

Master 2 : Vie et Santé, Spécialité Ecophysiologie et Ethologie

Caractérisation génétique et conservation du crapaud vert *Bufo viridis* en Alsace



© Jean-Pierre Vacher

Encadrants : Jean-Pierre Vacher, Sylvain Ursenbacher

Co-encadrante : Victoria Michel

GERARD Cindy

Stage du 1 Février au 31 Août 2011

Remerciements

Je tiens à présenter mes plus sincères remerciements à Jean-Pierre Vacher pour m'avoir supervisé durant mes sept mois de stage au sein de l'association BUFO et pour m'avoir transmis sa passion de l'herpétologie. Sa disponibilité exemplaire et ses conseils avisés furent pour moi d'un grand soutien.

Je présente également ma plus profonde gratitude à Sylvain Ursenbacher pour m'avoir encadré au sein du NLU, pour sa patience, son dévouement, son attention et pour tous les entretiens enrichissants et formateurs qui m'ont permis d'aboutir à des résultats efficaces.

J'apporte aussi ma plus grande reconnaissance à Victoria Michel pour m'avoir fait découvrir avec passion le crapaud vert et pour m'avoir épaulé lors de la collecte des échantillons sur le terrain.

Je remercie de même Chloé Renoux pour sa collaboration lors des prélèvements ainsi que pour son soutien permanent.

Je voudrais aussi remercier Sébastien Didier pour tous les renseignements spécifiques qu'il m'a fournis sur le crapaud vert ainsi que pour sa participation active sur le terrain.

Je remercie également Mathieu Reamy ainsi que toutes les personnes du NLU qui m'ont aidé dans l'apprentissage du travail et des techniques de laboratoire.

Pour finir, je remercie Christophe et Caroline Rahier, Erwan Thepaut, David Marlien et l'ensemble des personnes qui ont toujours fait preuve d'une grande disponibilité lors de la phase de terrain.

SOMMAIRE

Présentation des organismes d'accueil	1
I – Introduction.....	2
II – Matériel et méthodes	6
1. L'espèce étudiée	6
2. Aire d'étude	6
3. Echantillonnage sur le terrain et récolte de l'ADN	6
<i>3.1. Capture des individus</i>	6
<i>3.2. Identification des crapauds verts</i>	7
<i>3.3. Récolte de l'ADN</i>	7
4. Analyses génétiques	7
5. Analyses statistiques	8
<i>5.1. Détection des allèles nuls</i>	8
<i>5.2. Détection des allèles liés</i>	8
<i>5.3. Différences génétiques entre les populations</i>	8
<i>5.4. Diversité et variabilité génétique</i>	8
<i>5.5. Structure des populations</i>	9
<i>5.6. Isolement des populations</i>	10
<i>5.7. Test de dispersion sexe-biaisée</i>	11
III – Résultats	12
1. Nombre de crapauds verts capturés	12
2. Analyses génétiques	12
3. Allèles nuls et allèles liés	12
4. Différences génétiques entre les populations	12
5. Diversité et variabilité génétique des microsatellites	13
6. Diversité, variabilité et différenciation génétique des populations	14
7. Structure des populations	15

8. Diversité et variabilité génétique entre les trois principaux groupes génétiques	16
9. Isolement des populations	16
10. Sexe-biaisé	17
IV – Discussion	18
1. Structure des populations	18
<i>1.1. Dispersion des individus</i>	18
<i>1.2. Le paysage</i>	19
2. Relations entre les unités de populations de <i>Bufo viridis</i> en Alsace	20
3. Diversité génétique des populations de <i>Bufo viridis</i>	21
<i>3.1. Diversité génétique des métapopulations alsaciennes</i>	21
<i>3.2. Les crapauds verts polyploïdes</i>	22
<i>3.3. Sélection contre la consanguinité</i>	22
4. Implications pour la conservation	23
V - Conclusion et perspectives	25
Bibliographie	26
Annexes	29

Présentation des organismes d'accueil

BUFO est une association Alsacienne spécialisée dans l'étude, la protection et la conservation des amphibiens et des reptiles présents en Alsace. Créée en 1997, cette association à but non lucrative est actuellement présidée par monsieur Jean Barbery et compte treize administrateurs. Elle comprend également deux salariés, Jean-Pierre Vacher (chargé d'études) et Victoria Michel (chargée de mission).

Cette association joue un rôle primordial en Alsace puisqu'elle réalise le suivi de l'ensemble des espèces recensées dans cette région. Cette démarche lui permet d'actualiser et d'améliorer annuellement les connaissances sur le statut et la répartition de ces espèces. Elle transmet et valorise ensuite très volontiers l'ensemble des informations qu'elle recueille par l'intermédiaire de nombreux outils (Atlas régional, conférences...). Elle répond également favorablement à toutes les questions ou sollicitations associées au domaine de l'herpétologie provenant des professionnels ou des particuliers. Enfin, elle effectue un grand nombre d'actions (sauvetages routiers, création de mares...) en collaboration avec de nombreux organismes.

Siège social:

Association BUFO
Musée d'Histoire naturelle et
d'Ethnographie
11 rue de Turenne
68000 Colmar, France

Siège administratif:

Association BUFO
8 rue Adèle Riton
67000 Strasbourg, France
Tel : 03 88 22 11 76
EMail : bufo@9online.fr

Site internet : www.bufo.alsace.free.fr

L'Institut für Natur- Landschafts und Umweltschutz (NLU) appartient au département des Sciences Environnementales de l'Université de Bâle. Elle se consacre à la biogéographie et à la biologie de la conservation des espèces animales et végétales.

Adresse :

Institut für Natur- Landschafts und Umweltschutz
St. Johannis-Vorstadt 10
4056 Basel, Suisse.
Tel : + 41 61 267 08 31

Site internet: www.conservation.unibas.ch/nlu/index.html

I – Introduction

Le déclin de la biodiversité mondiale est un phénomène qui s'est intensifié ces dernières décennies. Même si les causes de cette érosion sont nombreuses et variées, l'altération, la perte et la fragmentation des habitats restent les facteurs principaux conduisant à la disparition de nombreuses espèces (Fahrig, 2003 ; Gibbons *et al.*, 2000 ; Krauss *et al.*, 2010 ; Reading *et al.*, 2010). En effet, la mise en place d'axes routiers, l'intensification de l'agriculture (Tilman *et al.*, 2001) ou l'augmentation de l'urbanisation peuvent constituer de véritables barrières. Ils conduisent fréquemment à une réduction, et parfois même à un arrêt total, de la migration des individus. Les différentes populations se retrouvent alors progressivement isolées les unes des autres. Le flux de gène étant ainsi réduit, la diversité génétique de ces populations régresse inévitablement. Leurs capacités d'adaptations étant affaiblies, elles deviennent alors beaucoup plus sensibles aux diverses pressions biotiques et abiotiques ce qui provoque une réduction d'effectif et de viabilité et donc une augmentation de leurs risques d'extinction (Dixo *et al.*, 2009 ; Frankham *et al.*, 2007). Selon les espèces et les populations concernées, les facteurs responsables de ce déclin agissent plus ou moins rapidement. De ce fait, il est souvent difficile de prouver que ce phénomène est en cours et ainsi d'agir efficacement pour protéger et conserver les populations touchées avant leur disparition totale.

L'utilisation des principes de la génétique de la conservation tend donc à se démocratiser pour évaluer le statut des populations. Basée sur différents marqueurs génétiques, comme les allozymes, les RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), les minisatellites ou encore les microsatellites, cette discipline permet entre autres de mesurer la diversité génétique des populations, de détecter la consanguinité ou encore d'estimer la réduction du flux de gènes associée à la fragmentation du milieu (Beebee, 2010 ; Frankham *et al.*, 2007, Jehle *et al.*, 2002). De part leur forte variabilité génétique, les microsatellites de l'ADN nucléaire sont actuellement les marqueurs génétiques les plus utilisés pour les espèces animales. En effet, leur taux de mutation élevé les rend très informatifs pour les études à l'échelle des populations (Beebee, 2010 ; Frankham *et al.*, 2002).

L'une des nombreuses applications offertes par la réalisation des études génétiques réside dans l'évaluation de la structuration des différents noyaux populationnels. Cette

information est très utile pour définir de manière adéquate les priorités d'actions à mener en termes d'aménagement écologique pour l'espèce concernée (Frankham *et al.*, 2002, 2007). Les populations situées en limite d'aire de répartition sont souvent caractérisées par des effectifs restreints, une forte isolation et une faible diversité génétique (Vucetich *et al.*, 2003). En conséquence, leur structuration génétique est souvent très marquée en raison du flux de gènes réduit. Toutefois, il arrive parfois que ces populations présentent une variabilité génétique supérieure à celle observée chez des populations situées beaucoup plus centralement dans l'aire de répartition (Munwes *et al.*, 2010). Cela augmenterait les capacités de survies des individus en leur offrant des possibilités d'adaptations à l'instabilité de leur environnement (Munwes *et al.*, 2010). Ils seraient donc plus aptes à coloniser des milieux dont les conditions écologiques ne correspondent pas obligatoirement à l'optimum vital de l'espèce.

En raison de leur cycle de vie et de leur biologie, les amphibiens sont connus pour être particulièrement sensibles aux différentes perturbations qui peuvent affecter leurs environnements. En effet, il est actuellement largement démontré que l'altération et la fragmentation des habitats, la destruction et la pollution des sites de reproduction ou encore les maladies émergentes telles que la chytridiomycose sont les principaux facteurs responsables du déclin de nombreuses espèces d'amphibiens à travers le monde (Allentoft *et al.*, 2010, Noël *et al.*, 2007, Blaustein *et al.*, 2002). Malheureusement, ces éléments sont loin d'être les seuls puisque les changements climatiques, l'augmentation de l'émission des radiations ultraviolet, les pluies acides, la mortalité routière, la surconsommation humaine et les espèces invasives renforcent souvent de manière négative l'action des diverses causes évoquées précédemment (Allentoft *et al.*, 2010, Noël *et al.*, 2007, Stuart *et al.*, 2004, Blaustein *et al.*, 2002).

Les nombreuses études déjà réalisées sur des espèces d'amphibiens différentes s'accordent à dire que la diversité génétique des populations varie fortement en fonction de l'espèce considérée, de sa capacité de déplacement, de la nature et de l'étendue de la menace à laquelle ils sont confrontés (Allentoft *et al.*, 2010). Alors que les Ranidae et les Salamandridae manifestent principalement un comportement philopatride avec des capacités de dispersion réduites, les Bufonidae sont au contraire capables de réaliser de grandes migrations. De ce fait, l'impact des structures routières, par exemple, se révélerait beaucoup plus néfaste pour ces derniers (Allentoft *et al.*, 2010).

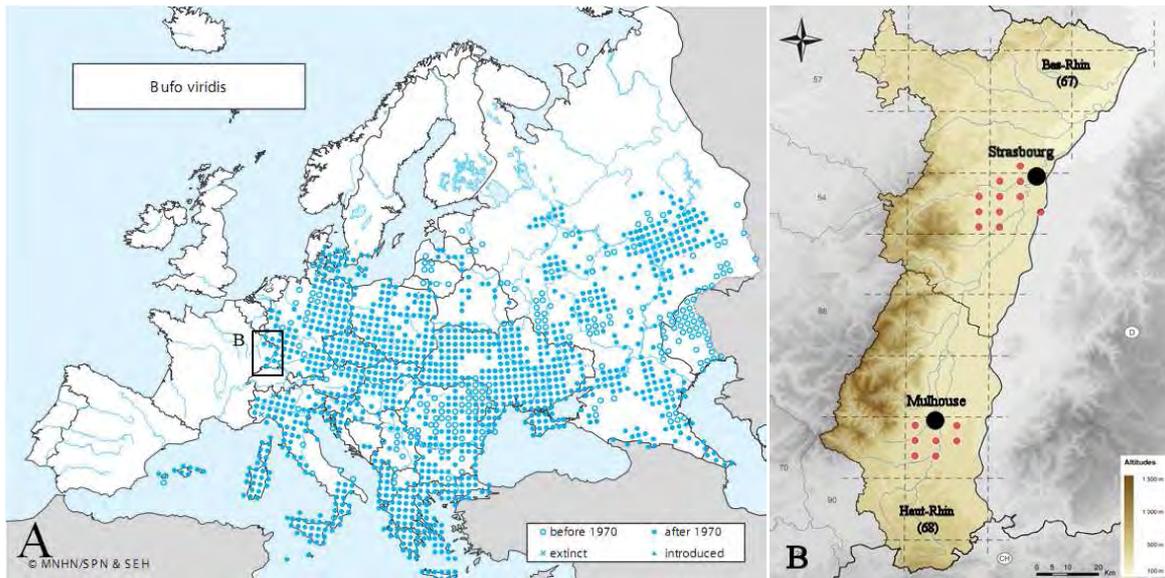


Figure 1 : A. Aire de répartition du crapaud vert en Europe (Gasc *et al.*, 1997). B. Aire de répartition du crapaud vert en Alsace (Thiriet *et al.*, 2010).

En conséquence, il est actuellement estimé que 41% des espèces d'amphibiens répertoriées à travers le monde seraient menacées d'extinction (UICN, 2011). En Europe, 22,9% d'entre eux montre un déclin (Temple *et al.*, 2009) et cet état affecterait près d'une espèce française sur cinq (Comité Français de l'UICN, 2009). De plus, les amphibiens sont protégés par des conventions internationales telles que la directive « Habitats-Faune-Flore » mise en place par la Communauté Européenne ou par la législation nationale comme par exemple l'arrêté du 19 novembre 2007.

Le crapaud vert (*Bufo viridis*) est un Bufonidae à vaste répartition qui se rencontre dans la majeure partie de l'Europe centrale et méridionale, ainsi que dans toute l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient (Roth, 1997 ; Stöck *et al.*, 2008, Figure 1A). Eteint en Suisse (Grossenbacher, 1988), il atteint la limite occidentale de son aire de répartition en France, à l'ouest de la vallée du Rhin (en Alsace et en Lorraine) et en Corse, et au nord-ouest de l'Italie. Considéré comme rare et en déclin en bordure de son aire de répartition, la population de crapauds verts du nord-est est inscrite dans la liste rouge des espèces menacées en France dans la catégorie « En danger » (Comité français de l'UICN, 2009). Il est également inscrit à l'annexe II de la Convention de Berne et à l'annexe IV de la Directive européenne « Habitats-Faune-Flore ».

Ce Bufonidae a déjà fait l'objet de nombreuses études scientifiques, en particulier dans le domaine de la génétique. Bien que cette espèce soit généralement diploïde ($2n=22$), certaines populations d'Asie ont montré la présence d'individus polyploïdes ($3n=33$ et $4n=44$) (Cavallo *et al.*, 2002 ; Stöck *et al.*, 2002, 2006, 2009). Le crapaud vert ne fait pas figure d'exception, puisque six autres familles d'anoures ont également révélé la présence de populations polyploïdes (Cavallo *et al.*, 2002).

