

---

# Rapport de stage individuel

## 5<sup>ème</sup> année

*Ophidiomyces ophiodiicola* : un champignon  
pathogène émergent touchant les serpents

---

Ligue pour la Protection des Oiseaux de  
Bourgogne - Franche-Comté  
7 rue Voirin, 25000 Besançon



Tuteur entreprise :  
Alix Michon  
Chargée de mission herpétologue

Thibault CUENOT

IUT

2021-2022

Tuteur académique :  
Francis Isselin

# Table des matières

Introduction.....	3
Contexte général .....	3
Présentation de la structure d'accueil .....	3
LPO France.....	3
LPO Bourgogne - Franche-Comté .....	4
La LPO en Franche-Comté et la Maison de l'Environnement de Bourgogne – Franche-Comté .....	4
Présentation des missions : .....	6
Un pathogène émergent .....	6
Amélioration de la connaissance régionale .....	6
Accompagnements herpétologiques de porteurs de projet.....	7
Création de nouveaux outils et animation du réseau herpétologique franc-comtois .....	8
Déroulé des missions.....	9
L'étude du pathogène <i>Ophidiomyces ophiodiicola</i> (O.o.) : .....	9
Méthode.....	10
Résultats .....	11
Discussion : .....	15
L'amélioration de la connaissance régionale : .....	17
Accompagnements herpétologiques de porteurs de projet.....	17
CD25 : .....	17
Bilan .....	19
VNF : .....	20
Méthode : .....	20
Bilan : .....	21
Veolia / EDF DPIH: .....	23
SCE Sombacour : .....	23
La création de nouveaux outils et animation du réseau herpétologique franc-comtois : .....	24
Protocole de photo-identification des couleuvres vipérines : .....	24
Présentation du protocole : .....	24
Méthode de validation et résultats : .....	24
Bilan : .....	25
Création de nouveaux supports de travail et d'échange : .....	25
Conclusion .....	26
Bibliographie.....	27
Annexes .....	31

## Table des figures :

Figure 1 : Organigramme de la LPO BFC (Source : LPO BFC) .....	5
Figure 2 : Emprise du programme R-PETO[S] le long de la frontière franco-suisse (Source : LPO BFC) .	7
Figure 3 : Exemples des lésions cutanées provoquées par le champignon <i>Ophidiomyces ophiodiicola</i> : (a) Desquamation avec érosion centrale ; (b) croute jaunâtre/brunâtre ; (c) rides de la peau ; (d) Nodule sous-cutané ; (e) cicatrice d'une ancienne croute (Meier et al., 2018) .....	10
Figure 4 : Bilan des effectifs contactés par espèce pour l'étude du pathogène <i>O.o.</i> (Auteur : CUENOT T.) .....	11
Figure 5 : Répartition des points de prélèvement et des sites avérés de présence du champignon <i>Ophidiomyces ophiodiicola</i> (Auteur : CUENOT T.).....	12
Figure 6 : <i>Podarcis muralis</i> en thermorégulation sur une plaque abri (Auteur : CUENOT T.).....	18
Figure 7 : Bilan des effectifs contactés par espèces sur le site d'Éternoz durant la mesure d'accompagnement avant travaux 2022 (Auteur : CUENOT T.).....	19
Figure 8 : Bilan des effectifs déplacés sur le site de Bart durant la mesure d'accompagnement avant travaux 2022 (Auteur : CUENOT T.).....	19
Figure 9 : Installation pour la mise en captivité des individus de <i>Natrix maura</i> au Muséum de Besançon (Auteur : CUENOT T.).....	21
Figure 10 : Bilan des effectifs contactés par espèces sur le site de Deluz durant le suivi 2022 post- travaux 2020 (Auteur : CUENOT T.).....	21
Figure 11 : Mise en place des œufs de <i>Natrix maura</i> dans un substrat de vermiculite et disposition dans un incubateur à 28°C et saturé en humidité (Dispositif du Muséum de Besançon ; Auteur : CUENOT T.) .....	22
Figure 12 : Bilan des effectifs contactés par espèces sur le site de Deluz amont durant la mesure d'accompagnement avant travaux 2020 (Auteur : CUENOT T.).....	23

