'on prélève au niveau où se trouve l'organisme recherché, la quantité d'ADN reste faible en raison de l'effectif réduit.	19
5.1	Carte de répartition de la Grenouille des champs en 2019, mailles 25km x 25 km. Sources fonds cartographiques : OPENSTREETMAP/BD TOPO/BD ALTI®75.	20

Couverture : Individu subadulte de Grenouille des champs, *Rana arvalis*, observé le 2 avril 2019 dans la tourbière de Marchiennes (59). © J.-P. Vacher.

Annexe

Population	Dpt.	Localisation	Lon	Lat	ADNe
1	02	Liesse-Notre-Dame, site 1	3.8024	49.6236	0/8
2	02	Liesse-Notre-Dame, site 2	3.8097	49.6236	0/8
3	59	Abaye de Liessies	4.519	50.74	0/8
4	59	Marais d'Aymeries	3.4946	50.1312	0/8
5	59	Les Près à Leval	3.493	50.1036	0/8
6	59	Marais de la Marque	3.158	50.555	1/8
7	59	L'arsélière de l'Aa	2.1535	50.4733	0/8
8	59	Bouchain, site 1	3.297	50.297	0/8
9	59	Condé-sur-l'Escaut, site 1	3.651	50.457	0/8
10	59	Condé-sur-l'Escaut, site 2	3.651	50.46	0/8
11	59	Bouchain, site 2	-	-	0/8
12	59	Nieurlet	-	-	0/8
13	62	Sacy-le-Grand	2.57879	49.33597	0/8
14	62	Merlimont, site 1	1.646	50.4456	0/8
15	62	Douriez	1.881	50.3236	0/8
16	62	Festubert	2.728	50.5321	0/8
17	62	Guînes, Tourne Puits	1.8788	50.8764	0/8
18	62	Guînes, l'Enfer	1.8608	50.8796	0/8
19	62	Guînes, la Calaisienne	1.8838	50.8837	0/8
20	62	Fort-Vert	-	-	0/8
21	62	Rang-du-Fliers	1.639	50.4291	0/8
22	62	Merlimont, site 2	1.637	50.4563	0/8
23	62	Roussent	1.776	50.3628	0/8
24	62	Rumaucourt	3.074	50.2453	0/8
25	62	Saint-Josse	1.644	50.4782	0/8

TABLE 1 – Liste des sites échantillonnés à l'aide de l'ADN environnemental en France (a). Lon = longitude en degrés décimaux (WGS84) ; Lat = latitude en degrés décimaux (WGS84). La colonne ADNe donne le résultat du nombre de réplicats de qPCR positifs sur huit réplicats effectués.

Population	Dpt.	Localisation	Lon	Lat	ADNe
26	67	Fort-Louis, site CSA	8.0582	48.8111	1/8
27	67	Fort-Louis, Fort Carré	8.0594	48.8059	0/8
28	67	Fort-Louis, polder	8.0612	48.793	0/8
29	67	Offendorf, RNN	7.9527	48.7323	0/8
30	67	Offendorf, RBD	7.9612	48.7317	1/8
31	67	Leutenheim	8.0073	48.8541	0/8
32	67	Seltz	8.0834	48.8843	0/8
33	68	Saint-Ulrich, site 1	7.1048	47.5885	0/8
34	68	Bisel, site 1	7.2177	47.5460	0/8
35	68	Bisel, site 2	7.2266	47.5301	0/8
36	68	Saint-Ulrich, site 2	7.1038	47.5891	0/8
37	68	Seppois-le-Bas	7.1567	47.5322	0/8
38	80	Abbeville	1.8252	50.0810	0/8
39	80	Noyelles-sur-Mer, site 1	1.7324	50.2052	0/8
40	80	Noyelles-sur-Mer, site 2	1.7340	50.2037	0/8
41	80	Ponthoile, site 1	1.7022	50.2315	0/8
42	80	Ponthoile, site 2	1.7088	50.2188	0/8
43	80	Port-le-Grand	1.7241	50.1566	0/8
44	80	Quend, site 1	1.6709	50.3095	0/8
45	80	Quend, site 2	1.6644	50.3141	0/8
46	90	Florimont, site 1	7.0450	47.5586	0/8
47	90	Florimont, site 2	7.0532	47.5510	0/8
48	90	Florimont, site 3	7.0546	47.5517	2/8
49	90	Lepuix-Neuf	7.1191	47.5419	0/8
50	90	Faverois	7.0408	47.5131	0/8
Contrôle positif 1	59	Vred	3.2461	50.3938	8/8
Contrôle positif 2	59	Marchiennes	3.2887	50.3992	8/8
Contrôle positif 3	59	Marchiennes	3.2887	50.3992	4/8
Contrôle positif 4	59	Vred	3.2461	50.3938	8/8
Écouvillon	59	Marchiennes	3.2887	50.3992	8/8

TABLE 2 – Liste des sites échantillonnés à l’aide de l’ADN environnemental en France (b). Lon = longitude en degrés décimaux (WGS84); Lat = latitude en degrés décimaux (WGS84). La colonne ADNe donne le résultat du nombre de réplicats de qPCR positifs sur huit réplicats effectués.