Le crapaud vert n'est présent de manière naturelle en France que dans trois régions: l'Alsace, la Lorraine et la Corse. En Alsace, *Bufo viridis* ne subsiste qu'en quelques noyaux populationnels (Figure 1B). Ces derniers sont confrontés au réseau routier qui s'avère extrêmement dense à proximité des villes de Strasbourg (Bas-Rhin) et de Mulhouse (Haut-Rhin). Il doit également faire face à une agriculture intensive puisque 60% des terres agricoles alsaciennes sont consacrées à la culture des vignes et du maïs.

Du fait de son caractère pionnier, le crapaud vert se révèle être un amphibien très mobile. Toutefois, nous supposons que cette capacité de déplacement pourrait fortement être réduite par la fragmentation de son habitat naturel. C'est pourquoi, dans le cadre du plan national d'action engagé en sa faveur en 2011 par le Ministère de l'Ecologie, du

Développement durable, des Transports et du Logement, nous avons souhaité réaliser une étude génétique sur les populations de crapauds verts alsaciennes afin d'apporter un éclairage sur le statut des populations et une aide à la mise en place des projets de conservation adaptés à ses besoins.

Pour cela, nous avons analysé la diversité génétique des principales populations de cette région à l'aide de marqueurs microsatellites. Cette étude nous a permis (1) d'évaluer les niveaux de diversité génétique des différentes populations présentes dans les départements du Haut-Rhin et du Bas-Rhin ; (2) d'estimer le degré de différenciation et le flux de gènes entre ces différentes populations ; (3) d'identifier la structure génétique de cette espèce dans la région et (4) de réfléchir, en accord avec nos résultats, aux mesures de conservation à mettre en œuvre en faveur de cet amphibien.



Figure 2 : Exemple de milieu favorable à la reproduction du crapaud vert.
Gravière de Bischoffsheim © Victoria Michel

Sites	Département	Localisation	Latitude (UTM)	Longitude (UTM)
BIa	67	Ancienne sablière de Bischoffsheim	5372069	390298
BIb	67	Gravière de Bischoffsheim	5369922	395910
BO	67	Site CSA du Borie, Ostwald	5378402	404272
DUT	67	Duttlenheim	5375585	394162
GR	67	Sablière Esslinger – Griesheim-près-Molsheim	5373447	390019
KR	67	Choucrouterie, Krautergersheim	5369210	393127
LI	67	Sablière Holcim, Lingolsheim	5378179	401831
MO	67	Molsheim	5376746	390748
OS	67	Gravière d'Ostwald	5378332	405606
VA	67	Gravière de Valff	5364827	391948
ST	68	Carreau Marie-Louise, Feldkirch et Staffelfelden	5299478	370299
WI	68	Terril Eugène, Wittelsheim	5298251	374696

Tableau 1 : Liste des 12 sites échantillonnés en Alsace.

II – Matériel et méthodes

1. L'espèce étudiée

Le crapaud vert *Bufo viridis* Laurenti, 1768 est un amphibien pionnier qui affectionne les milieux ouverts, d'origine naturelle ou anthropique. Comme tous les Bufonidae, cet anoure passe la majorité de l'année en phase terrestre pour rechercher de la nourriture (insectes, limaces, vers de terre...), un site d'hibernation (cave, terrier...) ou encore de reproduction. Il rejoint le milieu aquatique que durant la période de reproduction. En Alsace, celle-ci débute fin mars et se termine aux alentours du mois de juin. Il choisit préférentiellement les points d'eaux peu profonds (inférieurs à un mètre de profondeur), fortement ensoleillés, avec peu de végétation et dépourvu de poissons (Thiriet *et al.*, 2010 ; Duguet et Melki, 2003 ; Sané et Didier, 2007, Figure 2). Ainsi, il est souvent observé en compagnie d'un autre Bufonidae aux mœurs similaires, le crapaud calamite *Bufo calamita* Laurenti, 1768 dans les gravières, les sablières ou encore les mares nouvellement créées. Son activité crépusculaire et nocturne le protège efficacement de la dessiccation et de la prédation par les oiseaux.

2. Aire d'étude

L'échantillonnage des crapauds verts a été réalisé sur 12 sites distincts, répartis sur les départements du Bas-Rhin (67) et du Haut-Rhin (68) (Tableau 1 et Figure 3). Étant donné les effectifs respectifs des deux noyaux populationnels et l'intensité du réseau routier, nous avons choisi d'échantillonner dix sites dans le Bas-Rhin contre deux dans le Haut-Rhin.

3. Échantillonnage sur le terrain et récolte de l'ADN

3.1. Capture des individus¹

Les crapauds verts ont été capturés durant leur période d'activité au cours de la saison de reproduction (du 29 mars 2011 au 15 juin 2011), lorsque les conditions météorologiques étaient favorables à leur activité (température extérieure supérieure à 10°C, humidité de l'air, absence de vent). Les individus étaient localisés à l'aide de lampes torches ainsi que par le chant d'appel émis par les mâles pour attirer les femelles. Ils étaient capturés à la main ou à l'aide d'une époussette puis placés dans des sachets individuels pour limiter tous risques de contaminations, qu'ils soient ADN ou sanitaires (Anonyme, 2010).

¹ Une autorisation ministérielle nous a été délivrée pour la période du 17 mars au 31 octobre 2011

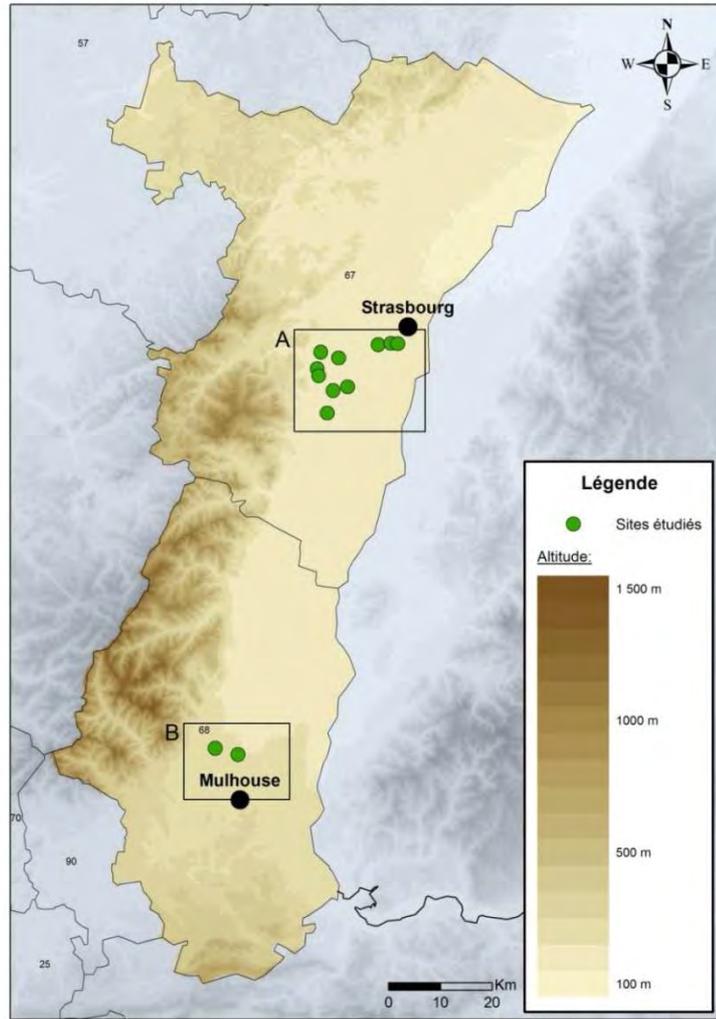


Figure 3 : Localisation géographique des 12 sites échantillonnés.

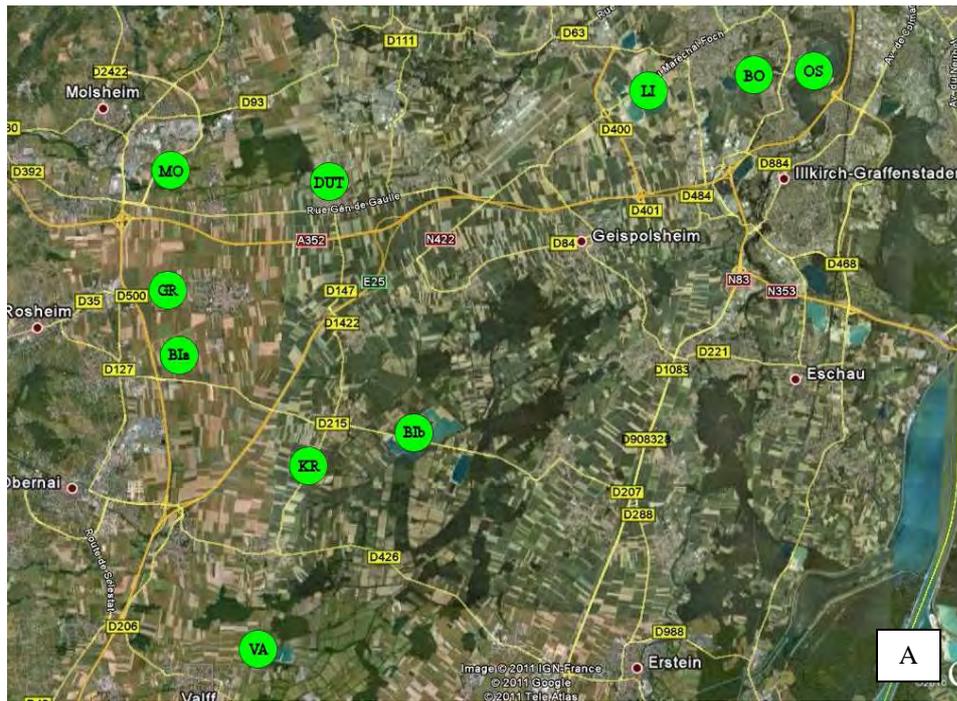


Figure 3 A : Localisation précise des sites du Bas-Rhin. Les codes des sites correspondent au mention du tableau 1.

Sur un site donné, le nombre d'individus reproducteurs pouvait parfois atteindre des valeurs importantes. Nous nous sommes limités à la capture d'un nombre maximal de 30 échantillons par site.

3.2. Identification des crapauds verts

Dans l'objectif de ne pas prélever l'ADN d'un même crapaud au cours de deux séances de capture successives sur un même site, nous avons utilisé la méthode de photo-identification. Elle consiste à photographier les profils gauche et droit de chaque individu capturé. Cette méthode est particulièrement efficace pour le crapaud vert en raison du patron de coloration unique à chaque individu et facilement reconnaissable.

3.3. Récolte de l'ADN

L'ensemble des prélèvements ADN ont été effectués directement sur les sites d'échantillonnages à l'aide d'écouvillons (Figure 4). Cette technique rapide et non invasive permet de récolter efficacement de la salive et des cellules épithéliales de la bouche des amphibiens (Broquet *et al.*, 2007 ; Pidancier *et al.*, 2003 ; Poschadel et Möller, 2004). Comme les crapauds verts n'ouvrent pas spontanément la bouche à l'approche de l'écouvillon, nous avons utilisé une lame en métal pour provoquer le réflexe d'ouverture, permettant ainsi d'y introduire l'écouvillon. Pour éviter tout risque de contamination, cette dernière était stérilisée entre deux individus. Une fois le prélèvement réalisé et le sexe déterminé, le crapaud vert était relâché à l'endroit de sa capture.

4. Analyses génétiques

L'ensemble des prélèvements ADN ont été analysés au laboratoire du NLU par l'intermédiaire de 13 microsatellites spécifiques à *Bufo viridis viridis* : Bcalμ10, BaturaC107, BaturaC124, BaturaC201, BaturaC203, BaturaC205, BaturaC218, BaturaC223, BaturaC224, BaturaD5, BaturaD105, BaturaD106 et BaturaD210 (Dufresnes *et al.*, 2011).

L'ADN contenu dans chaque échantillon a d'abord été extrait à l'aide du kit QIAGEN DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hombrechtikon, Suisse) en suivant le protocole décrit par le fournisseur. Certains points ont été adaptés pour une extraction d'ADN à partir d'écouvillon : le temps de digestion a été étendu à 8h, l'élution a été réalisée deux fois consécutive avec un volume de 100μL de buffer AE, avec une attente de 5 minutes avant la centrifugation.

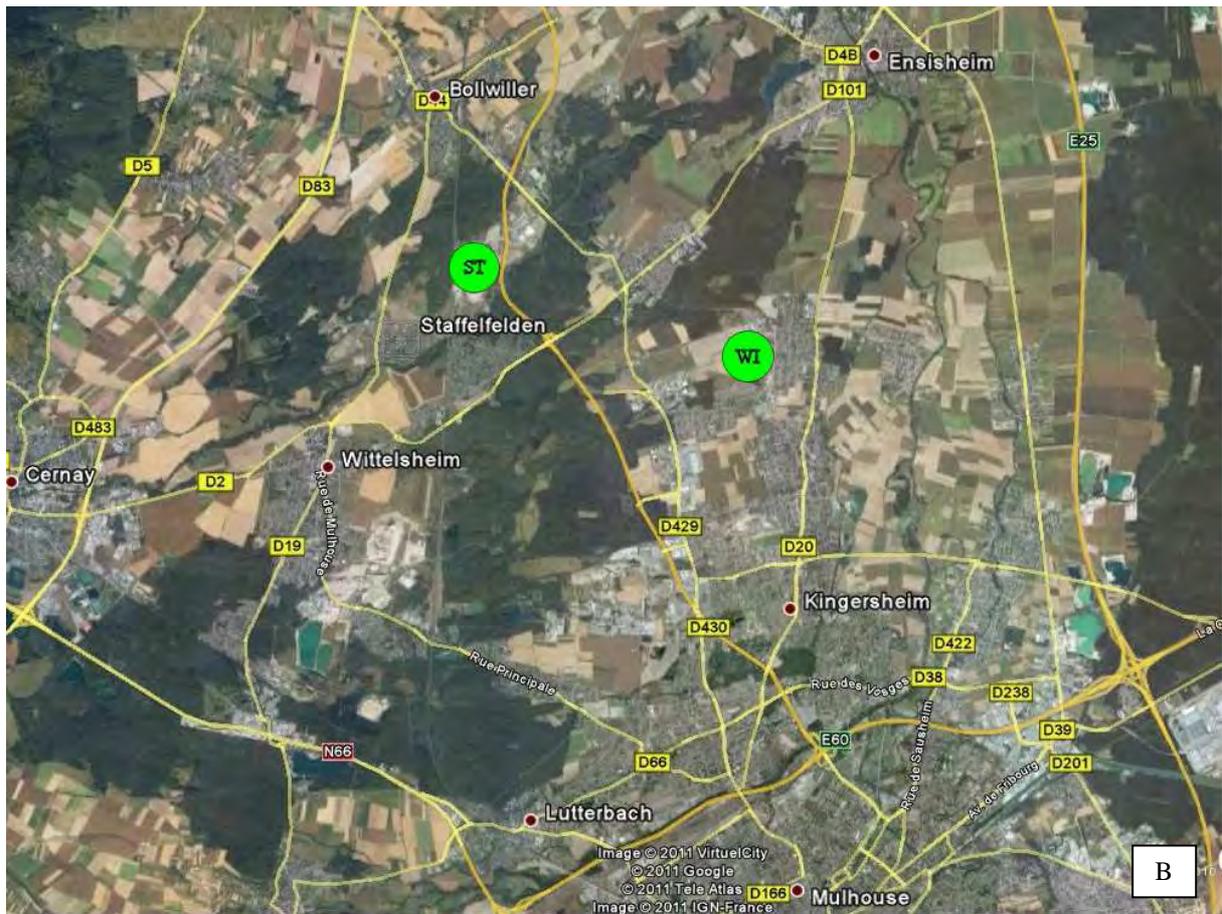


Figure 3 B : Localisation précise des sites du Haut-Rhin. Les codes des sites correspondent au mention du tableau 1.