## Table des tableaux :

Tableau 1 : Différentes prévalences du pathogène <i>O.o.</i> en Franche-Comté et leur intervalle de confiance à 95%. La première ligne représente le taux de sites de présence avérée du champignon <i>O.o.</i> sur le territoire étudié, la deuxième ligne le taux d'individus positifs à <i>O.o.</i> sur le territoire étudié et la troisième ligne le taux d'individus positifs à <i>O.o.</i> au sein d'un site de présence avérée du champignon (Auteur : CUENOT T.).....	12
Tableau 2 : Typologie des lésions observées lors de l'année d'échantillonnage 2022 basée sur la typologie de Baker et al., 2019 (Auteur : CUENOT T.).....	13
Tableau 3 : Bilan de la validation du protocole de photo identification des individus de <i>Natrix maura</i> (Auteur : CUENOT T.).....	25

## Table des encadrés :

Encadré 1 : Présentation de la méthode d'inventaire par ADN environnemental (Source : Jan et al., 2020).....	17
--	----

## Table des annexes :

Annexe 1 : Protocole d'hygiène en cours de mise à jour (Source : LPO BFC) .....	31
Annexe 2 : Protocole d'écouvillonnage pour l'étude du pathogène <i>O.o.</i> (Auteur : Gaëlle Blanvillain, traduit et enrichi par CUENOT T.).....	33
Annexe 3 : Fiche méthode et protocole de photo identification des individus de <i>Natrix maura</i> (Auteur : CUENOT T.) .....	36
Annexe 4 : Clé des anoures de Bourgogne - Franche-Comté (Auteur : CUENOT T. pour la LPO BFC) "droits d'auteur en cours de demande" .....	44
Annexe 5 : Clé des urodèles de Bourgogne - Franche-Comté (Auteur : CUENOT T. pour la LPO BFC) "droits d'auteur en cours de demande" .....	46
Annexe 6 : Acticle de presse : Vipères : faut-il en avoir peur dans notre quotidien ? (Sabrine ZAHRAN pour Le Progrès, 2022), .....	48

## Remerciements

Je tiens à remercier madame Alix Michon, chargée de mission herpétologue à la Ligue pour la Protection des Oiseaux de Bourgogne - Franche-Comté (LPO BFC), pour son encadrement tout au long de ce stage et sa convivialité. Je remercie également monsieur Pierre Cheveau, chargé de mission expertise et accompagnement à la LPO BFC, monsieur Philomin Briot, chargé d'études herpétologue à la LPO BFC, monsieur Nicolas Lavanchy, directeur adjoint à la LPO BFC ainsi que toute l'équipe salariée pour leur accueil et l'agréable ambiance de travail.

Je remercie aussi tous les collaborateurs ayant permis l'étude de *Ophidiomyces ophidiicola* et plus particulièrement madame Gaëlle Blanvillain, doctorante de l'Université de Virginia Tech, qui nous a fourni le matériel et a réalisé l'entièreté de l'analyse des prélèvements.

Je remercie l'équipe du Muséum de Besançon pour leur implication dans le programme de captivité des couleuvres vipérines ainsi que leur implication dans l'étude du champignon pathogène.

Je remercie aussi monsieur Francis Isselin, maître de conférences écologie à l'école polytechnique de l'université François Rabelais de Tours pour son encadrement pédagogique.

Pour finir, je tiens à remercier les différents bénévoles qui sont venus m'apporter leur aide sur le terrain.

## Logos des organismes ayant contribué à ce stage :



## Programme R-PETO[S] :



*Pour rappel, toutes les espèces d'amphibiens et reptiles citées dans ce rapport sont protégées au nom des articles 2 ou 3 du décret du 8 janvier 2021. Sont donc interdit : « la destruction ou l'enlèvement des œufs et des nids, la destruction, la mutilation, la capture ou l'enlèvement des animaux ; la perturbation intentionnelle des animaux, pour autant que la perturbation remette en cause le bon accomplissement des cycles biologiques de l'espèce considérée ; [...] la destruction, l'altération ou la dégradation des sites de reproduction et des aires de repos des animaux ; [...] la détention, le transport, la naturalisation, le colportage, la mise en vente, la vente ou l'achat, l'utilisation, commerciale ou non, des spécimens prélevés » (Arrêté du 8 janvier 2021 fixant la liste des amphibiens et des reptiles représentés sur le territoire métropolitain protégés sur l'ensemble du territoire national et les modalités de leur protection, 2021).*

*Toutes les manipulations ont donc été réalisées dans le cadre de dérogations préfectorales accordées par la DREAL Bourgogne - Franche-Comté.*

*De plus, ces espèces étant particulièrement touchées par de nombreux pathogènes, un protocole de désinfection strict entre chaque site de travail fut réalisé à partir d'une solution de Virkon S diluée à 1,5% ou d'éthanol à 70% non dilué (Annexe 1).*

