



Etude de l'origine et de la structuration génétique des populations corses de *Bufo viridis balearicus*

Le Conservatoire d'espaces naturels Corse (CEN Corse) est une association loi 1901 à but non-lucratif, et agréée au titre de la protection de l'environnement. Totalement apolitique et gérée par un Conseil d'Administration de 12 membres, tous bénévoles et venant d'horizons divers, le CEN Corse emploie aujourd'hui 14 salariés. L'équipe œuvre au quotidien pour la préservation des habitats et de la biodiversité insulaire.

Les valeurs du CEN Corse inscrites au Plan d'Action Quinquennal (PAQ) :

- **Connaître - Cunnosce** : améliorer et capitaliser les connaissances sur la biodiversité (les habitats et espèces sur les sites gérés mais aussi dans d'autres espaces naturels de Corse ou dans le cadre d'inventaires occasionnels).
- **Protéger – Prutege** : par la maîtrise foncière ou d'usage des espaces naturels ou semi naturels d'intérêt écologique reconnu.
- **Gérer - Gestì** : promouvoir une gestion favorisant la biodiversité écologique (sites gérés, missions d'animation territoriale, mission d'assistance technique en tant qu'expert, etc.)
- **Valoriser – Valurizà** : communiquer et sensibiliser tous les publics à l'environnement et au développement durable.
- **Accompagner – Accumpagnà** : accompagner les maîtres d'ouvrages et les acteurs du territoire dans la mise en place des politiques publiques (Plan Nationaux d'Action, Projets d'Arrêté de protection préfectorale de Biotope, mesures compensatoires, atlas de biodiversité dans les communes, etc.)



Projet dans le cadre du PNA Crapaud vert

ÉTUDE DE L'ORIGINE ET DE LA STRUCTURATION GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS CORSES DE *BUFOTES VIRIDIS BALEARICUS*

Coordinateur



CONSERVATOIRE D'ESPACES NATURELS CORSE

Siège Social : 871, ave de Borgo - Maison ANDREANI

20290 BORGIO

Tél. : 04 95 32 71 63

Email : contact@cen-corse.org

Site internet : www.cen-corse.org

Partenaires



**DIRECTION REGIONALE DE L'ENVIRONNEMENT DE L'AMENAGEMENT ET DU
LOGEMENT**

Fabrice TORRE (fabrice.torre@developpement-durable.gouv.fr)

Muriel DE-BASQUIAT (muriel.de-basquiat@developpement-durable.gouv.fr)

Collaborateurs



Fauna Consult : Christophe Eggert (eggert@faunaconsult.fr)



CEN Lorraine : Jean-Pierre Vacher (jp.vacher@cen-lorraine.fr)



MNHN : Christophe Dufresnes (christophe.dufresnes@hotmail.fr)



SHF : Claude Miaud (claudemiaud@cefe.cnrs.fr)

Rédaction

Marie-Paule Savelli (mariepaule.savelli@cen-corse.org)

Arnaud Geysels (arnaud.geysels@cen-corse.org)

SOMMAIRE

1.	CONTEXTE.....	6
2.	DESCRIPTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	10
3.	MATERIEL ET METHODES	13
3.1.	Espèce étudiée	13
3.2.	Stratégie et zones d'échantillonnage	14
3.3.	Acquisition et traitement des données	17
3.3.1.	Précautions sanitaires	17
3.3.2.	Récolte de tissus et analyses ADN	17
3.4.	Matériel nécessaire	20
4.	AUTORISATIONS ADMINISTRATIVES ET DE PASSAGE	21
5.	CALENDRIER PREVISIONNEL D'INTERVENTION	21
6.	REFERENCES	22
6.1.	Bibliographie.....	22
6.2.	Sitographie	24

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Secteurs prospectés par le CEN Corse entre 2012 et 2018 dans le cadre du PNA Crapaud vert (en rouge) et points de présence du Crapaud vert (en vert) au sein des différents sous-bassins versants prospectés.	7
Figure 2. Données d'occurrence historiques et actuelles de <i>Bufotes viridis balearicus</i> connue en Corse depuis 1975 d'après un ensemble de bases de données (CEN Corse, DREAL Corse, ONF, DDT2B, OEC, OFB, SHF, INPN, FF).	8
Figure 3. Crapaud vert des Baléares (M.-P. SAVELLI).	13
Figure 4. Répartition du Crapaud vert des Baléares (<i>Bufotes viridis balearicus</i>). Source : Christophe Dufresnes.	13
Figure 5. Données d'occurrence historiques et actuelles de <i>Bufotes viridis balearicus</i> connue en Corse depuis 1975 d'après un ensemble de bases de données (CEN Corse, DREAL Corse, ONF, DDT2B, OEC, OFB, SHF, INPN, FF) et sites à prospecter sur l'ensemble de l'île (étoile rouge).	15
Figure 6. Sous-bassin versant du fleuve Tavignano et ses affluents. Une zone tampon d'1 km est représentée autour du fleuve.	16
Figure 7. A gauche : sous-bassin versant du fleuve Rizzanese et ses affluents. Une zone tampon d'1 km est représentée autour du fleuve. A droite : sous-bassin versant du fleuve Stabiacciu et ses affluents.	16
Figure 8. Manipulation d'un Crapaud vert pour le prélèvement d'ADN par frottis buccal à l'aide d'un écouvillon en coton (© Jean-Pierre Vacher, Vacher & Ursenbacher, 2019).	18

1. CONTEXTE

Le Crapaud vert (*Bufotes viridis*) est une espèce d'amphibien anoure en déclin sur l'extrémité occidentale de son aire de répartition depuis plusieurs années. Il est protégé au niveau national français par l'arrêté du 8 janvier 2021 article 2, fixant la liste des amphibiens et des reptiles protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection. Il est également inscrit à l'annexe IV de la Directive européenne « Habitats-Faune-Flore » et à l'annexe II de la Convention de Berne du fait du mauvais état de conservation de ses populations et à l'évolution défavorable de son habitat.

La répartition actuelle du Crapaud vert en France est limitée à l'Alsace, la Lorraine (sous-espèce *viridis*) et la Corse (sous-espèce *balearicus*) et l'espèce a été observée pour la première fois dans le Doubs en Franche-Comté en 2010. Les populations des différents départements semblent relativement stables même si le nombre de stations et d'individus peut varier de façon importante d'une année sur l'autre. Le Crapaud vert, en limite de répartition occidentale sur le continent européen, est exposé à un risque d'extinction en France à moyen terme. L'espèce est d'ailleurs considérée comme disparue en Suisse. Compte tenu de ce constat, le ministère chargé de l'environnement a jugé comme étant prioritaire de conduire des actions de conservation en faveur du Crapaud vert et a dès lors été décidé de lancer un Plan National d'Actions (PNA) sur la période 2014-2018. Un second PNA est en cours de rédaction.

En Corse, le Crapaud vert est, selon la systématique et les connaissances actuelles, considéré comme appartenant à la sous-espèce *Bufotes viridis balearicus*, le Crapaud vert des Baléares (TaxRef V17.0) l'isolement reproductif entre les lignées *balearicus* et *viridis* n'étant pas suffisamment important pour les élever au rang d'espèces (Dufresnes *et al.* 2014 ; Speybroeck *et al.*, 2020). Le Crapaud vert, seul Bufonidae connu en Corse, a une répartition principalement littorale (dans les estuaires, les dunes situées en arrière des plages et les abords des marais). Les quelques intrusions notées plus à l'intérieur de l'île correspondent fréquemment à des zones de basses altitudes situées dans les fonds de vallée des plus grands fleuves insulaires (Rizzanese, Tavignano), mais en altitude, il semble également se reproduire dans des ruisseaux ou mares peu profondes ainsi que dans des zones de suintements. La majorité des données en altitude proviennent des nombreuses investigations réalisées de 2012 à 2018 par le CEN Corse. Durant cette période, plusieurs stations alticoles ont ainsi été confirmées ou découvertes en Haute-Corse : celle de la région du Boziu et une autre, dans sa continuité, à Corte ; ainsi qu'en Corse-du-Sud, dans l'Alta-Rocca notamment (Fig. 1).