Figure 4 : Prélèvement de la salive et des cellules épithéliales de la bouche sur un crapaud vert adulte mâle à l'aide d'un écouvillon sur la sablière Holcim à Lingolsheim le 29 mars 2011 © Victoria Michel

Chaque microsatellite a ensuite été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide d'un couple de primers dont l'un est lié à un marqueur fluorescent. Les résultats de ces amplifications ont été contrôlés sur gel d'agarose à 1,5% afin d'ajuster de manière optimale les conditions de PCR (températures et concentrations en $MgCl_2$) caractéristiques de chaque locus. Une fois définie, elles ont été appliquées à l'ensemble des échantillons.

Les produits des différentes PCR ont alors été regroupés en multiplexes puis mélangées à une solution de HiDi-Formamide associé un marqueur de taille (GENESCAN 500 LIZ, Applied Biosystem, Foster, Californie, USA). La fluorescence présente dans chaque préparation a alors pu être détectée par un séquenceur automatique (AB3130x1, Applied Biosystem, Bâle, Suisse) et la taille des différents allèles a pu être déterminée grâce à l'utilisation du logiciel PEAK SCANNER v.1.0 (Applied Biosystem).

5. Analyses statistiques

5.1. Détection des allèles nuls

Les allèles non amplifiés par PCR (allèles nuls) ont été recherchés dans chacune de nos populations et pour chaque marqueur à l'aide du logiciel MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout, 2004). Afin de limiter les erreurs d'analyses associées à leur présence, les microsatellites qui possédaient une forte probabilité de contenir un ou plusieurs allèles nuls ont été retirés du jeu de données.

5.2. Détection des allèles liés

Les allèles situés sur un même chromosome (allèles liés) ont été mis en évidence avec le logiciel FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 1995). Pour des raisons similaires aux allèles nuls, les microsatellites concernés ont été retirés du jeu de données.

5.3. Différences génétiques entre les populations

Nous avons évalué graphiquement les degrés de séparation existants entre nos 12 populations de crapauds verts en effectuant une analyse factorielle de correspondance (AFC) à l'aide du logiciel GENETIX v.4.05 (Belkhir *et al.*, 2004).

5.4. Diversité et variabilité génétique

Le calcul des F-statistiques nous a permis d'estimer la diversité génétique de nos différentes populations de crapauds verts ainsi que celle associée à nos différents microsatellites. Les valeurs de l'hétérozygotie observée (H_O), de l'hétérozygotie attendue

(H_E), de la richesse allélique (A_R), du coefficient de consanguinité (F_{IS}) et de l'indice de fixation (F_{ST}) ont été déterminées à l'aide du logiciel FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 1995). Les allèles privés ont quant à eux été recherchés avec le logiciel GenAIEx v.6.4.1 (Peakall *et al.*, 2006).

La diversité génétique de nos microsatellites a été confrontée avec celle relevée par Dufresnes (2011) et Colliard (2009) chez des sous-espèces différentes de *Bufo viridis*, à l'aide d'une ANOVA à un facteur. Les valeurs moyennes du nombre d'allèles, de H_O et de H_E ont été comparées avec le logiciel SPSS v.16.0.

Les différences génétiques existantes entre nos différentes populations de crapauds verts ont d'une part été évaluées par comparaison des valeurs moyennes de H_O , H_E et A_R . Pour cela, nous avons réalisé une ANOVA à un facteur pour chacun de ces paramètres à l'aide du logiciel SPSS v.16.0. Suite aux résultats fournis par la structuration génétique des populations de crapauds verts alsaciennes, nous avons réitéré ce test entre chaque groupe de population détecté. Un test de Tukey nous a permis de comparer les valeurs des différents groupes entre eux.

D'autre part, les valeurs de F_{ST} ont été obtenues en comparant les populations deux à deux dans FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 1995). Une ANOVA à un facteur a également été effectuée pour comparer les valeurs de F_{ST} observés au sein et entre les groupes révélés par la structuration génétique des populations.

5.5. Structure des populations

La structure génétique des différentes populations de crapauds verts alsaciennes a été déterminée à partir du logiciel STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). L'analyse se base sur une méthode de clustering qui range les individus dans des groupes (cluster ou K) en fonction de leur génotype sans a priori de leur origine géographique. Nos tests ont été effectués en supposant que chacune de nos populations pouvait potentiellement constituer un groupe génétique distinct. C'est pourquoi nous avons fait varier K entre 1 et 12. Une approche bayésienne est utilisée pour intégrer la valeur de K qui donne la meilleure résolution aux données. Pour chaque valeur de K nous avons réalisé 25 simulations indépendantes et chaque simulation était composée de 500000 itérations précédées d'un *burn-in* de 100000 itérations. Le nombre correct de groupe a été identifié en confrontant la probabilité logarithmique des données [$\ln P(D)$] à sa valeur de delta K correspondante (Evanno *et al.*, 2005).

Nous avons réitéré les tests dans des conditions similaires pour chacun des groupes mis en évidence, afin d'identifier la présence ou l'absence de sous-groupes.

5.6. Isolement des populations

Les facteurs pouvant potentiellement expliquer l'isolement et donc la structuration génétique des différentes populations de crapauds verts alsaciennes ont été recherchés en réalisant trois tests de Mantel (Mantel, 1967) à l'aide du logiciel GenAlEx v.6.4.1 (Peakall *et al.*, 2006). Les tests de comparaisons sont appariés entre les populations et effectués avec 10000 répétitions.

Le premier test a consisté à évaluer le lien entre la différenciation génétique et l'isolement par la distance des populations. Afin d'obtenir une meilleure précision, la correction suggérée par Rousset, 1997 utilisant les valeurs de $F_{ST}/(1-F_{ST})$ par rapport au logarithme de la distance géographique (Rousset, 1997) a été utilisée pour les 12 populations de crapauds.

Suite aux résultats du premier test de Mantel ainsi que de ceux révélés par STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000), deux tests de Mantel ont été effectués sur les 10 populations du Bas-Rhin, distantes entre elles d'au maximum 19,2 kilomètres. Ils ont consisté à estimer séparément les liens existant entre les dissemblances génétiques des populations et le nombre de routes présentes entre ces populations ou la distance géographique séparant deux sites. Un test de corrélation de Spearman a également été effectué avec le logiciel R v.2.12.1 entre la distance géographique et le nombre de routes présentes entre chacun des sites de ce département.

Au vue des résultats mis en évidence par les tests précédents, nous avons jugé pertinent d'estimer la distance maximale pour laquelle nos différentes populations de crapauds verts montraient des relations de parenté. Pour y parvenir, nous avons effectué une analyse d'autocorrélation spatiale à l'aide du logiciel SPAGeDi v.1.3 (Hardy *et al.*, 2002) en nous focalisant uniquement sur les populations du Bas-Rhin pour des raisons similaires à celles indiquées ci-dessus. Les intervalles de distances ont été déterminés en fonction du nombre de comparaison par paire et la corrélation entre les distances géographiques et les affinités génétiques des individus a été calculée par l'indice de Moran (Moran, 1950 ; Sokal *et al.*, 1983).

5.7. Test de dispersion sexe-biaisée

Nous avons évalué les capacités de dispersions des crapauds verts en fonction de leurs sexes en calculant les indices d'affectations (AIC) à l'aide du logiciel GenAIEx v.6.4.1 (Peakall *et al.*, 2006).

Code des sites	Nombre de crapauds vert capturés	Nombre de mâles	Nombre de femelles
Bla	14	11	3
Bib	30	30	0
BO	26	25	1
DUT	30	28	2
GR	30	29	1
KR	30	29	1
LI	30	28	2
OS	30	28	2
MO	30	28	2
VA	25	19	6
ST	30	28	2
WI	27	24	3

Tableau 2 : Nombre de *Bufo viridis* capturés sur chacun des sites étudiés avec nombre de mâles et de femelles.

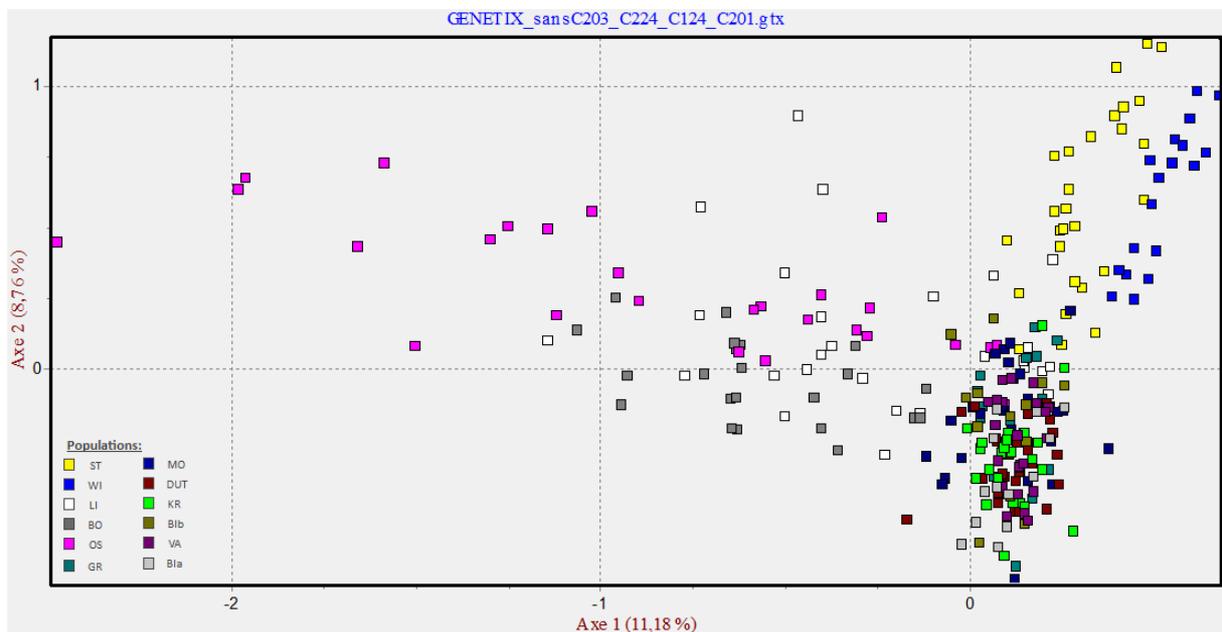


Figure 5 : Représentation graphique de la distance génétique existante entre les 12 populations de *Bufo viridis* alsaciennes. Chaque couleur correspond à une population différente. Chaque carré représente un individu. GENETIX v.4.05. (Belkhir *et al.*, 2004).

III – Résultats

1. Nombre de crapauds verts capturés

Nous avons capturé entre 14 et 30 adultes reproducteurs par site, ce qui nous a permis d'obtenir un nombre total de 332 échantillons d'ADN. Les prélèvements ont été réalisés sur 307 mâles et sur 25 femelles (Tableau 2).

2. Analyses génétiques

L'ensemble des prélèvements a permis d'extraire avec succès l'ADN présent sur les écouvillons. Toutefois, pour six individus (2%) issus de trois populations différentes, il s'est avéré que la concentration d'ADN était trop faible pour obtenir des résultats fiables pour les différents microsatellites, et ceci malgré un nombre accru de cycles lors de la PCR. C'est pourquoi nous avons préféré retirer ces individus du jeu de données.

D'autre part, au cours de la détermination de la taille des allèles, nous avons pu repérer l'existence de deux crapauds verts polyploïdes au sein de la population OS. En raison du fait que l'analyse de tels individus nécessite des méthodes différentes de celles utilisées pour des organismes diploïdes et au vu du faible nombre d'individus identifiés, nous avons choisi de les retirer de notre jeu de données. Il se peut cependant que d'autres animaux polyploïdes n'aient pas été détectés avec la seule analyse microsatellite.

Au final, toutes les analyses ont été effectuées sur 324 crapauds verts.

3. Allèles nuls et allèles liés

Pour chacune de nos populations, aucun allèle nul n'a pu être détecté par le logiciel MICRO-CHECKER. Par contre, FSTAT a montré que les microsatellites BaturaC124, BaturaC201, BaturaC203 et BaturaC224 sont liés entre eux. Nous les avons donc supprimés de notre jeu de données. En conséquence, seulement neuf microsatellites sur les treize de départ ont servi à l'analyse des données.

4. Différences génétiques entre les populations

Le graphe de l'AFC nous montre qu'il existe des dissemblances génétiques entre les différentes populations de crapauds verts alsaciennes (Figure 5). En effet, nous pouvons tout d'abord observer que les populations ST et WI tendent à s'éloigner de

Microsatellites	Taille (bp)	Nombre d'allèles	H _o	H _E	F _{IS}	F _{ST}
C107	223 - 227	2	0,085	0,082	-0,031	0,171
C205	172 - 222	6	0,587	0,539	-0,087	0,170
C218	168 - 220	10	0,664	0,642	-0,041	0,138
C223	168 - 196	6	0,886	0,649	-0,364	0,125
D105	188 - 213	5	0,422	0,411	-0,038	0,134
D106	211 - 225	3	0,200	0,173	-0,150	0,250
D210	174 - 178	2	0,046	0,040	-0,143	0,113
D5	114 - 147	3	0,024	0,022	-0,074	0,067
Bcallμ10	149 - 156	2	0,050	0,045	-0,117	0,195

Tableau 3 : Diversité et variabilité génétique des 9 loci microsatellites de *Bufo viridis* estimé à partir des caractéristiques génétiques de 324 individus. FSTAT v.2.9.3.2. (Goudet, 1995).

toutes les autres populations en suivant une direction similaire. Toutefois, il semblerait que ces deux populations évoluent de manière relativement indépendante l'une de l'autre. Les populations LI, BO et OS montrent également une différenciation génétique par rapport au reste des populations. Néanmoins, elles paraissent évoluer beaucoup plus conjointement que ST et WI. Les distances génétiques entre les autres populations se révèlent être relativement proches. Par ailleurs, les F_{IS} n'ont révélé aucune différence significative.

5. Diversité et variabilité génétique des microsatellites

Les caractéristiques génétiques des 324 crapauds verts révèlent que les neuf microsatellites conservés possèdent globalement un faible taux de polymorphisme (Tableau 3). En effet, nous pouvons observer que le nombre d'allèles par locus varie de 2 (C107, D210 et Bcall μ 10) à 10 (C218) et que 5 microsatellites sur 9 ne possèdent que 2 ou 3 allèles différents. Toutefois, ce taux de polymorphisme est significativement identique à celui présent chez une autre population de *Bufo viridis* originaire d'Italie (Dufresnes *et al.*, 2011) ainsi que chez trois autres espèces appartenant au sous-groupe de *Bufo viridis* (Colliard *et al.*, 2009) et qui ne sont pas en limite d'aire de répartition (respectivement ANOVA : $F_{1,16}=0$, $p>0,999$ et ANOVA : $F_{1,15}=0,174$, $p=0,683$).