*Dans le cadre du code de déontologie de l'association, aucune localisation précise ne sera communiquée dans ce rapport.*

## Introduction

Dans le cadre de ma 3<sup>e</sup> année de cycle ingénieur au sein de l'école polytechnique de l'université François Rabelais de Tours, je fus amené à réaliser un stage de fin d'études de 6 mois allant de mars à août 2022. Ce stage fut réalisé dans le comité territorial Franche-Comté de la Ligue pour la Protection des Oiseaux de Bourgogne - Franche-Comté sous la coordination de Alix Michon, chargée de mission herpétologue au sein de la structure. Les objectifs de ce stage furent de participer :

- à la poursuite de l'étude de la présence du champignon *Ophidiomyces ophiodiicola* découvert in situ sur un individu sauvage de *Natrix maura* en 2020 en moyenne vallée du Doubs (25),
- au travail d'amélioration annuel des connaissances herpétologiques du territoire franc-comtois,
- à l'accompagnement herpétologique de travaux impactants des milieux occupés par l'herpétofaune locale.

## Contexte général

### Présentation de la structure d'accueil

#### LPO France

Afin de pouvoir présenter la structure d'accueil de ce stage, il est indispensable de s'intéresser dans un premier temps à l'échelle nationale de la Ligue pour la Protection des Oiseaux (LPO). D'abord créée en tant que sous-section de la Société Nationale d'Acclimatation de France en 1912, la LPO devient une association loi 1901 à part entière en 1966. Elle est reconnue d'intérêt public par le décret du 3 juillet 1986 (*LPO France, 2022*).

Depuis sa création, le projet associatif de la structure est d'œuvrer pour la protection de la nature en menant 3 actions principales : la préservation et la gestion des espaces naturels ; l'éducation à l'environnement ; la mobilisation de la société. Il s'agit d'une association anthropocentrée portant des valeurs humaines fortes. Elle est apolitique, militante et indépendante, ce qui lui permet de porter ses valeurs jusque dans des actions juridiques. Ses domaines d'intervention sont :

- La connaissance, l'expertise et la recherche ;
- La protection, la conservation et la défense ;
- La gestion et la reconquête ;
- L'éducation et la valorisation

Afin de défendre ses valeurs, la LPO a pour stratégie 2017-2022 de démultiplier l'engagement en faveur de la biodiversité, de mobiliser les citoyens pour mettre la nature au cœur de la société, d'inscrire la LPO dans une dynamique et une culture internationale, européenne et ultra-marine et de sécuriser le fonctionnement actuel de la structure. En plus de cela, de nombreux positionnements éthiques et déontologiques sont pris et doivent être appliqués par l'équipe salariée et dans les diverses actions menées par la structure (*LPO France, 2022*).

Sous la présidence actuelle de monsieur Allain Bougrain Dubourg, la LPO France représente aujourd'hui pas moins de 64 000 adhérents, 8 000 bénévoles et 600 salariés présents sur l'intégralité du territoire national. Ce réseau permet la mise en place de nombreuses actions de conservation et de sensibilisation avec environ 500 000 personnes sensibilisées chaque année (*LPO France, 2022*).

Sur le plan plus scientifique, elle mène 16 plans nationaux en faveur d'espèces d'oiseaux menacés, 10 programmes européens de sauvegarde de la nature et possède un réseau de 7 centres de sauvegarde

ainsi qu'un réseau de 62 000 contributeurs actifs de données naturalistes. La LPO permet aussi la gestion de 24 000ha de sites naturels, 24 réserves naturelles nationales ou régionales et de très nombreux refuges LPO (*LPO France, 2022*).

Le financement de toutes ces actions se fait de différentes manières. 64.7% des fonds de la LPO France proviennent de financements privés contre 35.3% de fond d'origine publique. Cette volonté de diversification des financements donne à la structure une indépendance supplémentaire dans ses décisions (*LPO France, 2022*).

Bien que la structure nationale soit omniprésente sur la scène de la protection de l'environnement, la LPO est déclinée dans la quasi-totalité des régions de France par une structure locale suivant le même projet associatif. Ces structures sont régies par le régime associatif loi 1901 et signe une convention avec la LPO France. Les LPO régionales ont leurs financements propres (*LPO France, 2022*).