Le lac de barrage de l'Ospedale est le seul site altitudinal (945 mètres d'altitude) de Corse du sud où l'espèce a été mentionnée à plusieurs reprises historiquement, notamment dans le cadre de l'étude de « l'écologie et de la protection des Discoglosses en Corse » (Salvidio *et al.*, 1999). Plus récemment, malgré un effort de prospection conséquent (2014, 2015, 2017 et 2018) et des conditions

météorologiques favorables (hiver et printemps doux et pluvieux), l'espèce n'a plus pu y être trouvée.

La répartition de l'espèce semble très morcelée.

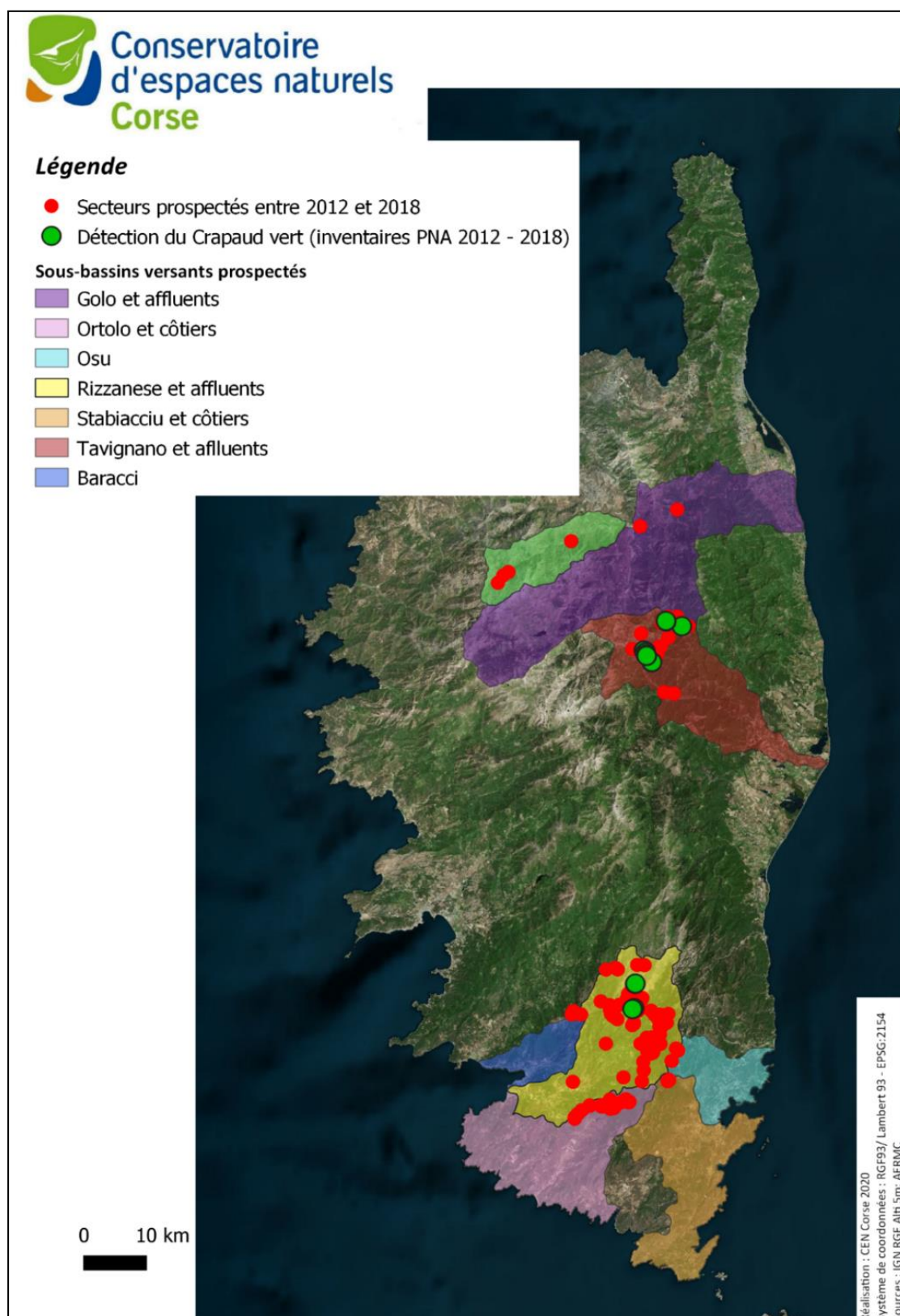


Figure 1. Secteurs prospectés par le CEN Corse entre 2012 et 2018 dans le cadre du PNA Crapaud vert (en rouge) et points de présence du Crapaud vert (en vert) au sein des différents sous-bassins versants prospectés.

Le recensement des données d'occurrence de l'espèce à l'échelle de la Corse (Fig. 2) est extrait d'un assemblage de bases de données réalisé en 2023 : Conservatoire d'espaces naturels Corse (CEN Corse), Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL) Corse, Office National des Forêts (ONF), Direction départementale des territoires Haute-Corse (DDT2B), Office de l'Environnement de la Corse (OEC), Office Français de la Biodiversité (OFB), Société Herpétologique de France (SHF), Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN), Faune France (FF).