Le taux d'hétérozygotie observé (H_O) par locus varie énormément en fonction du microsatellite considéré puisque sa valeur minimale est de 0,024 (D5) et qu'elle monte jusqu'à 0,886 (C223). Il s'avère être presque toujours légèrement supérieur au taux d'hétérozygotie attendue (H_E) qui lui varie entre 0,022 (D5) et 0,649 (C223). Par ailleurs, les valeurs les plus élevées de H_O et H_E sont atteintes par les loci les plus polymorphes. Les comparaisons des moyennes de H_O et H_E ne montrent aucune différence significative avec les résultats de Dufresnes *et al.* (2011) (H_O : ANOVA : $F_{1,16}=0,479$, $p=0,499$, H_E : ANOVA : $F_{1,15}=2,250$, $p=0,133$). Contrairement, H_E des crapauds verts alsaciens est significativement plus faible que celle des crapauds verts italiens (ANOVA : $F_{1,15}=4,867$, $p=0,043$) alors qu'aucune différence significative n'est observée pour H_O : ANOVA : $F_{1,15}=2,726$, $p=0,119$) (Colliard *et al.*, 2009).

D'autre part, tous les microsatellites présentent un excès d'individus hétérozygotes puisque toutes les valeurs de F_{IS} sont négatives. Ces dernières varient néanmoins fortement en fonction du locus considéré (le minimum est de -0,364 pour C223 alors que le maximum est de -0,031 pour C107). De plus, la valeur moyenne globale des F_{ST} est égale à 0,15 ce qui nous indique que l'indice de fixation n'est

Sites	N	H ₀	H _E	F _{IS}	F _{ST}	A _R	Nombre d'allèles privés
ST	30	0,295	0,276	-0,072 ^{NS}	0,199	1,928	1
WI	27	0,226	0,182	-0,242 ^{NS}	0,304	1,655	0
LI	30	0,448	0,400	-0,121 ^{NS}	0,106	2,972	0
BO	26	0,462	0,338	-0,366 ^{NS}	0,154	2,430	0
OS	28	0,440	0,397	-0,108 ^{NS}	0,160	2,999	3
GR	30	0,273	0,254	-0,074 ^{NS}	0,102	2,141	1
MO	30	0,338	0,296	-0,144 ^{NS}	0,127	2,227	1
DUT	30	0,319	0,304	-0,047 ^{NS}	0,106	2,091	0
KR	27	0,331	0,288	-0,150 ^{NS}	0,111	1,997	0
Bib	28	0,269	0,215	-0,253 ^{NS}	0,141	2,054	0
VA	25	0,260	0,239	-0,088 ^{NS}	0,125	1,777	0
Bla	13	0,291	0,282	-0,030 ^{NS}	0,130	1,889	0

Tableau 4 : Diversité génétique présente dans les 12 populations de crapauds verts alsaciennes étudiées, estimée à partir de 9 microsattellites. La significativité des F_{IS} a été testée avec 2160 simulations. FSTAT v.2.9.3.2. (Goudet, 1995). GenAlEx v.6.4.1 (Peakall *et al.*, 2006). (NS non significatif).

Sites	ST	WI	LI	BO	OS	GR	MO	DUT	KR	Bib	VA	Bla
ST (n=30)	0											
WI (n=27)	0,226 *	0										
LI (n=30)	0,111 *	0,281 *	0									
BO (n=26)	0,214 *	0,367 *	0,050 *	0								
OS (n=28)	0,181 *	0,269 *	0,123 *	0,113 *	0							
GR (n=30)	0,173 *	0,288 *	0,080 *	0,112 *	0,117 *	0						
MO (n=30)	0,206 *	0,256 *	0,112 *	0,162 *	0,129 *	0,077 *	0					
DUT (n=30)	0,210 *	0,288 *	0,076 *	0,136 *	0,159 *	0,046 *	0,015 ^{NS}	0				
KR (n=27)	0,212 *	0,313 *	0,092 *	0,145 *	0,146 *	0,043 ^{NS}	0,061 *	0,018 ^{NS}	0			
Bib (n=28)	0,189 *	0,354 *	0,074 *	0,124 *	0,185 *	0,058 *	0,161 *	0,101 *	0,102 *	0		
VA (n=25)	0,217 *	0,326 *	0,095 *	0,134 *	0,166 *	0,039 *	0,138 *	0,083 *	0,052 *	0,075 *	0	
Bla (n=13)	0,248 *	0,379 *	0,077 *	0,132 *	0,175 *	0,085 *	0,081 *	0,038 ^{NS}	0,037 ^{NS}	0,132 *	0,047 ^{NS}	0

Tableau 5 : Détermination de l'indice de fixation (F_{ST}) par comparaison par paire des 12 populations de crapauds verts à l'aide des données fournies par 9 microsattellites. FSTAT v.2.9.3.2. (Goudet, 1995) (NS non significatif, * p<0,05).

globalement pas très marqué puisque la valeur seuil pour les amphibiens généralement acceptée est de 0,2 à 0,25 (Beebee, 2010 ; Frankham *et al.*, 2007).

6. Diversité, variabilité et différenciation génétique des populations

De manière générale, les ANOVA à un facteur n'ont révélé aucune différence significative dans les comparaisons des valeurs de A_R , H_O et H_E entre nos 12 populations de crapauds verts alsaciennes (A_R : ANOVA : $F_{11,96}=1,030$, $p=0,427$; H_O : ANOVA : $F_{11,96}=0,454$, $p=0,926$; $F_{11,96}=0,436$, H_E : $p=0,936$).

Néanmoins nous pouvons remarquer que la population WI présente les valeurs les plus faibles de H_O (0,226), H_E (0,182) et A_R (1,665) (Tableau 4). Cette tendance semble se retrouver dans la population ST qui, malgré la présence d'un allèle privé montre une richesse allélique ($A_R=1,928$) plus faible que la moyenne calculée à partir des différentes populations (A_R : $\mu=2,180$).

Les populations LI, BO et OS affichent quant à elles les valeurs de H_O , H_E et A_R les plus élevées (respectivement : $H_O = 0,448$, $H_E = 0,400$ et $A_R = 2,972$; $H_O = 0,462$, $H_E = 0,338$ et $A_R = 2,430$; $H_O = 0,440$, $H_E = 0,397$ et $A_R = 2,999$). Par ailleurs, il est important de signaler que la population OS est celle qui contient le nombre le plus élevé d'allèles privés (3), la richesse allélique la plus marquée ainsi que l'existence d'individus polyploïdes.

Les autres populations n'exposent pas de tendances particulières puisque leurs valeurs de H_O , H_E et A_R sont relativement proche des moyennes respectives (H_O : $\mu=0,329$; H_E : $\mu=0,289$ et A_R : $\mu=2,180$). Toutefois, deux populations semblent se détacher des autres en raison du fait qu'elles contiennent chacune un allèle privé (GR et MO).

Le coefficient de consanguinité (F_{IS}) se révèle être négatif pour l'ensemble des populations (Tableau 4), laissant sous-entendre la présence d'un nombre excessif d'individus hétérozygotes par rapport à ce qui serait attendu si les populations étaient à l'équilibre de Hardy-Weinberg. C'est la population BO qui semble en posséder le plus ($F_{IS}=-0,366$) alors que BIa semble davantage suivre une reproduction panmictique ($F_{IS} = -0,03$) (les croisements s'effectuent de manière aléatoire dans la population).

D'autre part, l'indice de fixation (F_{ST}) moyen pour nos 12 populations de crapauds verts est de 0,15 ce qui signifie que globalement elles possèdent encore une composition

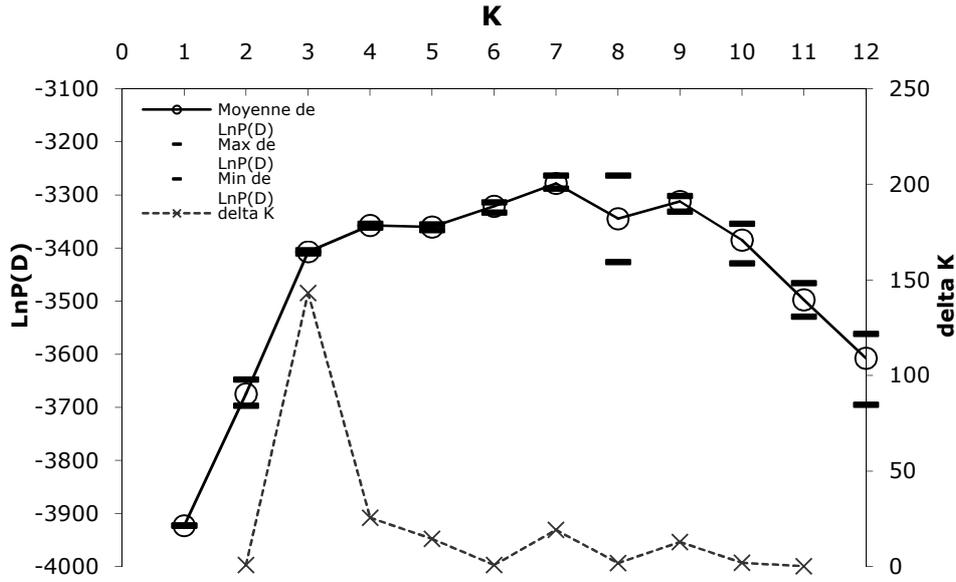


Figure 6 : Variation de la probabilité logarithmique des données [LnP(D)] et de delta K en fonction du nombre de groupes (K), déterminé à partir du jeu de donnée issue de 9 microsattellites et de 25 simulations pour chaque K avec le programme STRUCTURE v.2.3.3. (Pritchard *et al.*, 2000).

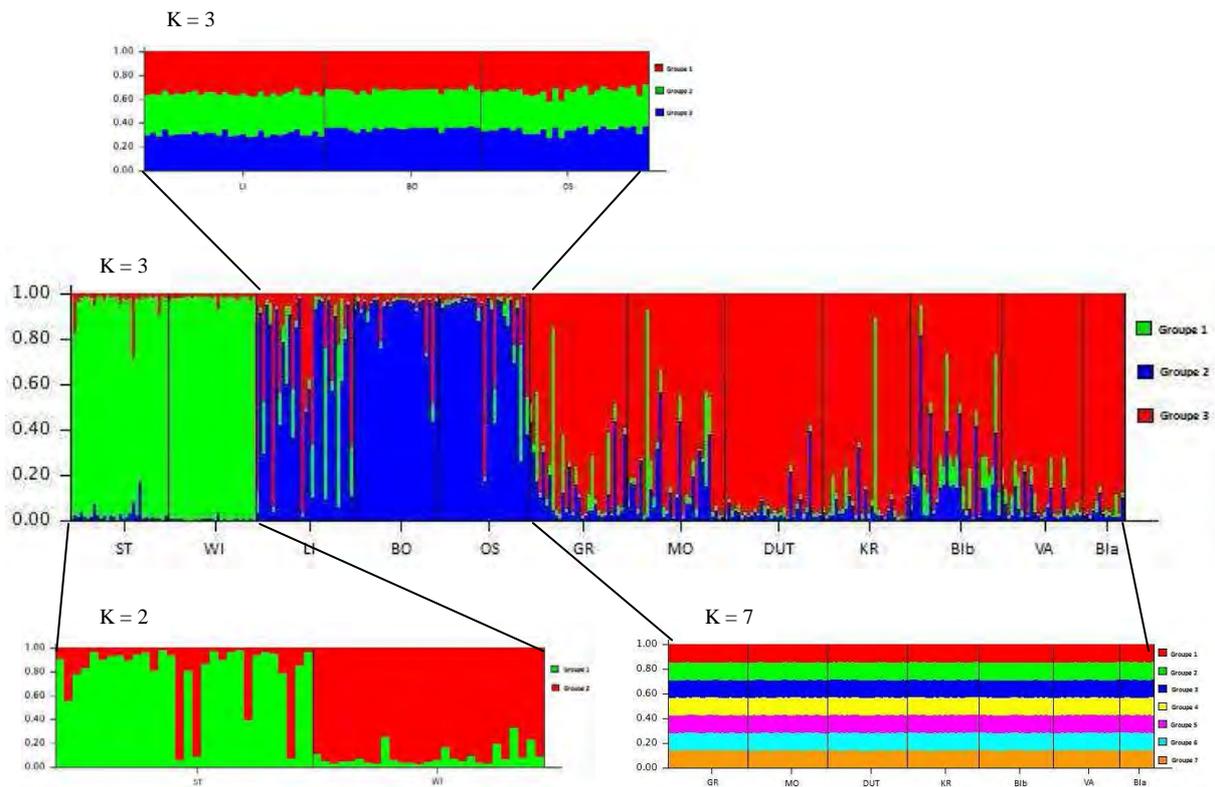


Figure 7 : Graphes d'affectation individuelle des crapauds verts en fonction de leurs caractéristiques génétiques issue de 9 microsattellites et de 25 simulations pour chaque K avec le programme STRUCTURE v.2.3.3. (Pritchard *et al.*, 2000). Les populations du groupe 1 montrent une tendance à se séparer alors que les populations des groupes 2 et 3 affichent une certaine unité quelque soit le K supposé.

génétique relativement proche. Toutefois, certaines tendances sont observables. En effet, la population WI montre une valeur de F_{ST} très élevée (0,304) indiquant qu'elle serait fortement isolée des autres populations alsaciennes ou bien qu'elle a subi une forte dérive dans le passé (Tableau 4). La population ST semble également assez isolée des autres du fait d'une valeur de F_{ST} de 0,199. Deux autres populations présentent aussi des valeurs de F_{ST} supérieures à la moyenne, il s'agit de BO et OS (F_{ST} respectif de 0,154 et 0,160).

La détermination des F_{ST} par comparaison par paires des 12 populations de crapauds verts alsaciennes nous indique que les populations ST, WI, LI, BO et OS sont toutes significativement différentes les unes des autres ainsi que des populations GR, MO, DUT, KR, BIb, VA et BIa (Tableau 5). Ces sept dernières populations montrent également des différences significatives entre elles à l'exception des couples KR-GR, DUT-MO, KR-DUT, BIa-DUT, BIa-KR et BIa-VA qui semblent plus proches génétiquement.

7. Structure des populations

L'analyse de STRUCTURE réalisée à partir du jeu de données associé à 9 microsatellites nous permet d'observer une structuration marquée de nos 12 populations de crapauds verts alsaciennes. En effet, l'estimation des probabilités logarithmiques des données [$\ln P(D)$] pour chaque K atteint la valeur maximale pour $K = 7$ (Figure 6). Néanmoins, nous pouvons observer un net pic de ΔK lorsque $K = 3$. En conséquence, cette analyse fait apparaître trois groupes génétiques distincts au plus haut niveau hiérarchique de la structure des populations de crapauds verts alsaciennes. Le premier groupe (métapopulation 1) serait constitué des populations du Haut-Rhin (ST et WI), le second groupe (métapopulation 2) comprendrait les populations de LI, BO et OS et enfin le dernier groupe (métapopulation 3) contiendrait les sept populations restantes, à savoir GR, MO, DUT, KR, BIb, VA et BIa.