### LPO Bourgogne - Franche-Comté

À l'échelle de la Bourgogne - Franche-Comté, l'existence d'une LPO couvrant l'entièreté de la grande région date du 1<sup>er</sup> janvier 2021. À cette date, les LPO de Franche-Comté, Côte d'Or & Saône-et-Loire, Yonne et Nièvre ont fusionnées pour créer la LPO Bourgogne - Franche-Comté. La création de cette nouvelle structure a permis la réunion de plus de 3000 adhérents et près de 40 salariés dont l'organigramme est représenté sur la *Figure 1*. La LPO BFC se compose aussi de 4 sites où sont établies les structures locales et une réserve naturelle nationale, celle du Sabot de Frotey. Cette nouvelle structure a pour objectif de porter les valeurs de la LPO France sur le territoire régional (*LPO BFC, 2022*).

La présidence de l'association est aujourd'hui détenue par Bernard Marchiset (*LPO BFC, 2022*).

### La LPO en Franche-Comté et la Maison de l'Environnement de Bourgogne - Franche-Comté

Ce stage s'est déroulé au sein du comité territorial Franche-Comté de la LPO BFC basé à Besançon. Cela fut possible grâce à l'intérêt particulier porté à l'herpétologie par la structure. Elle est référente pour la Franche-Comté dans le domaine avec une équipe de 3 salariés dont le travail est uniquement consacré à l'herpétologie : Alix Michon (chargée de mission herpétologie), Pierre Cheveau (chargé de mission expertise et accompagnement) et Philomin Briot (chargé d'études herpétologie).

Les bureaux du comité territorial Franche-Comté de la LPO BFC sont situés au sein de la Maison de l'Environnement de Bourgogne - Franche-Comté (MEBFC). La LPO est ainsi au centre des actions environnementales. La structure MEBFC est constituée par l'association du comité territorial Franche-Comté de la LPO BFC et 8 autres associations œuvrant en faveur des citoyens et de la biodiversité que sont Ajena, le Conservatoire botanique national de Franche-Comté – Observatoire régional des invertébrés, le Conservatoire des Espaces Naturels de Franche-Comté, la FEDERATION CEN – Pôle relais tourbières, France Nature Environnement Bourgogne - Franche-Comté, France Nature Environnement Doubs, le GRAINE Bourgogne - Franche-Comté et l'Office Pour les Insectes et leur Environnement de Franche-Comté (*MEBFC, 2022*).