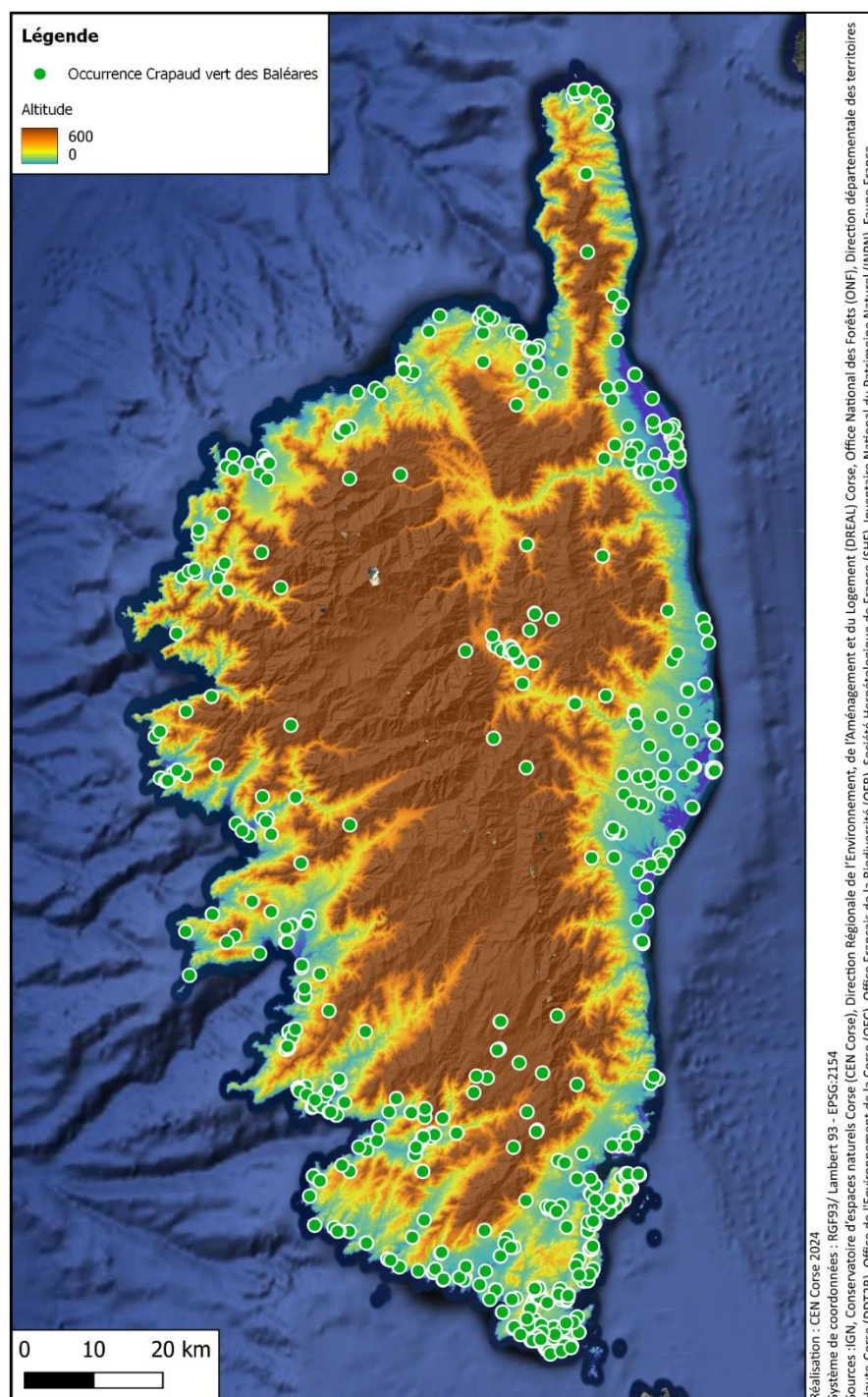


Figure 2. Données d'occurrence historiques et actuelles de *Bufo viridis balearicus* connue en Corse depuis 1975 d'après un ensemble de bases de données (CEN Corse, DREAL Corse, ONF, DDT2B, OEC, OFB, SHF, INPN, FF).

A l'heure actuelle, l'origine des populations de l'île reste incertaine. Dans le 1^{er} PNA (2014-2018), l'hypothèse d'une colonisation en deux phases du Crapaud vert conduisant à deux peuplements distincts au sein de l'île a été évoquée :

- La population alticole serait issue d'un peuplement ancien ;
- La population littorale serait issue d'un peuplement beaucoup plus récent.

Selon Lanza (1988) et Geniez et Cheylan (2005), les populations corses trouveraient leur origine dans un effet fondateur lié au peuplement de l'île au Néolithique. Cette période correspond à plusieurs milliers d'années avant J.-C., lorsque les humains ont commencé à pratiquer l'agriculture et à domestiquer des animaux. Le Crapaud vert aurait été introduit par l'homme, probablement par des navigateurs ou des premiers colons qui ont voyagé avec des animaux et des plantes, contribuant involontairement à la dispersion de certaines espèces.

Conjointement à ça, des données paléontologiques confirment la présence du Crapaud vert au Pléistocène moyen, entre 400 et 350 000 années avant notre ère (<http://www.wahre-staerke.com/>). Ce sont des échantillons de sédiments, prélevés dans deux dépôts fossilifères identifiés au sein du gisement de Castiglione, qui attestent de la présence du Crapaud vert à cette période (Peirera *et al.*, 2006).

En plus de l'absence de certitude quant à l'origine des populations, nous n'avons aucune donnée sur la diversité et la structuration génétique des populations de l'île. Le développement de ces connaissances est crucial pour la conservation des populations de l'espèce à l'échelle du territoire, surtout en tenant compte de la répartition altitudinale semble-t-il très fragmentée de l'espèce qui laisse supposer la présence de populations isolées et potentiellement menacées mais également de l'effet fondateur des populations corses qui pourrait induire une diversité génétique plus faible que sa population d'origine puisqu'elle descend d'un nombre limité de fondateurs.

De manière générale, les populations alticoles et/ou littorales pourraient constituer une ou plusieurs unités évolutives distinctes – qu'elles proviennent d'une ou de plusieurs colonisations – et alors probablement plusieurs unités de conservation à considérer séparément.

Dans le cadre des actions de conservation du PNA Crapaud vert, il est indispensable d'estimer la composition des populations corses : au regard de leurs lignées évolutives et de leur statut (endémique ou non) afin de délimiter ces unités de conservation et d'initier des programmes de gestion spécifiques. Également, il s'avère indispensable de considérer la diversité génétique, clé pour l'adaptabilité des populations, en estimant et en comparant les niveaux de diversité entre les populations (Frankham, 2005). Cela permettra d'optimiser les mesures de gestion et de conservation de l'espèce à long terme

en incluant, par exemple, des programmes de renforcement de populations et de sauvetage génétique (“genetic rescue”) des populations consanguines.

Pour finir, la connectivité entre les populations joue un rôle crucial dans la résilience des populations face aux déclinés momentanés et pour éviter les dépressions de consanguinité. Pour la quantifier à l'échelle du territoire, il est nécessaire de mesurer les flux géniques, d'identifier les populations isolées et de comprendre l'impact des éléments de paysages sur cette connectivité. Ces connaissances nous permettront, encore une fois, d'identifier les populations en danger ou celles présentant une diversité importante, de comprendre comment les caractéristiques du milieu modulent la connectivité et d'adapter les mesures de conservation en fonction.

L'étude proposée dans le cadre de ce projet, qui sera décrite en détail dans la partie suivante, répond pleinement à l'action **C3.1.** du 1^{er} PNA Crapaud vert « **Etude comparative des populations de plaine et d'altitude du Crapaud vert des Baléares en Corse** » et plus encore : les résultats attendus de l'étude nous permettront de connaître l'origine des populations corses et les potentielles unités évolutives distinctes, d'étudier la diversité génétique des populations échantillonnées, les flux géniques entre ces dernières et le rôle des éléments du paysage (ex : topographie des vallées fluviales) dans la modulation de la connectivité inter-populationnelle. Ils pourront permettre ultérieurement d'identifier et de mettre en œuvre des solutions d'aménagement du territoire dans le but si nécessaire de (re)connecter des populations, protéger les populations « sources », ou encore restaurer de nouvelles populations. Pour finir, les prospections qui seront réalisées dans le cadre de ce projet permettront d'étayer les connaissances sur la répartition du Crapaud vert en Corse et de contribuer activement aux collections de données nationales sur le Crapaud vert.

2. DESCRIPTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Ce projet sur la génétique du Crapaud vert vise principalement à étudier l'origine des populations corses et leur diversité/structuration génétique sur l'île, à une échelle globale, mais aussi plus locale, notamment pour identifier les éléments de paysages qui impactent la connectivité entre les populations et par conséquent, la diversité génétique de ces dernières. Les résultats obtenus permettront d'établir une stratégie de conservation adaptée à l'échelle du territoire pour préserver et éventuellement restaurer les populations de Crapaud vert.

Pour ce faire, le protocole prévu consiste à effectuer un échantillonnage représentatif de toute la Corse en réalisant des prélèvements de matériel génétique sur des individus appartenant à des populations hétérogènes de Crapaud vert réparties sur l'ensemble de l'île.

Ces échantillons seront analysés et comparés avec des échantillons en provenance d'autres localités géographiques (Espagne, Italie (continentale et insulaire), etc.) afin d'en étudier les relations phylogénétiques, la structuration biogéographique des populations de *Bufo viridis balearicus* au sein de son aire de répartition en Méditerranée et de déterminer l'origine des populations Corses.