Il existerait également une structure complémentaire à celle des trois principaux groupes (Figure 7). En effet, les populations ST et WI semblent également se scinder en deux groupes génétiques distincts. Au contraire, aucun sous-groupe ne semble se dessiner pour les deux autres principaux groupes et ceci quelque soit le K supposé.

	F_{ST}
Métapopulation 1	0,226
Métapopulation 2	0,095
Métapopulation 3	0,071

Tableau 6 : Valeurs des F_{ST} présentes au sein de chaque métapopulation.

	F_{ST}
Métapopulation 1 - Métapopulation 2	0,237
Métapopulation 1 - Métapopulation 3	0,261
Métapopulation 2 - Métapopulation 3	0,125

Tableau 7 : Valeurs des F_{ST} entre chaque métapopulation.

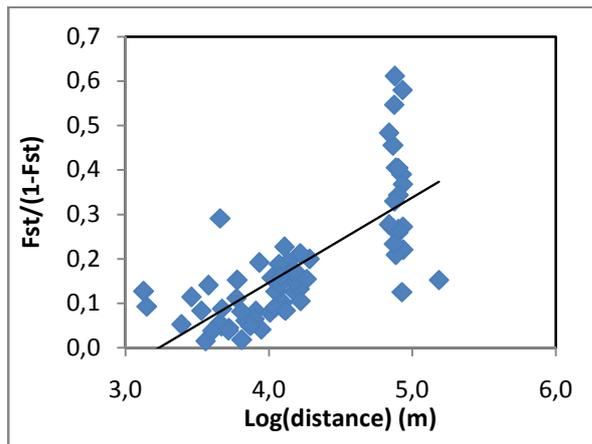


Figure 8 : Graphe représentant l'isolement par la distance des 12 populations de crapauds verts ($R^2=0,534$). GenAlEx v.6.4.1 (Peakall *et al.*, 2006). Les comparaisons sont appariées entre les populations.

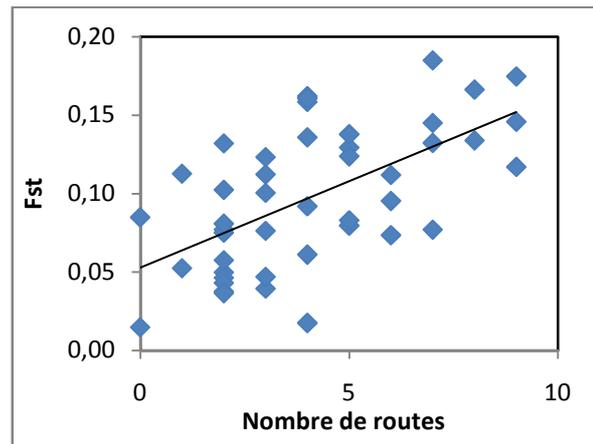


Figure 9 : Graphe représentant l'isolement par la fragmentation routière des 10 populations de crapauds verts du Bas-Rhin ($R^2=0,359$). GenAlEx v.6.4.1 (Peakall *et al.*, 2006). Les comparaisons sont appariées entre les populations.

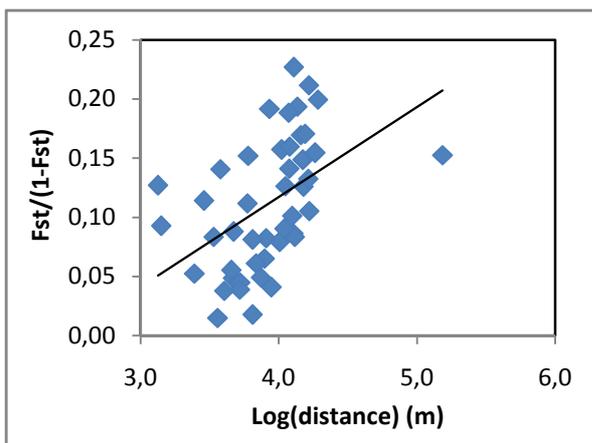


Figure 10 : Graphe représentant l'isolement par la distance des 10 populations de crapauds verts du Bas-Rhin ($R^2=0,225$). GenAlEx v.6.4.1 (Peakall *et al.*, 2006). Les comparaisons sont appariées entre les populations.

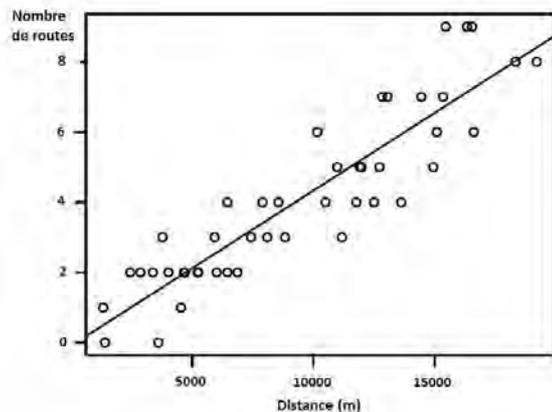


Figure 11 : Graphe représentant la corrélation entre le nombre de routes et la distance géographique des sites du Bas-Rhin ($R^2=0,9$). R v.2.12.1

8. Diversité et variabilité génétique entre les trois principaux groupes génétiques

Le test de Tukey réalisé entre les trois principaux groupes génétiques révèle que la richesse allélique est significativement différente (ANOVA : $F_{2,105}=4,900$, $p=0,009$) entre eux. Par contre, aucune différence significative n'est observée pour H_O et H_E (respectivement ANOVA : $F_{2,105}=2,372$, $p=0,098$ et ANOVA : $F_{2,105}=1,859$, $p=0,161$).

Les comparaisons deux à deux de ces groupes nous apprennent que les groupes 1 et 2 sont significativement différents entre eux pour les trois paramètres (A_R : ANOVA : $F_{1,43}=7,906$, $p=0,007$; H_O : ANOVA : $F_{1,43}=4,439$, $p=0,041$ et H_E : ANOVA : $F_{1,43}=4,217$, $p=0,046$) alors qu'au contraire les groupes 1 et 3 ne montrent aucune différence significative (A_R : ANOVA : $F_{1,79}=0,513$, $p=0,476$; H_O : ANOVA : $F_{1,79}=0,150$, $p=0,7$ et H_E : ANOVA : $F_{1,79}=0,232$, $p=0,631$). Les deux groupes du Bas-Rhin ne présentent des différences significatives que pour A_R et H_O (A_R : ANOVA : $F_{1,106}=9,330$, $p=0,003$; H_O : ANOVA : $F_{1,106}=4,619$, $p=0,034$ et H_E : ANOVA : $F_{1,106}=3,479$, $p=0,065$).

Enfin la comparaison des moyennes des valeurs de F_{ST} au sein chaque métapopulation avec celles existantes entre les différentes métapopulations ne soulève aucune différence significative (F_{ST} : ANOVA : $F_{1,4}=1,172$, $p=0,292$). Toutefois, excepté la métapopulation du Haut-Rhin ($F_{ST}=0,226$), nous pouvons observer que les valeurs de F_{ST} au sein d'une métapopulation sont toujours plus faibles que celles existante entre les métapopulations (Tableau 6 et 7).

9. Isolement des populations

Le premier test de corrélation de Mantel nous informe que la différence génétique entre deux populations de crapauds verts est dépendante de la distance qui les sépare (Figure 8). Toutefois, nous pouvons remarquer que les populations les plus éloignées les unes des autres ne suivent plus cette tendance. Seules les populations du Bas-Rhin apparaissent comme dépendantes du facteur distance. Le flux de gène entre les populations du Haut-Rhin est donc beaucoup plus réduit que celui des populations du Bas-Rhin.

Dans le Bas-Rhin, le réseau routier se montre également être un facteur intervenant sur la différenciation génétique des crapauds verts (Figure 9). En effet, le second test de Mantel nous informe que les dissemblances génétiques entre deux populations sont corrélées avec le nombre de routes les séparant. Ce facteur se révèle même avoir un impact plus important que la distance puisque le coefficient de corrélation

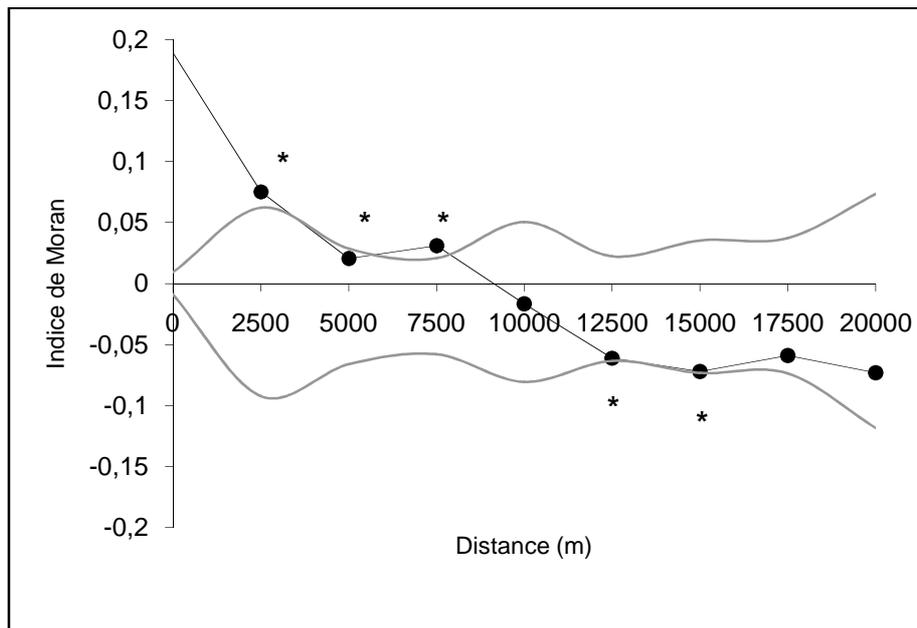


Figure 12 : Graphe représentant l'autocorrélation spatiale des 10 populations de crapaud vert Bas-rhinoises étudiées. Les lignes grises correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. SPAGeDi v.1.3 (Hardy *et al.*, 2002) (* $p < 0,05$).

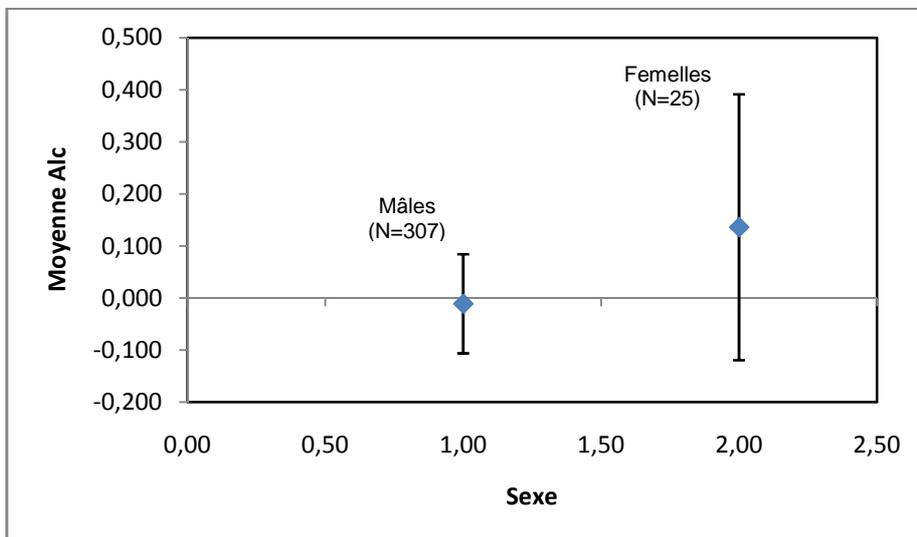


Figure 13 : Estimation de l'indice d'affection (Aic) des crapauds verts en fonction de leur sexe. GenAIEx v.6.4.1 (Peakall *et al.*, 2006)

est 0,359 alors qu'il atteint les 0,255 pour la distance (Figure 10). Il existe néanmoins une forte corrélation entre ces deux facteurs (Figure 11, $R^2=0,90$, $p<10^{-16}$).

Le graphe représentant l'autocorrélation spatiale des dix populations de crapauds verts Bas-Rhinoises étudiées nous informe que les individus sont apparentés entre eux jusqu'à des distances de 7500m (Figure 12). En effet, au-delà de cette distance, les ressemblances entre les sites ne sont plus significatives.

10. Sexe-biaisé

Le calcul de l'indice d'affectation (A_{ic}) pour les mâles et les femelles nous montre que les mâles ont une probabilité plus faible que les femelles d'être nés sur le site de capture puisque leur valeur d'A_{ic} est de -0,011 alors que celui des femelles est de 0,136 (Figure 13). En d'autres termes, cela signifie que les mâles semblent se disperser davantage que les femelles. Toutefois aucune différence significative n'est à souligner.

IV – Discussion

1. Structure des populations

L'analyse génétique que nous avons effectuée sur la population de crapaud vert alsacienne nous informe de l'existence d'une structuration génétique particulière. En effet, nos résultats nous indiquent que les différentes populations que nous avons étudiées correspondraient en réalité à des sous-unités populationnelles liées entre elles pour constituer des ensembles de grande taille. De ce fait, il existerait en Alsace trois métapopulations de crapaud vert. La première comprendrait les populations situées dans le Haut-Rhin, la seconde rassemblerait les populations les plus proches de l'agglomération de Strasbourg et la dernière serait constituée des individus présents dans le triangle formé par les villes de Molsheim, Duttlenheim et Valff. Alors que les différentes sous-unités des métapopulations du Bas-Rhin affichent une certaine unité, celles du Haut-Rhin manifestent au contraire une tendance à la séparation.

Leur dépendance au milieu aquatique fait que les amphibiens résident naturellement sur des patches d'habitats disjoints. En conséquence, la structure en métapopulations de ces espèces est fortement dépendante des capacités de dispersion des individus ainsi que des caractéristiques paysagères séparant les différents patches d'habitats (Smith *et al.*, 2005).