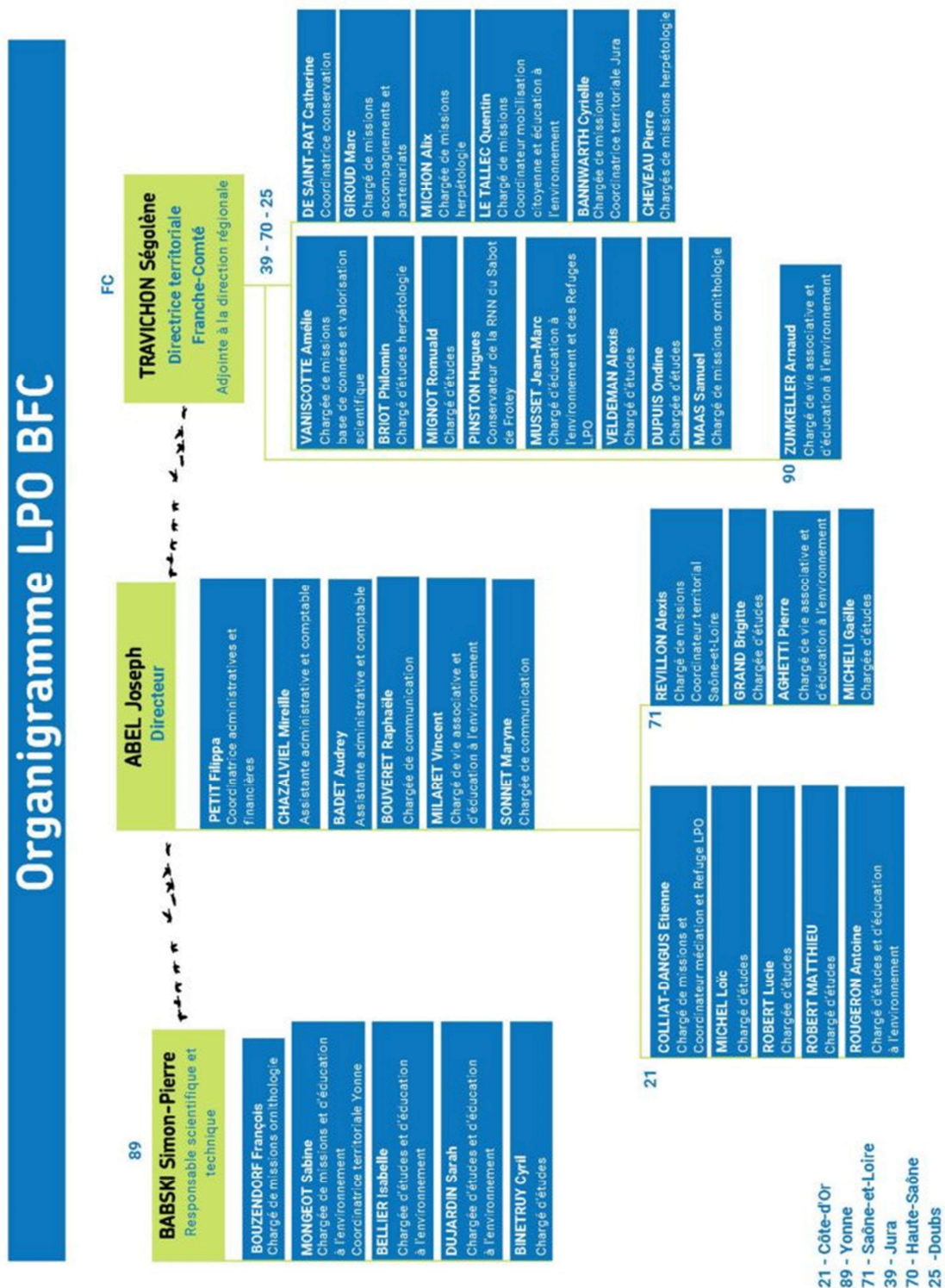


Figure 1 : Organigramme de la LPO BFC (Source : LPO BFC)

## Présentation des missions :

Tout au long de ce stage, j'ai été amené à travailler sur des missions diverses et variées présentant les différentes facettes d'un poste de chargé de mission. L'intégralité de ces missions a permis la réalisation d'un pool de données permettant de continuer l'étude du champignon pathogène *Ophidiomyces ophiodiicola*. L'étude de ce champignon représente le cœur de ce stage.

### Un pathogène émergent

Mission principale de ce stage, un travail de recherche en collaboration avec Mme Gaëlle Blanvillain (doctorante à l'Université de Virginia Tech, USA) fût réalisé tout au long de ces 6 mois afin de continuer l'étude du champignon pathogène *Ophidiomyces ophiodiicola* (O.o.). Découvert en 2021 lors d'un accompagnement herpétologique de travaux pour Voies Navigables de France (VNF) (visant à la mise en captivité des individus de *Natrix maura* à la citadelle de Besançon durant la phase de travaux), un champignon du nom de *Ophidiomyces ophiodiicola*, initiateur de la Snake Fungal Disease (SFD) récemment renommée ophidiomycose, fut détecté. Cette découverte étant une première pour le territoire français (en dehors d'une observation non publiée par le CNRS de Moulis), la porte fut ouverte à de nombreuses questions de conservation telles que l'importance de la prise en compte de ce pathogène dans les protocoles et mesures liés à la conservation des différentes espèces de reptiles. La mission principale de ce stage fut donc d'effectuer un premier travail bibliographique afin de prendre connaissance des travaux déjà effectués sur le champignon, d'échanger avec le monde vétérinaire afin de mieux connaître les moyens de guérison et de détection de ce pathogène et de constituer une base de données au travers des différentes missions de la LPO BFC afin de rechercher ce pathogène sur l'ensemble du territoire régional, d'en mesurer l'impact et d'enrichir les données de Gaëlle Blanvillain pour son étude à échelle européenne.

C'est ainsi que j'ai été amené à participer aux différents projets annuels d'amélioration des connaissances herpétologiques régionales financés par les financeurs principaux de la LPO BFC (Etat, Région, Département du Doubs, Agence de l'eau RMC) et en particulier au nouveau programme R-PETO[S]. J'ai aussi été amené à participer à des prestations d'inventaires, de suivis et d'accompagnement herpétologiques de travaux.