Afin de comprendre l'impact des éléments du paysage sur la connectivité entre les populations, un focus sera réalisé sur certaines vallées fluviales pour lesquelles des individus sont recensés en plaine et en altitude. Les échantillons seront alors collectés en suivant un gradient altitudinal : entre la plaine (basse vallée) et les zones d'altitude (haute vallée) où la présence de l'espèce est connue, notamment dans les régions du Cortenais/Boziu en Haute-Corse (sous-bassin versant du fleuve Tavignano), de l'Alta Rocca (sous-bassin versant du fleuve Rizzanese) et de l'Ospedale (sous-bassin versant du fleuve Stabiacciu et côtiers) en Corse-du-Sud.

Ce projet sur la génétique des populations de Crapaud vert en Corse comporte 3 objectifs qui visent à apporter des éléments de réponses sur :

1. La colonisation de l'espèce en Corse

À l'échelle méditerranéenne : analyses d'échantillons corses et extra-corses.

Question : Les populations corses sont-elles issues d'un ou de plusieurs événements de colonisation ?

Hypothèse associée : Notre hypothèse est celle du 1^{er} PNA qui suggère deux phases de colonisation qui ont conduit à deux peuplements distincts, à savoir : une population alticole plus ancienne que la population de plaine. Cette hypothèse se justifie par la preuve de présence de l'espèce bien avant l'hypothèse de colonisation néolithique.

Résultats attendus :

(1) Un seul processus de colonisation : toutes les populations corses ont le même ancêtre commun, qui est plus récent que l'ancêtre commun qu'elles partagent avec les populations extra-corses ; ou (2) Deux ou plusieurs processus de colonisation : les populations corses groupent d'abord avec leurs populations d'origine extra-corses avant de grouper ensemble.

2. La structure génétique de l'espèce en Corse

À l'échelle de la Corse : analyses d'échantillons corses.

Question : Y a-t-il des différences de diversité génétique entre les populations échantillonnées ?

Hypothèse associée : Nous postulons que nous observerons une grande variabilité des niveaux de diversité génétique entre les populations de l'île. Cette hypothèse découle de la constatation d'une répartition très fragmentée de l'espèce dans certaines zones de l'île, ce qui laisse supposer que les populations isolées présentent une diversité génétique plus faible et une consanguinité accrue.

Résultats attendus :

(1) Les analyses montrent une diversité génétique moindre – matérialisée par un taux d'homozygotie plus important et une fréquence allélique plus faible – dans certaines populations altitudinales de l'île.
(2) Dans le cas où l'hypothèse est invalidée, nous n'observerons pas ou très peu de différences de diversité génétique et donc aucune population supposément moins résiliente aux aléas environnementaux.

(1) Les analyses montrent une diversité génétique moindre – matérialisée par un taux d'homozygotie plus important – dans les populations isolées de l'île, notamment les populations altitudinales. (2) Si les événements de fragmentation n'ont pas eu d'impact significatif sur la démographie des populations, nous n'observerons pas nécessairement de chute de diversité entre les populations connectées ou fragmentées.

3. La connectivité et sa modulation par les éléments du paysage

Echelle locale : analyses d'échantillons de certaines vallées fluviales corses

Question : Certains éléments du paysage favorisent-ils ou entravent-ils la connectivité (flux génétique) entre les populations de Crapaud vert en Corse ?

Hypothèse associée : La topographie et les autres caractéristiques environnementales d'une zone peuvent influencer la capacité de dispersion des individus, affectant ainsi les flux génétiques entre les populations et leurs structurations respectives.

Résultats attendus :

(1) Une connectivité inter-populationnelle – matérialisée par la différenciation génétique – plus faible dans les zones littorales, où les barrières à la dispersion sont supposément moindres, par rapport aux zones altitudinales, supposées isolées.

(2) Une connectivité inter-populationnelle plus faible dans les vallées fluviales à forte pente, qui se traduirait donc par une différenciation génétique plus élevée.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Espèce étudiée

L'espèce étudiée est le Crapaud vert des Baléares (*Bufo viridis balearicus*, Fig. 3), petit amphibien à



l'aspect massif et trapu, au museau arrondi, facilement reconnaissable aux tâches vertes cerclées ou non de noir sur fond clair (beige-crème).

Figure 3. Crapaud vert des Baléares (M.-P. SAVELLI).

La sous-espèce *balearicus* est présente en Méditerranée dans seulement trois pays : Italie (continentale et îles – Sardaigne, nord de la Sicile, Elbe, îles Eoliennes), Espagne (îles Baléares) et France (Corse ; Fig. 4).

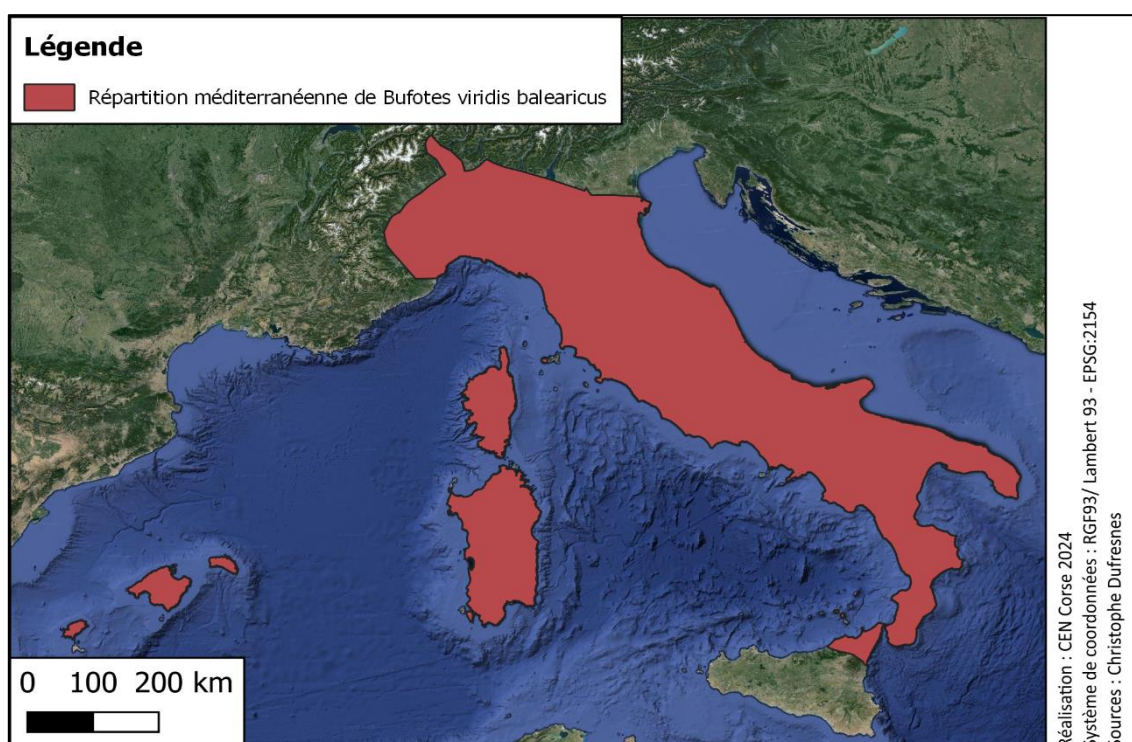


Figure 4. Répartition du Crapaud vert des Baléares (*Bufo viridis balearicus*). Source : Christophe Dufresnes.