1.1. Dispersion des individus

De nombreuses études sur les amphibiens ont permis de prouver que les Bufonidae possédaient des capacités de dispersions élevées (Smith *et al.*, 2005). Par exemple, il a été prouvé que *Bufo marinus*, l'un des plus grands anoues du monde, pouvait parcourir jusqu'à 35 kilomètres en un an (Smith *et al.*, 2005). Le crapaud vert est capable de se disperser sur d'assez longues distances selon les conditions environnementales du milieu. S'il ne s'éloigne en général que de quelques centaines de mètres de son site de reproduction (600 à 1800 mètres), il lui est en effet possible de parcourir de 8 à 10 kilomètres pour coloniser de nouveaux habitats favorables (Stöck *et al.*, 2008). Ses capacités de dispersion semblent même supérieures à celles du crapaud calamite, *Bufo calamita*, une autre espèce pionnière à la morphologie similaire (Stöck *et al.*, 2008). Ces données sont cohérentes avec nos observations de capture-marquage-

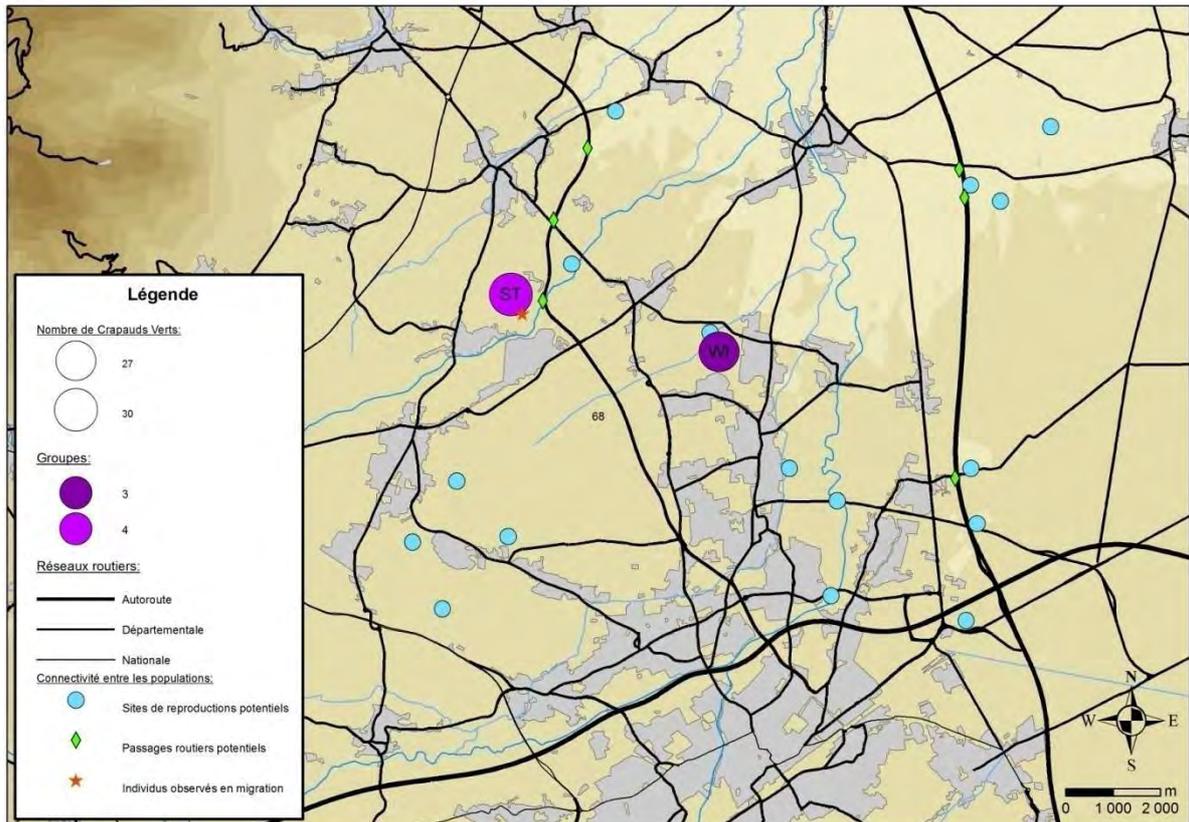


Figure 14 : Analyse de la connectivité entre les populations de crapauds verts échantillonnées dans le Haut-Rhin. La carte a été réalisée à partir des observations réalisées par BUFO entre 2007 et 2011. ArcGIS v.9.3.

recapture, puisque nous avons observé une femelle reproductrice ayant parcouru environ 300 mètres en cinq jours.

Nos résultats indiquent aussi que ces capacités de dispersion ne seraient pas équivalentes entre les mâles et les femelles. En effet, bien que l'intervalle de confiance de ce résultat soit important du fait du faible nombre de femelles échantillonnées, le calcul de l'AIC laisse supposer que les femelles seraient beaucoup plus philopatriques que les mâles. Ce constat est surprenant car une étude de capture-marquage-recapture effectué sur *Bufo calamita* a montré que les mâles reproducteurs étaient extrêmement fidèles à leurs sites de reproduction et qu'au contraire, les femelles orientaient leurs choix en fonction de celui des mâles (Sinsch, 1992).

Malgré le fait que les crapauds adultes soient capables de parcourir plusieurs kilomètres entre différents patches d'habitats, des études montrent que les plus grandes dispersions seraient effectuées par les crapelets tout juste métamorphosés (Safner *et al.*, 2011 ; Stevens *et al.*, 2004). Par exemple, une étude de capture-marquage-recapture sur le sonneur à ventre jaune, *Bombina variegata*, un petit crapaud caractéristique des milieux forestiers, a montré que les jeunes étaient capables de sillonner des distances atteignant 3,8 kilomètres en seulement 15 jours (Pichenot, 2008). Ce comportement serait déclenché par la surpopulation régnante autour des points d'eaux à cette période de l'année ainsi que par le risque élevé de prédation (Stevens, 2006). Une étude sur le comportement de dispersion des jeunes serait intéressante à mettre en place afin de savoir s'ils participent activement aux échanges génétiques entre les sites.

1.2. Le paysage

La connexion entre les différents patches d'habitats est également dépendante des caractéristiques paysagères qui les séparent. En effet, la migration des individus est assujettie d'une part à la nature des écosystèmes et d'autre part à la configuration spatiale des différents éléments entre eux (Safner *et al.*, 2011).

Dans le Haut-Rhin, nos résultats nous informent que les sous-unités de cette métapopulation ont une nette tendance à se séparer en deux sous-populations. Dans ce département, le réseau forestier est bien développé, en particulier entre les deux sites que nous avons suivis. Des études sur le crapaud calamite ont révélé que les crapelets se déplaçaient beaucoup facilement sur les sols sablonneux et sur les routes que dans un milieu boisé en raison d'une résistance aux mouvements beaucoup plus réduite (Stevens,

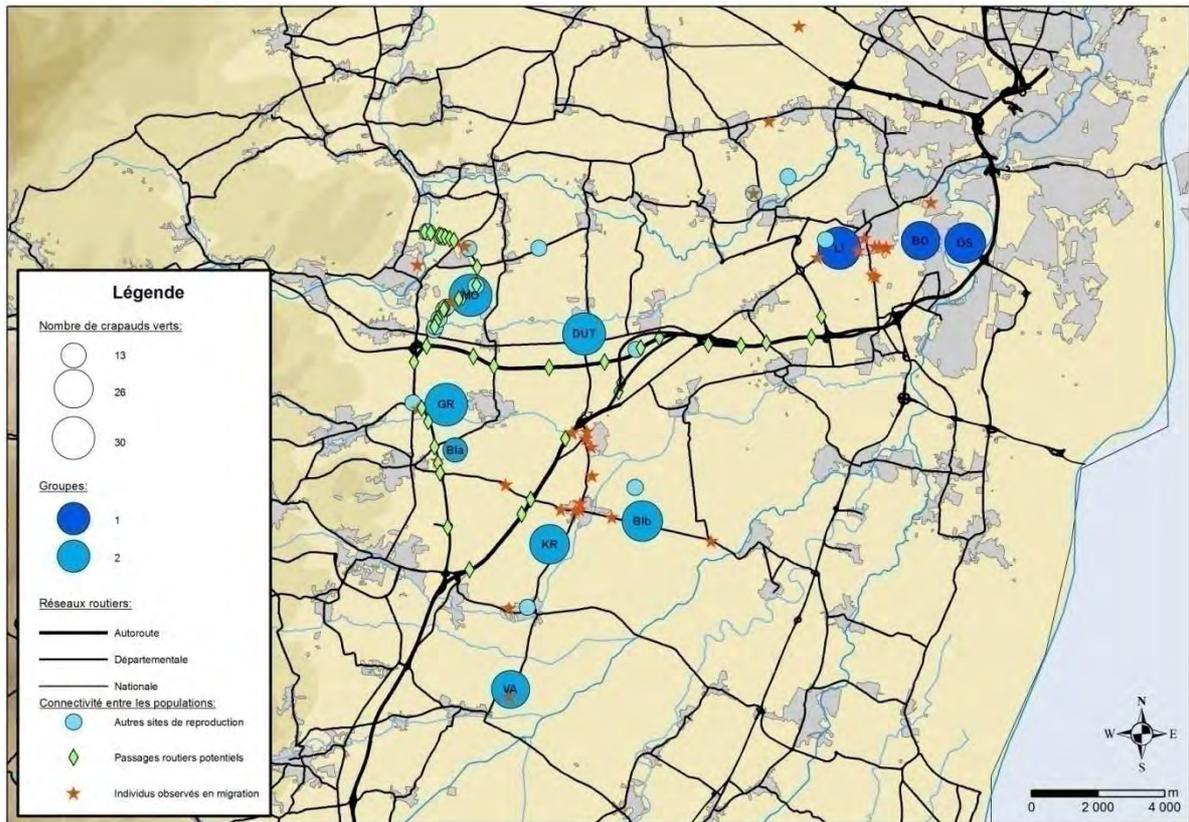


Figure 15 : Analyse de la connectivité entre les populations de crapauds verts échantillonnées dans le Bas-Rhin. La carte a été réalisée à partir des observations réalisées par BUFO entre 2007 et 2011. ArcGIS v.9.3.

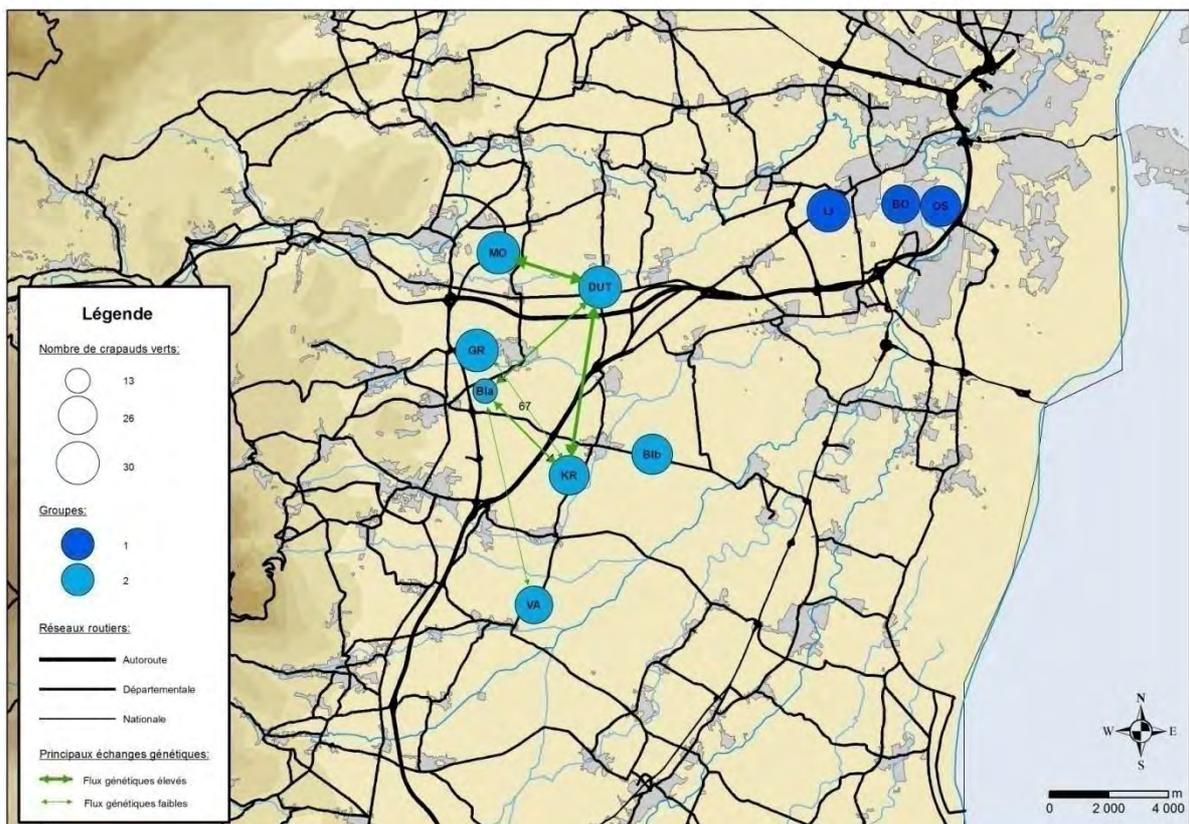


Figure 16 : Représentation des principaux flux génétiques existant entre les différents sites à crapauds verts étudiés dans la Bas-Rhin. ArcGIS v.9.3.

2006 ; Stevens *et al.*, 2004). Cette observation pourrait donc expliquer pourquoi les crapauds verts ne traversent pas ou peu le milieu boisé présent, d'autant plus que ces derniers semblent éviter davantage les habitats forestiers par rapport au crapaud calamite (Stöck *et al.*, 2008). Cependant, il reste surprenant que ces Bufonidae ne s'observent que dans un seul autre site, très proche de WI, alors que plusieurs autres sites de reproduction sont potentiellement favorables (Figure 14). Une des explications possibles serait que ces amphibiens sont incapables de traverser les cours d'eaux de grande taille (l'Ill et la Thur séparent les différents sites). Une seconde justification serait l'absence d'un nombre suffisant de passages routiers utilisable par ces animaux dans les zones de milieux ouverts (Figure 14).

Dans le Bas-Rhin, les crapauds verts se répartissent en deux métapopulations bien distinctes. La cassure s'observe entre les populations de Duttlenheim et de Lingolsheim qui sont distantes de plus de 8 kilomètres. Il semblerait donc que les crapauds verts soient incapables de parcourir de telles distances sans l'existence intermédiaire de patches d'habitats favorables (Figure 15). Associé à cela, cette zone est essentiellement composée de terres agricoles cultivées de manière intensive. Normalement, ce type d'habitat ne pose pas de problème pour la dispersion du crapaud vert (Stöck *et al.*, 2008). Il serait donc intéressant de mener des études de suivi par télémétrie pour comprendre l'utilisation de l'habitat terrestre par le crapaud vert dans ce secteur. De plus, nous pouvons observer une fragmentation non négligeable des paysages par les principaux axes routiers. Bien que quelques passages potentiellement utilisables par les amphibiens existent au niveau de l'autoroute A35 reliant Strasbourg à Colmar, aucun n'est présent sur la départementale D400 située entre Lingolsheim et Entzheim (Bas-Rhin). Or la circulation quotidienne y est dense ce qui la rendrait infranchissable pour les amphibiens.

2. Relations entre les unités de populations de *Bufo viridis* en Alsace

Les analyses des flux génétiques existant entre nos différentes populations étudiées montrent que, de manière générale, les connexions entre les métapopulations sont réduites et qu'au contraire, elles seraient beaucoup plus abondantes au sein d'une métapopulation donnée (à l'exception de celle du Haut-Rhin). Ces échanges génétiques seraient même particulièrement abondants entre les sept sous-populations du Bas-Rhin les plus éloignées de l'agglomération de Strasbourg (Figure 16) et ceci malgré la présence d'un réseau routier conséquent. Bien que plusieurs passages potentiels semblent utilisables par les amphibiens sur les axes principaux (Figure 15), cette observation reste

surprenante au vu de l'impact causé par la départementale D400. Selon nous, l'influence routière, si elle est effectivement présente, n'a pas pu encore être détectée. En effet, les derniers tronçons routiers de cette zone ont été mis en service qu'à la fin de l'année 2010, ce qui est extrêmement récent comparée à la départementale D400 qui date du début des années 1990. Associé à cela, il nous semble important de rappeler ici que nous n'avons échantillonné que des individus sexuellement matures. Sachant qu'un crapaud vert atteint sa maturité sexuelle à trois et quatre ans selon son sexe et qu'ils ont une espérance de vie d'environ onze ans (Stöck *et al.*, 2008), les résultats obtenus ici ne reflètent pas l'état des populations de la génération 2011. En effet, ils renvoient à celui d'individus nés il y a au minimum trois ans. De plus, l'impact d'une perturbation est plus rapidement observable pour des populations de faible effectif. En conséquence, pour une métapopulation, il peut arriver que le contrecoup d'un bouleversement soit détecté qu'avec un *posteriori* de plusieurs années.