### Amélioration de la connaissance régionale

Chaque année, la LPO BFC a une mission d'amélioration de la connaissance sur son territoire. En 2022, cette amélioration de la connaissance a eu principalement lieu le long de la frontière Suisse. Sur cette zone, un programme visant à l'amélioration des connaissances et à l'évaluation des enjeux de conservation de 17 espèces cibles (*Vipera berus*, *Vipera aspis*, *Lissotriton vulgaris*, *Triturus cristatus*, *Coronella austriaca*, *Natrix maura*, *Salamandra salamandra*, *Hyla arborea*, *Pelophylax lessonae*, *Rana dalmatina*, *Rana arvalis*, *Bombina variegata*, *Alytes obstetricans*, *Bufotes viridis*, *Epidalea calamita*, *Lacerta bilineata*, *Zootoca vivipara*) et de leurs habitats a vu le jour. La programmation de ce dernier est construite de 2021 à 2024 afin de répondre au mieux aux enjeux d'un vaste territoire. En effet, d'origine transfrontalière, le projet s'étale sur une bande de 20km, longeant la frontière franco-suisse, allant du Sundgau Belfortain au nord jusqu'au pays genevois au sud (Figure 2). Ce territoire a été désigné comme zone prioritaire de par la forte pression foncière engendrée par la frontière et par les grosses lacunes de connaissances naturalistes sur ce secteur. Ce projet, intitulé R-PETO[S] (Recherche et Protection d'Espèces Transfrontalières : Observer et Sensibiliser), et initié par la LPO BFC, en est aujourd'hui à sa première phase. Ce programme se décline en 3 axes que sont :

- Améliorer la connaissance de l'herpétofaune sur ce territoire,
- Sensibiliser les acteurs socio-économiques quant aux enjeux herpétologiques locaux,
- Mettre en place des actions de conservation en faveur de ces espèces.

Le plus gros des missions réalisées a été consacré à de la prospection visant à combler les lacunes de connaissance ainsi que l'inventaire des milieux à restaurer / créer.