Le Crapaud vert est considéré comme une espèce “pionnière” car il recherche généralement des habitats dits “pionniers” en termes de succession écologique, avec des sols nus (dépourvus de végétation aquatique ou faiblement végétalisés) et des plans d'eau peu profonds, bien exposés et relativement permanents. Il colonise rapidement de nouveaux habitats disponibles. En Corse, il occupe particulièrement les estuaires, sansouïres, mares, abords des marais, dunes sableuses, ruisseaux temporaires et canaux peu profonds, etc. ; principalement sur le littoral mais également en altitude. Sa période d'activité se déroule généralement de février à octobre, et sa période d'hivernage le reste de l'année (novembre à janvier). Il a la particularité d'avoir une reproduction “explosive” : lorsque les conditions sont optimales, les adultes se rassemblent et produisent une très grande quantité d'œufs. Les têtards éclosent en deux à cinq jours et leur développement larvaire est assez court si les conditions thermiques sont réunies (plus la température est élevée, plus le développement larvaire est rapide ; (Stöck *et al.*, 2008).

En Corse, malgré le PNA et les actions de conservation spécifiques menées sur le Crapaud vert, le niveau d'acquisition de connaissances reste insuffisant. En effet, l'espèce n'a été que peu inventoriée et ce de manière irrégulière et localisée (mares temporaires méditerranéennes et/ou sites aquatiques d'altitude). Il n'existe aucun suivi temporel régulier des populations du Crapaud vert en Corse et la majorité des occurrences aujourd'hui recensées sur l'île sont des points d'observation opportunistes. Il est aujourd'hui difficile de prédire l'évolution des populations de l'espèce sur le long terme. Il est donc indispensable et urgent d'augmenter l'acquisition de connaissances sur l'espèce par le biais de suivis temporels réguliers et de projets de ce type.

3.2. Stratégie et zones d'échantillonnage

Afin de planifier l'échantillonnage génétique, il sera nécessaire de réaliser un travail de repérage de terrain sur l'ensemble de la Corse afin de vérifier l'accessibilité aux sites et de confirmer la présence de l'espèce sur ces derniers.

Nous proposons ensuite de réaliser un échantillonnage représentatif de toute la Corse en réalisant des prélèvements de matériel génétique dans au moins 20 à 30 localités hétérogènes et distinctes réparties sur l'ensemble de l'île (Fig. 5).

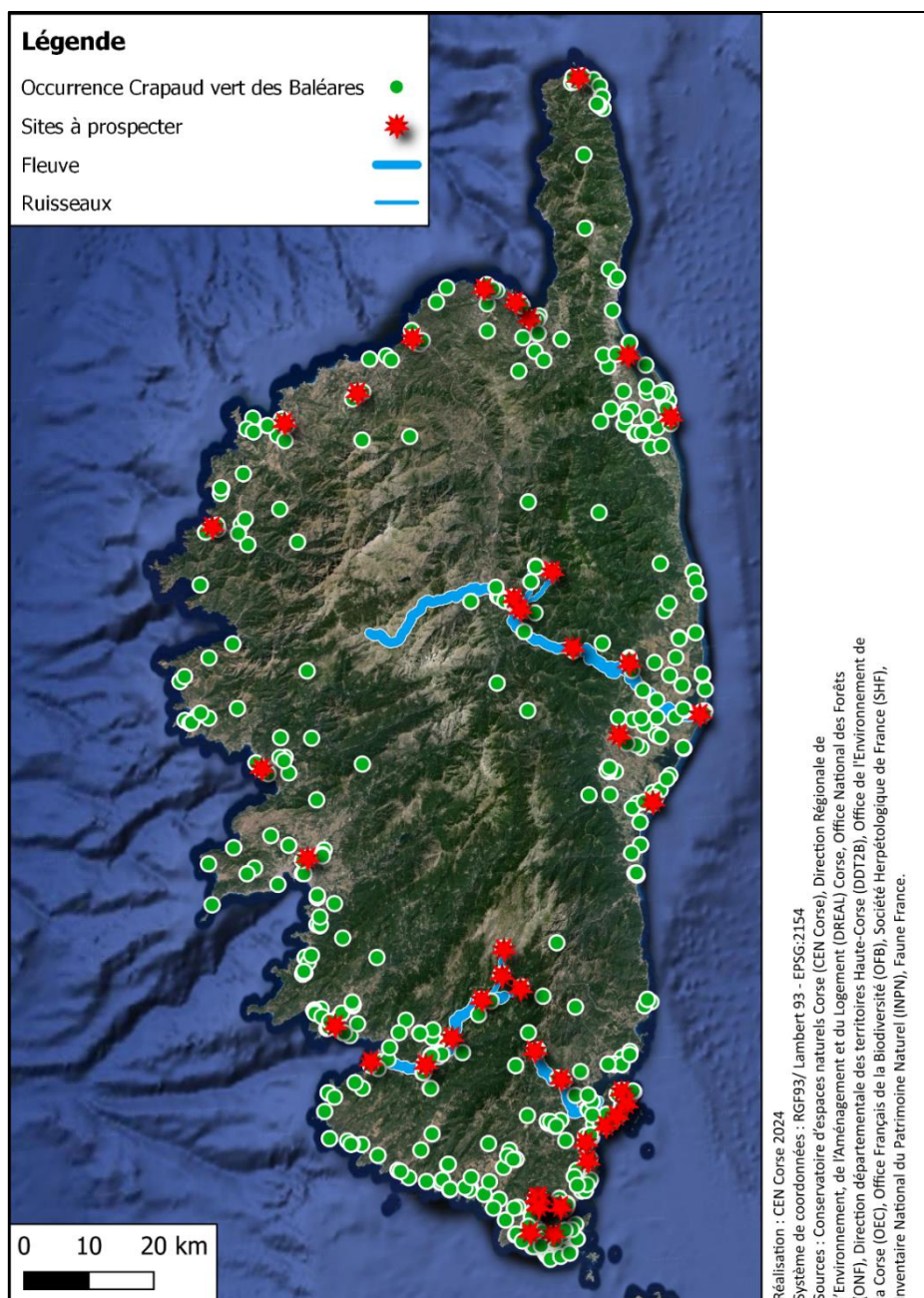


Figure 5. Données d'occurrence historiques et actuelles de *Bufo viridis balearicus* connue en Corse depuis 1975 d'après un ensemble de bases de données (CEN Corse, DREAL Corse, ONF, DDT2B, OEC, OFB, SHF, INPN, FF) et sites à prospecter sur l'ensemble de l'île (étoile rouge).

Suite à cet échantillonnage représentatif, nous nous focaliserons plus spécifiquement sur quelques régions particulières de la Corse, notamment les vallées fluviales du Tavignano (Fig. 6), du Rizzanese et du Stabiacciu et côtiers (Fig. 7), en suivant un gradient altitudinal.