D'autre part, nos résultats montrent un penchant vers une isolation pour les populations OS et BO. Cela pourrait refléter le manque de flux de gènes entre la métapopulation à laquelle ces sous-unités appartiennent et la seconde métapopulation du Bas-Rhin. Ces fortes valeurs de F_{ST} pourraient aussi être causées par un faible effectif de ces sous-populations.

Enfin, trois unités-populationnelles du Bas-Rhin et une du Haut-Rhin ont montré posséder un ou plusieurs allèles privés. En conséquence nous pouvons supposer que se sont préférentiellement ces quatre sous-unités qui se comportent en source et les autres plutôt en puits.

3. Diversité génétique des populations de *Bufo viridis*

3.1. Diversité génétique des métapopulations alsaciennes

Nos évaluations de la diversité génétique des différentes métapopulations de crapauds verts nous a permis de découvrir qu'en Alsace, cette espèce possédait une diversité génétique relativement élevée puisque le taux d'hétérozygotie est particulièrement important. Cette caractéristique génétique semble même être spécifique à *Bufo viridis* puisqu'une étude génétique effectuée avec des allozymes sur des populations de crapauds verts grecs a montré des résultats similaires (Karakousis *et al.*, 1995).

Les comparaisons des spécificités génétiques de nos sous-unités populationnelles avec celles recueillies sur des populations situées plus centralement dans l'aire de répartition du crapaud vert (Dufresnes *et al.*, 2011 ; Colliard *et al.*, 2009), indiquent que nos

métapopulations posséderaient une diversité génétique suffisante pour arriver à se maintenir sur le long terme.

D'autre part, des différences de diversité ont nettement été mises en évidence entre les trois métapopulations, alors qu'elles étaient absentes à l'échelle inférieure des unités-populationnelles. Cela vient renforcer l'existence de telles organisations populationnelles pour le crapaud vert. C'est la métapopulation du Haut-Rhin qui montre la diversité génétique la plus faible se qui confirme sa tendance à l'isolement. Contrairement, c'est la métapopulation la plus proche de Strasbourg qui affiche la diversité génétique la plus élevée. Ce résultat est surprenant puisque les sous-unités populationnelles OS et BO montrent également une tendance à se séparer des autres unités. Nous pouvons donc supposer que cette observation est causée par la présence d'individus polyploïdes.

3.2. Les crapauds verts polyploïdes

La découverte de crapauds verts polyploïdes au sein d'une sous-population du Bas-Rhin est une information inattendue et particulièrement intéressante. En effet, aucune donnée de ce genre n'a été enregistrée par le passé dans les populations européennes. Nous pensons que leur présence pourraient soit provenir d'un lâché d'animaux issu d'un particulier, soit correspondre à une adaptation mis en place par ces amphibiens pour conserver une diversité génétique suffisante au maintien de populations viables. Toutefois, notre échantillon a montré une occurrence de 6% d'individus polyploïdes sur le site concerné. Au vue de la structure en métapopulation, il est fort probable que les effectifs atteignent plusieurs centaines d'individus dans cette zone. Il serait donc intéressant de continuer les investigations sur l'étendue de la polyploïdie au sein des populations de crapauds verts alsacienne, en travaillant sur d'autres marqueurs génétiques comme par exemple ceux de l'ADN mitochondrial.

3.3. Sélection contre la consanguinité

La consanguinité est l'un des problèmes majeurs des populations de petites tailles et fortement isolées. Elle est souvent la cause d'une diminution de la fitness des individus et donc d'une réduction des effectifs des populations. Toutefois, il a par exemple été démontré chez *Rana latastei* que la sélection pouvait agir contre ce phénomène en favorisant les individus hétérozygotes (Ficetola *et al.*, 2011). Chez les amphibiens, la sélection aurait lieu au cours des étapes du développement, entre l'éclosion et la métamorphose des têtards. Sa réalisation se manifesterait par une augmentation de l'hétérozygotie, une diminution des F_{IS} et des valeurs élevés de F_{ST} pour certain loci (Ficetola *et al.*, 2011). Toutes ces

caractéristiques ont été observées pour nos populations de crapauds verts. Nous pouvons donc supposer que ce phénomène pourrait bien se dérouler pour cette espèce afin d'augmenter la variabilité génétique des populations. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer les caractéristiques génétiques des pontes et des juvéniles de crapauds verts.

La forte hétérozygotie observée pourrait également provenir du comportement pionnier de cet amphibien. En effet, sa forte mobilité laisse supposer que la probabilité que deux individus apparentés se reproduisent entre eux est faible.

4. Implications pour la conservation

L'ensemble de nos résultats suggère que la structuration génétique des différentes populations de *Bufo viridis* alsaciennes en trois métapopulations résulte de l'impact de la fragmentation du paysage induite par les infrastructures routières et d'un isolement croissant des différents patches d'habitats favorables à la reproduction de l'espèce. En conséquence, il est primordial que, dans un premier temps, des projets de reconnexion soient développés dans les deux départements. Il pourrait s'agir par exemple de la création de nouveaux sites de reproduction entre les deux sous-populations du Haut-Rhin ou encore d'une augmentation du nombre de passages à petite faune au niveau des axes routiers dont le trafic est extrêmement dense comme cela est observé sur la route départementale D400 dans le Bas-Rhin. Placés à des endroits stratégiques, ils pourraient alors être utilisés en tant que corridors.

Ensuite, ces informations pourraient parfaitement être utilisées pour orienter les politiques d'aménagement du territoire (construction de routes, remembrement agricole, urbanisation) afin que les différents projets prennent en considération de manière plus pertinente et plus précise les exigences du crapaud vert.

Nos résultats font également ressortir une diversité génétique particulièrement faible dans le Haut-Rhin avec une tendance à une isolation des populations entre elles. Des mesures de reconnexions comme préconisées précédemment seraient également nécessaire dans ce contexte. Si toutefois de telles dispositions s'avéraient insuffisantes sur le moyen terme, il serait alors envisageable de proposer un ou plusieurs programmes de renforcement de populations par translocation ou échange d'individus issu de populations naturelles. De telles mesures ont par exemple été mises en place en Angleterre pour le crapaud calamite et la grenouille de Lessona (Baker *et al.*, 2011).

Au final, il semble indispensable que l'ensemble des sites de reproduction continue à être suivis et entretenus régulièrement. En effet, les comptages du nombre de

ponte et d'individus sont des informations qui permettent d'estimer la taille des populations. Ils renseignent sur les fluctuations d'effectif et donc sur l'état des populations. L'entretien des mares artificielles permet aussi d'assurer de façon pérenne la présence de sites de reproduction favorables à cette espèce, puisque qu'elle privilégie le maintien dans un état pionnier ou ouvert des milieux.

V - Conclusion et perspectives

Cette étude génétique sur les populations alsaciennes de crapauds verts (*Bufo viridis*) nous a permis de confirmer que cette espèce est fortement menacée en France continentale et tout particulièrement dans le département du Haut-Rhin. Il devient donc urgent de mettre en place des mesures de protection, de gestion et de conservation adaptées à ses besoins.

La découverte d'une structuration en métapopulation nous a déjà permis d'axer les futurs projets de conservation sur une échelle différente de celle supposée au départ. Toutefois, nous avons vu que cette organisation se révèle être fortement dépendante des capacités de dispersion de cet amphibien, ainsi que des caractéristiques paysagères de son environnement. Etant donné qu'aucune étude n'a encore été menée sur cette espèce en Alsace pour déterminer le type d'habitat terrestre qu'elle utilise préférentiellement, il serait intéressant d'utiliser la méthode de radiotracking pour déterminer les milieux qu'il utilise majoritairement pour ses déplacements, son hibernation ou sa période estivale. Elle nous renseignerait également sur ses capacités de dispersion. Ses informations seraient alors utiles pour choisir de manière optimale la localisation pour la mise en place, par exemple, de nouveaux sites de reproduction.

Une étude des conditions corporelles pourrait être effectuée en parallèle pour tenter de confirmer ou d'infirmer les comportements de dispersion que nous avons soulignée chez les individus adultes. Ces données pourraient également nous renseigner sur la qualité des milieux de reproduction du crapaud vert (Sinsch *et al.*, 2007) et donc servir d'étude pilote à un suivi d'écotoxicologie.

La découverte d'individus polyploïdes en Alsace est une observation tout à fait surprenante. Il serait donc intéressant d'en rechercher l'origine ainsi que son étendue en réalisant des études génétiques complémentaires. Cette étude pourrait très bien incorporer des populations françaises d'autres régions et/ou allemandes.

Néanmoins, il reste indispensable de continuer à réaliser un suivi régulier des différentes unités populationnelles de *Bufo viridis* afin de suivre l'évolution de l'impact des pressions anthropiques sur cet amphibien.

Bibliographie

- Anonyme.** 2010. Protocole d'hygiène pour limiter la dissémination de la Chytridiomycose lors d'interventions sur le terrain. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, 134, 47-50.
- Allentoft, M. E. & O'Brien, J.** 2010. Global amphibian declines, loss of genetic diversity and Fitness: a review. *Diversity*, 2, 47-71.
- Baker, J., Beebee, T. J. C., Buckley, J., Gent, A. & Orchard, D.** 2011. *Amphibian Habitat Management Handbook*. Bournemouth.
- Beebee, T. J. C.** 2010. Genetics in field ecology and conservation. In: *Ecology and Conservation*, (Ed. By W. J. Sutherland & C. Kenneth Dodd, JR), pp. 407-427.
- Belkhir, K., Borsa, P., Raufaste, N. & Bonhomme, F.** 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Blaustein, A. R. & Kiesecker, J. M.** 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters*, 5, 597-608.
- Broquet, T., Berset-Braendli, L., Emaresi, G. & Fumagalli, L.** 2007. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics*, 8, 509-511.
- Cavallo, D., De Vita, R., Eleuteri, P., Borkin, L., Ermechenko, V., Odierna, G. & Balletto.** 2002. Karyological and flow cytometric evidence of triploid specimens in *Bufo viridis* (Amphibia Anura). *Eur. J. Histochem*, 46: 159-164.
- Colliard, C., Sicilia, A., Moritz, C., Perrin, N. & Stöck, M.** 2009. New polymorphic microsatellite markers and development of mitotyping primers for West Mediterranean green toad species (*Bufo viridis* subgroup). *Permanent genetic resources note*, 1138-1140.
- Comité français de l'UICN.** 2009. La Liste rouge des espèces menacées en France. Reptiles et Amphibiens de France métropolitaine.
- Dixo, M., Metzger, J. P., Morgante, J. S. & Zamudio, K. R.** 2009. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation*, 142, 1560-1569.
- Dufresnes, C., Betto-Colliard, C., Perrin, N. & Stöck, M.** 2011. Thirteen polymorphic microsatellite markers for the European green toad *Bufo viridis viridis*, a declining amphibian species. *Conservation Genet Resour*, 3, 311-313.
- Duguet, R. & Melki, F.** 2003. *Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg*. Mèze : Biotope.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J.** 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- Fahrig, L.** 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 487-515.
- Ficetola, G. F., Garner, T. W. J., Wang, J. & De Bernardi, F.** 2011. Rapid selection against inbreeding in a wild population of a rare frog. *Evolutionary Applications*, 4, 30-38.
- Frankham, R., Ballou, J. D. & Briscoe, D. A.** 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. 617p.
- Frankham, R., Ballou, J. D. & Briscoe, D. A.** 2007. *A primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press. 220p.
- Gasc, J.-P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailović, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez Rica, J.P., Maurin, H., Oliveira, M.E., Sofianidou, T.S., Veith, M. & Zuiderwijk, K.** 1997. *Atlas of amphibians and reptiles in europe*. Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Gibbons, J. W., Scott, D. E., Travis, J. R., Buhlmann, K. A., Tuberville, T. D., Metts, B. S., Greene, J. L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S. & Winne, C. T.** 2000. The global decline of reptiles; Déjà Vu Amphibians. *Biosciences*, 50, 653-666.
- Goudet, J.** 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *The Journal of Heredity*, 86, 485-486.

- Grossenbacher, K.** 1988. *Atlas de distribution des Amphibiens de Suisse*. Neuchâtel.
- Hardy, O. J. & Vekemans, X.** 2002. Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618-620.
- Jehle, R. & Arntzen, J. W.** 2002. Review: Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological Journal*, 12, 1-9.
- Karakousis, Y. & Kyriakopoulou-Sklavounou, P.** 1995. Genetic and Morphological Différenciation among Populations of the Green Toad *Bufo viridis* from Northern Greece. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 39-45.
- Krauss, J., Bommarco, R., Guardiola, M., Heikkinen, R. K., Helm, A., Kuussaari, M., Lindborg, R., Öckinger, E., Pärtel, M., Pino, J., Pöyry, J., Raatikainen, K. M., Sang, A., Stefanescu, C., Teder, T., Zobel, M. & Steffan-Dewenter, I.** 2010. Habitat fragmentation causes immediate and time-delayed biodiversity loss at different trophic levels. *Ecology Letters*, 13, 597-605.
- Mantel, N.** 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research*, 27, 209-220.
- Moran, P. A. P.** 1950. Notes on the continuous stochastic phenomena. *Biometrika*, 37, 17-23.
- Munwes, I., Geffen, E., Roll, U., Friedmann, A., Daya, A., Tikochinski, Y. & Gafny, S.** 2010. The change in genetic diversity down the core-edge gradient in the eastern spadefoot toad (*Pelobates syriacus*). *Molecular Ecology*, 19, 2675-2689.
- Noël, S., Ouellet, M., Galois, P. & Lapointe, F.-J.** 2007. Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conservation Genet*, 8, 599-606.
- Peakall, R. & Smouse, P. E.** 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Pichenot, J.** 2008. Contribution à la Biologie de la Conservation du Sonneur à ventre jaune (*Bombina variegata* L.). Écologie spatiale et approche multi-échelles de la sélection de l'habitat en limite septentrionale de son aire de répartition, Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Pidancier, N., Miquel, C. & Miaud, C.** 2003. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetological Journal*, 13, 175-178.
- Poschadel, J. R. & Möller, D.** 2004. A versatile field method for tissue sampling on small reptiles and amphibians, applied to pond turtles, newts, frogs and toads. *Conservation Genetics*, 5, 865-867.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P.** 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics Society of America*, 155, 945-959.
- Reading, C. J., Luiselli, L. M., Akani, G. C., Bonnet, X., Amori, G., Ballouard, J. M., Filippi, E., Naulleau, G., Pearson, D. & L., R.** 2010. Are snake populations in widespread decline? *Biology letters*, 6, 777-780.
- Roth, P.** 1997. *Bufo viridis* Laurenti, 1768. In: *Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe* (Ed. by J.-P. Gasc, A. Cabela, J. Crnobrnja-Isailovic, D. Dolmen, K. Grossenbacher, P. Haffner, J. Lescure, H. Martens, J. P. Martínez Rica, H. Maurin, M. E. Oliveira, T. S. Sofianidou, M. Veith & A. Zuiderwijk), pp. 22-123. Paris: SEH/Muséum national d'Histoire naturelle (IEGB/SPN).
- Rousset, F.** 1997. Genetic Differentiation and Estimation of Gene Flow from FStatistics Under Isolation by Distance. *Genetics Society of America*, 145, 1219-1228.
- Safner, T., Miaud, C., Gaggiotti, O., Decout, S., Rioux, D., Zundel, S. & Manel, S.** 2011. Combining demography and genetic analysis to assess the population structure of an amphibian in a human-dominated landscape. *Conservation Genetics*, 12, 161-173.
- Sané, F. & Didier, S.** 2007. Typologie des sites de reproduction du crapaud vert (*Bufo viridis* Laurenti, 1768) en Alsace. *Ciconia*, 31:19-28.
- Sinsch, U.** 1992. Sex-biased sire fidelity and orientation behavior in reproductive natterjack toads (*Bufo calamita*). *Ethology Ecology & Evolution*, 4: 15-32.
- Sinsch, U., Leskovar, C., Drobig, A., König, A. & Grosse, W.-R.** 2007. Life-history traits in green toad (*Bufo viridis*) populations: indicators of habitat quality. *Canadian Journal of Zoology*,

85, 665-673.