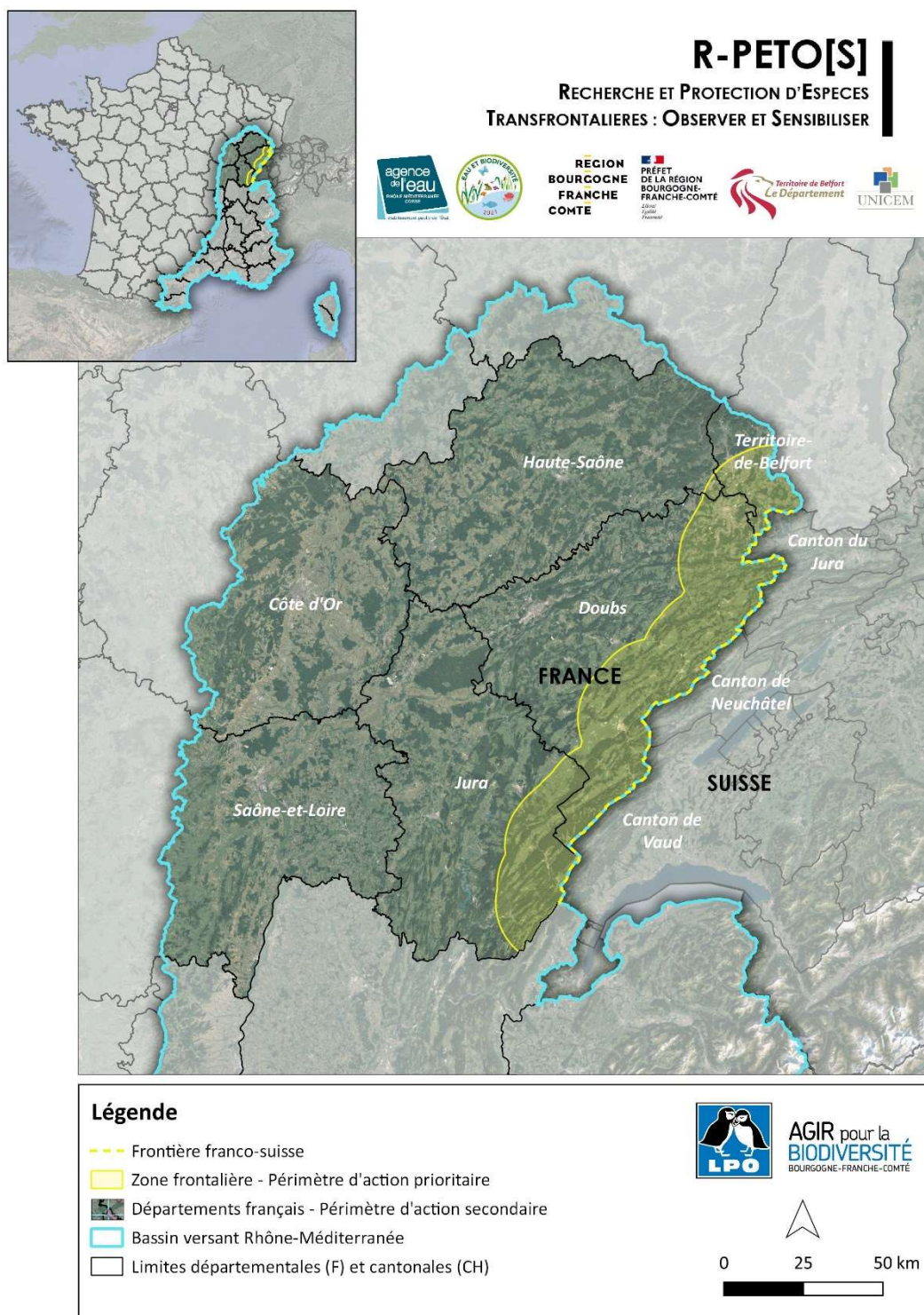


Figure 2 : Emprise du programme R-PETO[S] le long de la frontière franco-suisse  
(Source : LPO BFC)

### Accompagnements herpétologiques de porteurs de projet

En-dehors des fonds publics octroyés par les différentes institutions régionales, la Ligue pour la Protection des Oiseaux répond également à des demandes de prestations de service pour différentes structures, publiques ou privées. C'est ainsi que nous avons été amenés à travailler pour le Conseil Départemental du Doubs (CD25), pour Voies Navigables de France (VNF), pour VEOLIA, pour la branche hydroélectricité d'Électricité de France, branche hydroélectrique (EDF DPIH) ou encore pour la Société des Carrières de l'Est (SCE) à Sombacour. Six prestations différentes furent réalisées. Ces demandes de prestations sont réalisées de manière volontaire par les structures ou pour répondre aux exigences des arrêtés préfectoraux encadrant leurs travaux. Parmi ces six prestations, on peut distinguer deux catégories : les prestations d'inventaires et de suivis et les prestations d'accompagnement herpétologiques de travaux. Trois prestations d'inventaire furent effectuées pour les entreprises VEOLIA, EDF DPIH et SCE Sombacour et une prestation de suivi post-travaux fut réalisée pour l'entreprise VNF. L'entreprise VNF a aussi fait appel à la structure pour réaliser des mesures d'accompagnement herpétologique de futurs travaux tout comme le Conseil Départemental du Doubs (CD25).

Dans le cas d'accompagnement herpétologique de futurs travaux, le soutien de la LPO BFC est assuré au porteur de projet tout au long de la vie des projets : les années précédant les travaux avec le montage du cahier des charges de moindre impact écologique dont dérogations au titre des espèces protégées, avant les travaux avec les captures et déplacement des individus dans les emprises, et après travaux avec l'accompagnement des mesures de recréation de micro habitats favorables aux déplacements et à l'accomplissement du cycle de vie de la petite faune.

Un échantillonnage systématique des serpents inventoriés a été réalisé dans le cadre de ces différentes missions de terrain, enrichissant le pool d'individus testés à O.o..

### Création de nouveaux outils et animation du réseau herpétologique franc-comtois

En parallèle des missions principales présentées ci-dessus, ce stage fut aussi l'occasion de créer de nouveaux outils à destination des salariés et des bénévoles. Ces différents outils prennent la forme de documents de communication ou encore de supports techniques d'aide à l'identification.

En plus de cela, j'ai été amené à tenir plusieurs stands de sensibilisation aux enjeux de l'herpétofaune et à effectuer des médiations de cohabitation avec la faune sauvage dans le cadre de SOS Serpent.

## Déroulé des missions

### L'étude du pathogène *Ophidiomyces ophiodiicola* (O.o.):

De nos jours, une forte augmentation de l'émergence de pathogènes est observée partout dans le monde (Fisher et al., 2012). De nombreuses maladies telles que la chytridiomycose sont d'ores et déjà au centre des enjeux de conservation (Daszak et al., 1999). Parmi ces nombreuses maladies émergentes, la SFD (Snake Fungal Disease) ou ophidiomycose, provoquée par le champignon *Ophidiomyces ophiodiicola* (O.o.), vient toucher les populations sauvages de serpents.

Premièrement étudié dans la nature en 2008 dans l'est de l'Amérique du Nord (Allender et al., 2011), il s'est avéré largement répandu sur ce territoire (22 états américains et une province canadienne (Thompson et al., 2018)) où il fut déterminé comme cause principale de mycose cutanée chez les serpents sauvages (Lorch et al., 2016). Le plus souvent restreint à des infections moyennes, le champignon a déjà été observé comme pouvant conduire à une forte morbidité, et à une mortalité conduisant au déclin de certaines populations de serpents (Allender et al., 2011; Clark et al., 2011). Cette maladie émergente représente donc un enjeu majeur dans la conservation des populations de serpents d'autant plus que O.o. est capable de s'adapter à une large gamme de pH, de températures et de substrats (Allender et al., 2015).