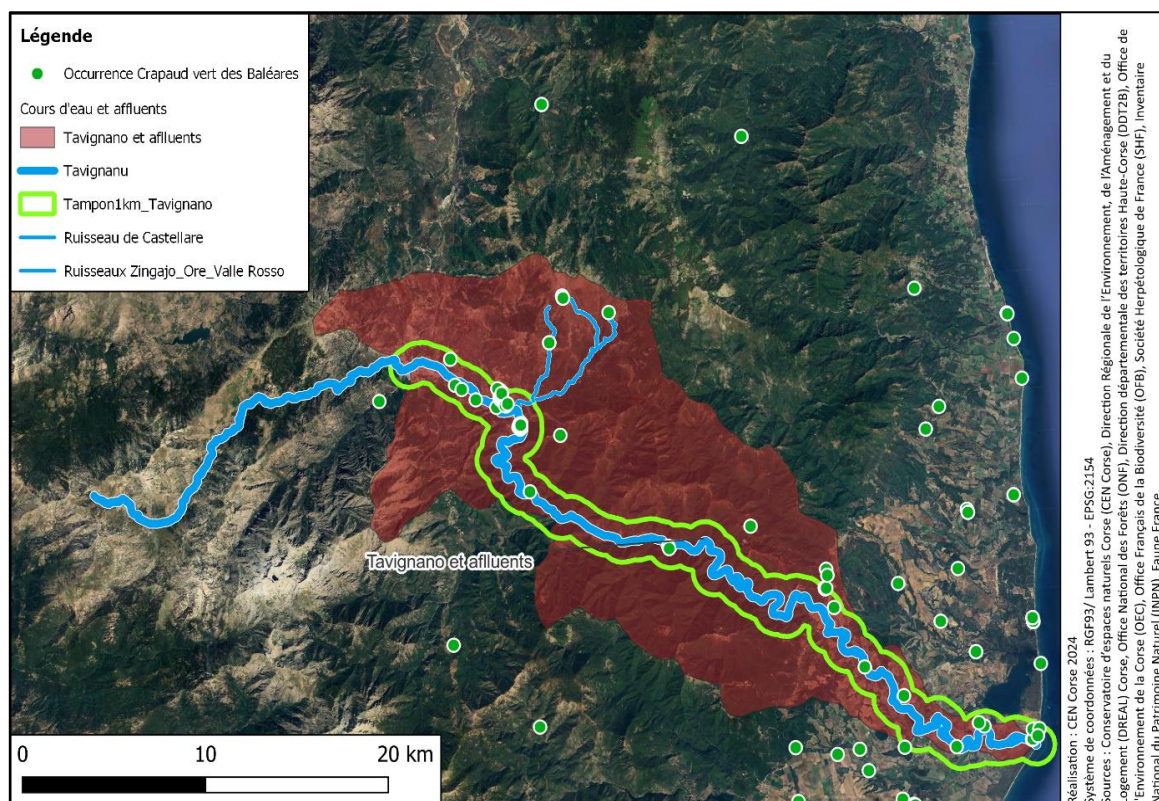


Figure 6. Sous-bassin versant du fleuve Tavignano et ses affluents. Une zone tampon d'1 km est représentée autour du fleuve.

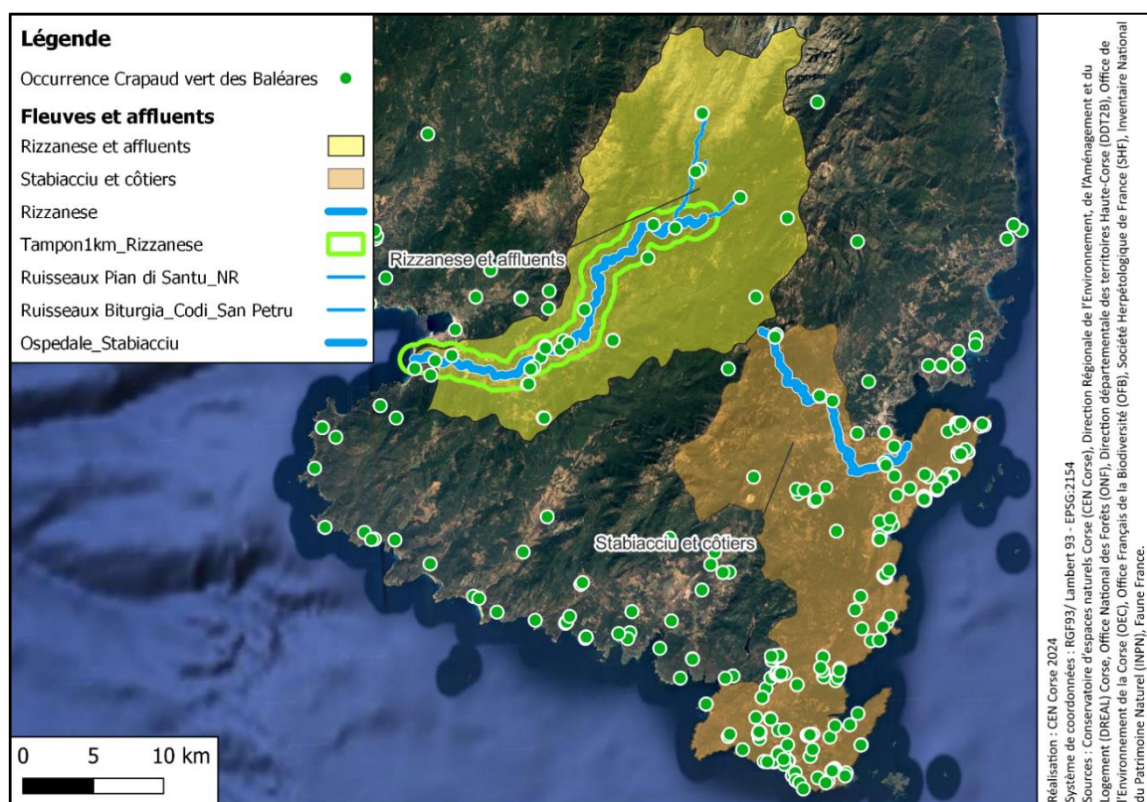


Figure 7. A gauche : sous-bassin versant du fleuve Rizzanese et ses affluents. Une zone tampon d'1 km est représentée autour du fleuve. A droite : sous-bassin versant du fleuve Stabiacciu et ses affluents.

De plus, le protocole POPAmphibien, engagé par le CEN Corse en 2023 dans le sous-bassin versant du fleuve Stabiacciu et côtiers, devrait être reconduit en 2025 et 2027 sur de nombreux sites abritant l'espèce, l'acquisition de matériel génétique sera facilitée dans ce secteur.

Dans le cadre de ce projet, nous prévoyons de nous appuyer sur l'aide de stagiaires et de volontaires en Service civique afin d'augmenter l'effort de prospection sur la Corse et dans ces trois vallées fluviales. Cela permettra de valider la présence de l'espèce dans les secteurs historiquement connus, mais également d'identifier de nouveaux secteurs de présence.

3.3. Acquisition et traitement des données

3.3.1. Précautions sanitaires

La présence du Chytride (*Batrachochytrium dendrobatidis*), champignon mortel pour les amphibiens ayant été avérée en Corse dans les années 2010 (Dejean *et al.*, 2010), un protocole de désinfection (Miaud, 2022) sera systématiquement mis en œuvre lors des manipulations ou des captures d'individus qui seront réalisés dans le cadre de cette étude. Ainsi, avant chaque sortie sur le terrain, l'équipe du CEN Corse s'assurera de désinfecter correctement l'ensemble du matériel utilisé (bottes, Wadders, épuisette, boîte-loupe, etc.) à l'aide d'une solution diluée de Virkon®.

3.3.2. Récolte de tissus et analyses ADN

Les méthodes pour la capture, l'identification et la récolte de l'ADN sont sensiblement similaires à celles proposées dans « Caractérisation génétique et conservation du Crapaud vert *Bufo viridis* en Alsace » par Cindy GERARD (2011).

Capture des individus

Les Crapauds verts seront capturés durant leur période d'activité au cours de la saison de reproduction (de début février en plaine jusqu'en juillet ; à adapter selon l'altitude concernée par les prospections). Les opérateurs se rendront sur les sites de présence avérés, basés sur les données historiques ou sur les prospections préalables réalisées au cours de l'année. Les prospections et la capture pour récolte des échantillons génétiques sera fait prioritairement lorsque les conditions météorologiques sont les

plus favorables à leur activité (température extérieure supérieure à 10°C, humidité de l'air, absence de vent).