- Smith, M. A. & Green, D. M.** 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography*, 28, 110-128.
- Sokal, R. R. & Wartemberg, D. E.** 1983. A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. *Genetics*, 105, 219-237.
- Stevens, V. M.** 2006. Dispersal in the Natterjack toad, a species with a fragmented distribution. Spatial ecology and conservation of a pond-breeding amphibian, Université catholique de Louvain.
- Stevens, V. M., Polus, E., Wesselingh, R. A., Schtickzelle, N. & Baguette, M.** 2004. Quantifying functional connectivity: experimental evidence for patch-specific resistance in the Natterjack toad (*Bufo calamita*). *Landscape Ecology*, 19, 829-842.
- Stöck, M., Lamatsch, D. K., Steinlein, C., Epplen, J. T., Grosse, W.-R., Hock, R., Klapperstück, T., Lampert, K. P., Scheer, U., Schmid, M. & Schartl, M.** 2002. A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. *Nature genetics*, 30, 325-328.
- Stöck, M., Moritz, C., Hickerson, M., Frynta, D., Dujsebajeva, T., Eremchenko, V., Macey, J. R., Papenfuss, T. J. & Wake, D. B.** 2006. Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 663-689.
- Stöck, M., Roth, P., Podloucky, R. & Grossenbacher, K.** 2008. *Wechselkröten – unter Berücksichtigung von Bufo viridis viridis Laurenti, 1768; Bufo variabilis (Pallas, 1769); Bufo boulengeri Lataste, 1879; Bufo balearicus Böttger, 1880 und Bufo siculus Stöck, Sicilia, Belfiore, Buckley, Lo Brutto, Lo Valvo & Arculeo, 2008.* In: Grossenbacher, K. (eds.): *Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas*. Vol. 5 (Froschlurche II). pp. 413-498. Aula-Verlag, Wiesbaden.
- Stöck, M., Ustinova, J., Lamatsch, D. K., Schartl, M., Perrin, N. & Moritz, C.** 2009. A vertebrate reproductive system involving three ploidy levels: hybrid origin of triploids in a contact zone of diploid and tetraploid palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup). *Evolution*, 64, 944-959.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L. & Waller, R. W.** 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306, 1783-1186.
- Temple, H. J. & Cox, N. A.** 2009. European Red List of Amphibians. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Thiriet, J. & Vacher, J.-P.** 2010. *Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles d'Alsace*: BUFO, Colmar/Strasbourg. 273p.
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W. H., Simberloff, D. & Swackhamer, D.** 2001. Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. *SCIENCE*, 292, 281-284.
- IUCN 2011.** *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1.* <<http://www.iucnredlist.org>>.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P.** 2004. MICRO-CHECKER : software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- Vucetich, J. A. & Waite, T. A.** 2003. Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range: Null hypotheses for landscape conservation genetics. *Conservation Genetics*, 4, 639-645.

Annexes

Compléments d'informations sur le crapaud vert :

Taxinomie

Règne: Animaux

Embranchement: Chordées

Classe: Amphibien

Ordre: Anoures

Famille: Bufonidae

Espèce: *Bufo viridis* Laurenti, 1768

Sous-espèce: *Bufo viridis viridis* Laurenti, 1768

Noms communs: Crapaud vert (Français), Wechselkröte (Allemand), Green toad (Anglais)



Description

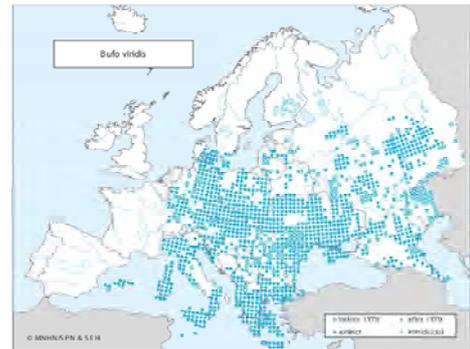
Aspect général: crapaud très ramassé possédant un museau tronqué ou assez arrondi.

Taille: moyenne. *Mâle:* 5 à 7 cm. *Femelle:* 7 à 9 cm. **Face dorsale:** taches ou marbrures vertes finement bordées de noir ou de brun, contrastant avec un fond cendré, rosé, gris, brun clair ou crème. Présence possible de petites verrues rouges sur le dos et les flancs. Patron dorsal stable dans le temps depuis le stade juvénile. **Face Ventrale:** blanche ou jaunâtre, uniforme ou tachée, et granuleuse. **Peau:** assez lisse avec des pustules plutôt rondes. Absence de replis latéro-dorsaux. **Yeux:** *Pupille:* ovale horizontalement. *Iris:* uniformément vert grisâtre vermiculé de noir. **Tympan:** bien distinct dans sa partie antérieure. **Membres :** postérieurs très court. **Tarses :** faible palmure et tubercule métatarsien de taille moyenne (environ 2/5 à 3/5 de l'orteil I). **Glandes parotoïdes:** assez proéminentes, parallèles et allongées, au moins deux fois plus longues que larges.

Mâle: Callosités nuptiales brunes (parfois incolores) sur la face interne du pouce. Sac vocal interne assombrissant la coloration de la gorge. **Femelle:** Coloration de fond plus claire que celle du mâle. **Têtards :** brun sur le dos, gris pâle à reflets dorés sur le ventre. Apparition des couleurs définitives après l'émergence des pattes arrière.

Distribution

Le crapaud vert est présent en Europe centrale et méridionale, en Afrique du Nord et au Moyen-Orient. Il est en déclin dans l'ensemble des pays de l'ouest de l'Europe et il n'est plus observé en Suisse.



Chant et communication

Les mâles émettent un chant de fin mars à juin pour attirer les femelles (Figure 1). Il s'agit d'un long trille aigu, flûté et mélodieux, d'intensité forte, portant sur quelques centaines de mètres. Il est essentiellement crépusculaire et nocturne lorsque l'animal est à terre à proximité de l'eau ou dans une faible lame d'eau. Les mâles communiquent également entre eux à l'aide de vocalisations spécifiques (Figure 2).

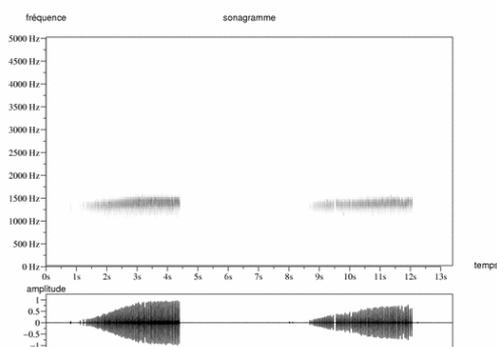


Figure 1 : Chant d'un mâle
(Dutilleux G. /BUFO)

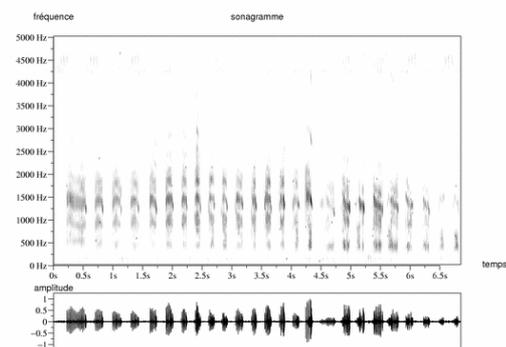


Figure 2 : Communication entre les mâles
(Dutilleux G. /BUFO)

Habitats

Le crapaud vert est un amphibien caractérisé de pionnier car il apprécie tout particulièrement les milieux peu profonds, fortement ensoleillés, avec une faible végétation et peu ou pas de prédateurs. C'est pourquoi il est observé, par exemple, dans les gravières, les sablières, les jeunes mares ou encore dans des milieux anthropiques tels que les bassins de rétentions. En dehors de sa période de reproduction, il se déplace à travers les champs, les terrains en friches ou les jardins et il se cache sous des tas de bois, de pierres ou de sables ainsi que dans les caves. De part ces caractéristiques, il est souvent rencontré sur des sites où le crapaud calamite est présent.

Moeurs

Animal crépusculaire et nocturne. **Hibernation** : de novembre à février. **Migration** : mois de mars pour rechercher un site de reproduction, puis de juin à octobre pour rechercher sa nourriture. **Reproduction** : de fin mars à mi-juin. **Amplexus**: axillaire. **Ponte**: en cordon de 2 à 5 m de long et de 4 à 6 mm de diamètre (1 à 1,5 mm par œuf). Ils sont d'une couleur brun noir uniforme et elles peuvent contenir jusqu'à 15000 œufs répartis sur 2, 3 ou 4 rangs. Ils reposent sur le fond, à faible profondeur (5 à 50 cm). Les premières éclosions débutent à la mi-avril.

Alimentation et prédateurs

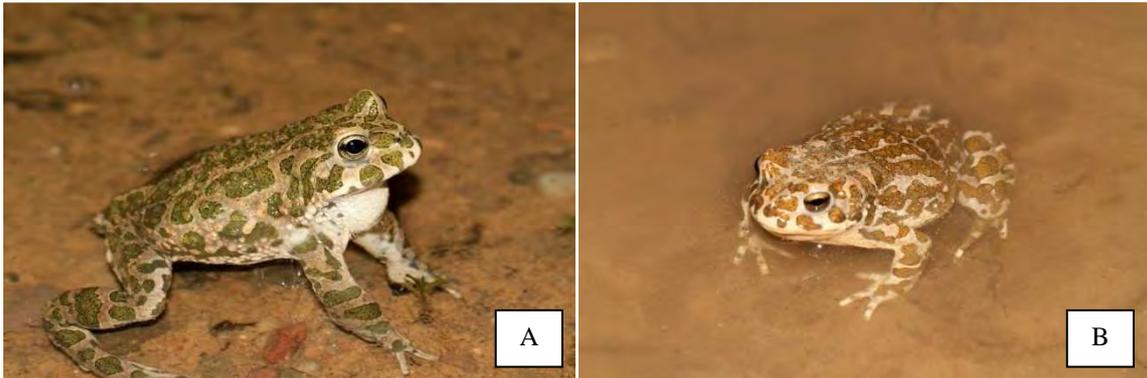
Le crapaud vert se nourrit essentiellement d'insectes, de vers de terres, de limaces... Il constitue également un mets de choix pour les oiseaux (hérons...) ou certains mammifères comme le putois. Les œufs de cette espèce sont souvent consommés par les poissons lorsque ces derniers sont présents dans les sites de reproductions.

Menaces

Les crapauds verts sont très sensibles aux successions écologiques, aux environnements fermés, à la dégradation, à la pollution et à la fragmentation des habitats ainsi qu'à l'utilisation des produits phytosanitaires.

Statuts de protection

Mondiale	<i>Convention de Berne</i> <i>Liste rouge UICN</i>	Annexe II Préoccupation mineure (LC)
Européenne	<i>Directive 92/43/CEE</i> <i>« Habitat-Faune-Flore »</i>	Annexe IV
France	<i>Législation Française</i> <i>Liste rouge UICN (2008)</i>	Article 2 de l'arrêté du 19 novembre 2007 fixant la liste des amphibiens et reptiles protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection En danger (EN)
Alsace	<i>Liste rouge ODONAT</i> <i>(2003)</i>	En danger (EN)



A. Mâle crapaud vert. B. Femelle crapaud vert © Victoria Michel



Couple de crapauds verts en amplexus © Jean Pierre Vacher



A. Ponte de crapaud vert © Victoria Michel B. Têtard de crapaud vert © Jean Pierre Vacher

GERARD Cindy, Master 2 Ecophysiologie et Ethologie, Université de Strasbourg

Association BUFO, Université de Bâle (NLU)

Encadrants : Jean-Pierre Vacher, Sylvain Ursenbacher

Co-encadrante : Victoria Michel

Caractérisation génétique et conservation du crapaud vert (*Bufo viridis*) en Alsace

Mots clés : *Bufo viridis*, conservation des amphibiens, fragmentation de l'habitat, microsatellites, génétique des populations, Alsace.

Résumé :

Le déclin des populations d'amphibiens est un phénomène qui s'est intensifié ces dernières décennies. En effet, il est actuellement évalué que 41% des espèces répertoriées à travers le monde seraient menacés d'extinction. Les principales causes de cette érosion sont sans conteste la fragmentation des habitats, la destruction des sites de reproduction ainsi que les maladies émergentes. De manière concrète, ces facteurs sont responsables d'une diminution du flux de gènes existant entre les populations ce qui réduit leur diversité génétique. Devenant plus sensibles aux diverses pressions biotiques et abiotiques, la viabilité de ces populations décroît, ce qui augmente leurs risque d'extinction. De part leurs localisation, les populations situées en limite d'aire de répartition sont particulièrement confronté à ces problèmes. Le crapaud vert *Bufo viridis* est une espèce menacée d'extinction en France continentale. En raison du fait qu'il atteint la limite occidentale de son aire de répartition en Alsace et que dans cette région, il est fortement confronté à la fragmentation de son environnement, nous avons évalué le statut de la population de crapauds vert à l'aide de microsatellites de l'ADN nucléaire. Nos résultats nous informent que cette espèce s'organiserait en trois métapopulations dont la diversité génétique est identique à celle présente dans des populations situées plus centralement dans l'aire de répartition. La fragmentation de l'habitat provoquée par l'ensemble du réseau routier se révèle être la cause majeure de la structuration génétique des différentes sous-unités populationnelles de crapauds verts en Alsace. L'état des populations du Haut-Rhin est particulièrement inquiétant du fait de leurs isolement accru et de leurs plus faibles diversités génétiques. En conséquence, il est indispensable de développer des projets de reconnexion adaptés à cette espèce dans cette région française.