Sur le terrain, les individus seront recherchés à vue, à l'aide de lampes torches ainsi que par détection des chants d'appel émis par les mâles pour attirer les femelles. Ils seront capturés à la main ou à l'aide d'une épuisette puis placés dans des sachets individuels pour limiter tous risques de contaminations, qu'ils soient ADN ou sanitaires.

Identification des individus

Pour éviter de prélever l'ADN d'un même individu lors de deux séances de capture consécutives sur un même site, une méthode de photo-identification sera employée. Cette technique implique de photographier les profils gauche et droit de chaque crapaud capturé. Elle est particulièrement efficace pour le Crapaud vert grâce à son motif de coloration unique et facilement identifiable.

Récolte de l'ADN

L'ensemble des prélèvements ADN seront effectués directement sur les sites d'échantillonnages à l'aide d'écouvillons (Fig. 8).



Figure 8. Manipulation d'un Crapaud vert pour le prélèvement d'ADN par frottis buccal à l'aide d'un écouvillon en coton (© Jean-Pierre Vacher, Vacher & Ursenbacher, 2019).

Cette technique rapide et non invasive permet de récolter efficacement des cellules épithéliales de la bouche des Amphibiens (Pidancier *et al.*, 2003), en quantité suffisante pour des analyses génomiques, plus gourmandes en ADN (Ambu & Dufresnes, 2023). Les prélèvements seront réalisés sur des individus adultes, avec un objectif sur les 3 années, d'environ 200-250 individus. Comme les individus n'ouvrent pas spontanément la bouche à l'approche de l'écouvillon, si nécessaire, une lame souple sera utilisée pour provoquer le réflexe d'ouverture, permettant ainsi d'introduire l'écouvillon. Pour éviter tout risque de contamination, la lame sera systématiquement stérilisée entre deux individus.

Les spécimens retrouvés morts et en bon état seront envoyés à la collection Amphibiens & Reptiles du MNHN, enrichissant ainsi les collections nationales, qui disposent actuellement de peu d'échantillons provenant de Corse.

Conservation des échantillons génétiques

Pour garantir la préservation sur le long terme des échantillons ADN prélevés, et qui représenteront alors le patrimoine génétique des Crapauds vert de Corse, il est essentiel de prévoir une stratégie de stockage et de conservation. Pour cela, les échantillons d'ADN extraits seront mis en banque à la collection ADN du MNHN à Paris. Avant ça, les échantillons seront conservés dans un congélateur au sein des locaux du Conservatoire d'espaces naturels Corse à des températures adéquates.

Analyses génétiques

Les données génétiques seront obtenues par séquençage ddRAD, qui permet l'analyse de milliers de marqueurs génétiques répartis sur l'ensemble de l'ADN nucléaire, offrant des résultats bien plus fiables et précis que les analyses de génétique de la conservation dites « classiques » (microsatellites, ADN mitochondrial), pour des coûts abordables (Peterson *et al.*, 2012). Le principe de la méthode est de préparer des bibliothèques génomiques regroupant l'ADN des échantillons extraits, de séquencer ces bibliothèques sur séquenceur haut-débit, et de traiter bioinformatiquement les centaines de millions de séquences obtenus afin de pouvoir les analyser par des outils de phylogénétiques et de génétique de populations (alors dits « phylogénomique » et « génomique des populations »). Le séquençage RAD a été démocratisé pour l'étude des amphibiens européens grâce à la mise au point d'un protocole dédié (Brelsford *et al.*, 2016), depuis utilisé dans de nombreuses études sur la batrachofaune européenne (ex : Dufresnes *et al.*, 2018, 2019a, 2020a, b, c, 2021a, b, 2023 ; Ambu *et al.*, 2023) y compris sur les Crapauds verts (Dufresnes *et al.*, 2019b),

Les analyses RAD seront entièrement réalisées par le biais de notre collaborateur scientifique et co-développeur du protocole C. Dufresnes. Les bibliothèques génomiques seront préparées dans son

laboratoire au MNHN, séquencées sur séquenceur Illumina par un prestataire privé, et les données brutes seront assemblées grâce aux outils bio-informatiques de notre collaborateur. Un panel d'analyses phylogénomiques et de génomiques des populations sera alors conduit, ce à différentes échelles géographiques, pour répondre aux différentes questions posées dans le cadre du projet, sur la structure, la diversité, et l'apparentement génétique des populations. C. Dufresnes a une longue expérience, désormais routinière, de toutes ces procédures, et les autres conseillers scientifiques possèdent également les compétences nécessaires pour interpréter les résultats.

3.4. Matériel nécessaire

Les prospections et les prélèvements nécessiteront le matériel suivant :

- Lampes frontales
- Paires de bottes
- Wadders
- Loupes
- Boîtes-loupes
- Epuisettes
- Paires de jumelles
- Appareil photo
- Smartphone (avec logiciel QFIELD (extension QFIELD du logiciel QGIS 3.28.15))
- Gants jetables non poudrés
- Produits désinfectants (Virkon)
- Pulvérisateur (avec produit désinfectant à l'intérieur)
- Bac plastique de stockage du matériel
- Thermomètre
- Testeur pour la salinité
- Boîte en plastique transparente (pour photos)
- Matériel de prélèvement génétique (écouvillons, marqueur indélébile, sachets plastiques, alcool, éprouvette, petite glacière, etc.)

Un véhicule adapté aux longs trajets et aux routes en mauvais état sera également indispensable. Les prospections pour échantillonnage de matériel génétique se réalisant uniquement de nuit, un hébergement sera nécessaire à proximité des sites les plus éloignés.

4. AUTORISATIONS ADMINISTRATIVES ET DE PASSAGE

L'équipe du CEN Corse est composée de salariés formés et bénéficiant déjà de toutes les autorisations nécessaires à la capture provisoire et à la manipulation d'espèces protégées d'Amphibiens (dans le cas de captures à l'épuisette) et de Reptiles au sein des deux départements insulaires :

- Arrêté n°2A 2022-04-28-00002 du 28 avril 2022 portant autorisation de capture avec relâcher immédiat d'espèces de Reptiles et Amphibiens protégés.
- Arrêté n°2B 2022-04-28-00001 du 28 avril 2022 portant autorisation de capture avec relâcher immédiat d'espèces de Reptiles et Amphibiens protégés.

Le CEN Corse dispose également d'une autorisation spécifique au Crapaud vert (jusqu'à fin 2027) :

- Arrêté ministériel du 14/12/2022 portant dérogation à la protection stricte des espèces délivrée au Conservatoire d'espaces naturels de Corse dans le cadre des activités de l'association agréée au titre de la protection de l'environnement.

Dans le cas où les inventaires doivent se dérouler sur des terrains privés nécessitant des autorisations particulières (ex. terrains militaires, sites gérés, sites privés, etc.), les autorisations seront dans la mesure du possible toutes demandées en amont du premier passage sur le terrain.

5. CALENDRIER PREVISIONNEL D'INTERVENTION

Chaque année (2025, 2026 et 2027), les prospections et l'acquisition du matériel génétique se dérouleront aux périodes les plus favorables pour l'observation du Crapaud vert, soit essentiellement au printemps : entre février et juin, idéalement lorsque les conditions météorologiques seront les plus favorables à leur activité (température extérieure supérieure à 10°C, humidité de l'air, absence de vent). Pour des raisons évidentes de sécurité, la prospection nocturne sera, dans tous les cas, obligatoirement réalisée en binôme. Les analyses génétiques commenceront dès que suffisamment d'échantillons auront été collectés.

CALENDRIER PREVISIONNEL														
Actions	2024		2025				2026				2027			
	3 ^{ème} tri- mestre	4 ^{ème} tri- mestre	1 ^{er} tri- mestre	2 ^{ème} tri- mestre	3 ^{ème} tri- mestre	4 ^{ème} tri- mestre	1 ^{er} tri- mestre	2 ^{ème} tri- mestre	3 ^{ème} tri- mestre	4 ^{ème} tri- mestre	1 ^{er} tri- mestre	2 ^{ème} tri- mestre	3 ^{ème} tri- mestre	4 ^{ème} tri- mestre
Elaboration stratégi d'échantillon- nage précise et pré- paration du terrain														
Prospection de terrain sur toute la Corse (repérage terrain + prélèvement génétique)														
Traitement des données et rédaction/relecture des rapports														
Analyses génétiques*														
Coordination du projet														
Gestion de projet (administratif et fi- nancier)														
Communication sur l'espèce et commu- nication scienti- fique														

*Analyses génétiques réalisées dès qu'un nombre suffisant d'échantillons seront récoltés.

6. REFERENCES

6.1. Bibliographie

- Ambu, J. & Dufresnes, C. (2023). Buccal swabs for amphibian genomics. *Amphibia-Reptilia*, 44(2), pp. 249–255. Available at : <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10130>.
- Ambu, J. *et al.* (2023). Genomic phylogeography illuminates deep cyto-nuclear discordances in midwife toads (*Alytes*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 183, p. 107783. Available at : <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107783>.
- Barrioz, M. & Miaud, C. (coord.). (2016) Protocoles de suivi des populations d'amphibiens de France, « POPAmphibien Communauté ». *Société Herpétologique de France* – version 2022, 14 p.
- Biotope & MNHN (2014). Plan national d'actions en faveur du Crapaud vert *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) 2014-2018, 124 p.
- Brelsford, A., Dufresnes, C. and Perrin, N. (2016). High-density sex-specific linkage maps of a European tree frog (*Hyla arborea*) identify the sex chromosome without information on offspring sex. *Heredity*, 116(2), pp. 177–181. Available at : <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.83>.

- Broquet, T., Berset-Braendli, L., Emaresi, G. et Fumagalli, L. (2007). Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics*, 8(2) : 509–511.
- Dejean, T., Miaud, C. & Ouellet, M. (2010). La chytridiomycose : une maladie émergente des amphibiens. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, 134 : 27-46.
- Dubey, S. *et al.* (2019). Population genomics of an exceptional hybridogenetic system of *Pelophylax* water frogs. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), p. 164. Available at : <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1482-4>.
- Dufresnes, C. *et al.* (2018). Genomic Evidence for Cryptic Speciation in Tree Frogs From the Apennine Peninsula, With Description of *Hyla perrini* sp. Nov. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, p. 144. Available at : <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00144>.
- Dufresnes, C. *et al.* (2023) 'Delimiting phylogeographic diversity in the genomic era: application to an Iberian endemic frog', *Zoological Journal of the Linnean Society*, p. zlad170. Available at : <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad170>.
- Dufresnes, C., Beddek, M., *et al.* (2019a). Diversification and speciation in tree frogs from the Maghreb (*Hyla meridionalis sensu lato*), with description of a new African endemic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 134, pp. 291–299. Available at : <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.009>.
- Dufresnes, C., Bonato, L., Novarini, N., Betto-Colliard, C., Perrin, N. & Stöck, M. (2014). Inferring the degree of incipient speciation in secondary contact zones of closely related lineages of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup). *Heredity*, 113 : 9-20.
- Dufresnes, C., Brelsford, A., *et al.* (2021a). Mass of genes rather than master genes underlie the genomic architecture of amphibian speciation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118 (36), p. e2103963118. Available at : <https://doi.org/10.1073/pnas.2103963118>.
- Dufresnes, C., Litvinchuk, S.N., *et al.* (2020a). Hybridization and introgression between toads with different sex chromosome systems. *Evolution Letters*, 4(5), pp. 444–456. Available at : <https://doi.org/10.1002/evl3.191>.
- Dufresnes, C., Mazepa, G., *et al.* (2019b). Fifteen shades of green : The evolution of *Bufo* toads revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 141, p. 106615. Available at : <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106615>.
- Dufresnes, C., Nicieza, A.G., *et al.* (2020b). Are glacial refugia hotspots of speciation and cytonuclear discordances? Answers from the genomic phylogeography of Spanish common frogs', *Molecular Ecology*, 29(5), pp. 986–1000. Available at : <https://doi.org/10.1111/mec.15368>.
- Dufresnes, C., Pribille, M., *et al.* (2020c). Integrating hybrid zone analyses in species delimitation: lessons from two anuran radiations of the Western Mediterranean', *Heredity*, 124(3), pp. 423–438. Available at : <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0294-z>.
- Dufresnes, C., Strachinis, I., *et al.* (2019). Phylogeography of a cryptic speciation continuum in Eurasian spadefoot toads (*Pelobates*). *Molecular Ecology*, 28(13), pp. 3257–3270. Available at : <https://doi.org/10.1111/mec.15133>.
- Dufresnes, C., Suchan, T., *et al.* (2021b). Revisiting a speciation classic: Comparative analyses support sharp but leaky transitions between *Bombina* toads. *Journal of Biogeography*, 48(3), pp. 548–560. Available at : <https://doi.org/10.1111/jbi.14018>.

- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 125 : 131–140.
- Geniez, P. & Cheylan, M. (2005). Reptiles et batraciens de France. CD Rom, Educagri Edition, Dijon.
- Gerard, C. (2011). Diversité et structuration génétiques des populations de Crapaud vert en Alsace. Mémoire de D.E.A., Université de Strasbourg.
- Hemmer, H., Kadel, B. & Kadel, K. (1981). The Balearic toad (*Bufo viridis balearicus* (Boettger, 1881)), human bronze age culture, and Mediterranean biogeography. *Amphibia-Reptilia*, 2 : 217–230.
- Lanza, B. (1988). Hypothèses sur les origines de la faune herpétologique corse. *Bull. Ecol*, 19, 163-170.
- Miaud, C. (2022). Protocole d'hygiène pour le contrôle des maladies des amphibiens sur le terrain. Ecole Pratique des Hautes Etudes (ed). 9 p.
- Pereira, E., Ottaviani-Spella, M.-M., Salotti, M., Louchart, A. & Quinif, Y. (2006). Tentative de reconstitution paléoenvironnementale de deux dépôts quaternaires corses. *Geologica Belgica*, 9 : 267-273.
- Peterson, B.K. *et al.* (2012). Double Digest RADseq : An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS ONE*. Edited by L. Orlando, 7(5), p. e37135. Available at : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>.
- 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.
- Salvidio, S., Sindaco, R., Emanuelli, L., & Lanza, B. (1999). The tadpole of the endemic Corsican painted frog *Discoglossus montalentii* (Anura, Discoglossidae). *Italian Journal of Zoology*, 66(1) : 63–69.
- Speybroeck, J. *et al.* (2020). Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica. *Amphibia-Reptilia*, 41(2), pp. 139–189. Available at : <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10010>.
- Stöck, M., Sicilia, A., Belfiore, N.-M., Buckley, D., Lo Brutto, S., Lo Valvo, M. & Arculeo, M. (2008). Post-Messinian evolutionary relationships across the Sicilian channel: Mitochondrial and nuclear markers link a new green toad from Sicily to African relatives. *BMC Evol Biol* : 8, 56.
- Vacher & Ursenbacher (2019). Structuration génétique des populations de *Bufotes viridis* (Amphibia : Bufonidae) du Bas-Rhin et du Haut-Rhin.

6.2. Sitographie

- [1] <http://www.wahre-staerke.com/>