Bien qu'observées sur des individus en captivité depuis les années 1980 sur plusieurs continents dont l'Europe (Sigler et al., 2013), les données relatives à des contaminations en milieux naturels sont restées cantonnées à l'Amérique du Nord jusqu'en 2017 (Lorch et al., 2016). Après l'analyse de 335 échantillons largement répartis en Grande-Bretagne et un échantillon en République tchèque, Lydia H. V. Franklins (Assistant de recherche à la Zoological Society of London) et son équipe ont réussi à démontrer la présence de l'agent pathogène O.o. sur ces territoires. Les espèces impactées par la SFD dans cette étude sont *Natrix helvetica*, *Natrix tessellata* ainsi que *Vipera berus*. Franklins et son équipe ont alors réussi à mettre en avant une présence européenne de O.o. remontant au minimum à 2010 (Franklins et al., 2017). À cette première étude est venue s'ajouter en 2018 une présence avérée de O.o. sur une *Natrix helvetica* dans le Tessin suisse venant confirmer la présence du champignon en Europe continentale (Meier et al., 2018). La LPO BFC a quant à elle découvert le champignon sur des individus sauvages de *Natrix maura* prélevés dans le Département du Doubs dans le cadre d'un programme de captivité mis en place en 2021 (données non publiées). Plus récemment, l'analyse génétique des souches européennes a déterminé qu'il existerait un ancêtre commun avec les souches américaines qui daterait de 2000 ans. Il est donc probable que la présence du champignon en Europe soit très ancienne. Toutefois cela n'a pas encore pu être démontré (Ladner et al., 2022). Une étude qui sortira prochainement confirme une présence du pathogène O.o. en Suisse en 1959 (Origgi et al., in press).

Même si de nombreuses zones d'ombres persistent quant aux origines de O.o., 3 clades ont clairement été identifiés : le clade I, européen et constitué à ce jour de 4 souches, le clade II composé des 65 souches américaines et le clade III composé de 3 souches uniquement observées en captivité. Pour les clades touchant les animaux sauvages, il a été montré que les clades I et II ont partagé un ancêtre commun il y a moins de 2000 ans. Peu de précisions supplémentaires hormis sa potentielle ancienneté n'existent encore pour le clade I car celui-ci est encore au début de son analyse. Néanmoins, les premières observations suggèrent que la présence du clade I en Europe est antérieure aux mouvements anthropiques des serpents ce qui induirait un endémisme du pathogène sur notre territoire. Pour le clade II présent en Amérique, l'hypothèse de diverses introductions liées aux mouvements anthropiques des serpents apparaît la plus plausible (Ladner et al., 2022). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de préciser l'origine de O.o. sur le territoire d'autant plus que son essor serait favorisé par les bouleversements subis par l'environnement et les prédispositions des

individus (Clark et al., 2011; Lorch et al., 2016). La connaissance de l'origine du pathogène permettrait alors de mieux connaître la résistance des animaux face à son émergence. En effet, dans le cas d'une faible diversité génétique du pathogène et d'une présence ancestrale en Europe, les serpents de nos régions seraient extrêmement sensibles à l'introduction de souches d'autres clades (Ladner et al., 2022)

En partenariat avec la doctorante de l'Université de Virginia Tech Madame Gaëlle Blanvillain et de l'équipe du Muséum de Besançon, l'objectif de ce premier travail sur le territoire franc-comtois sera de caractériser la souche présente sur le territoire, d'estimer sa prévalence<sup>1</sup> et sa répartition.

### Méthode

Afin de réaliser cette étude et de déterminer les premières tendances de la maladie, un protocole d'écouvillonnage par frottis cutanés (Annexe 2) fut réalisé ainsi qu'un examen visuel des serpents capturés afin de repérer d'éventuels signes cliniques du champignon. Bien que variables, les syndromes de la maladie comprennent le plus souvent des croûtes jaunâtres / brunâtres, une décoloration des écailles, des rides de la peau, un épaissement local de la peau, des nodules sous-cutanés, une desquamation et une léthargie (Figure 3). Dans les cas les plus graves, des ulcérations cutanées et des gonflements et nodules faciaux viennent s'ajouter aux syndromes précédemment évoqués. Cette accumulation de syndromes peut aller jusqu'à entraîner la mort de l'individu contaminé (Allender et al., 2011; Dolinski et al., 2014; Glorioso et al., 2016; Lorch et al., 2015; McBride et al., 2015).

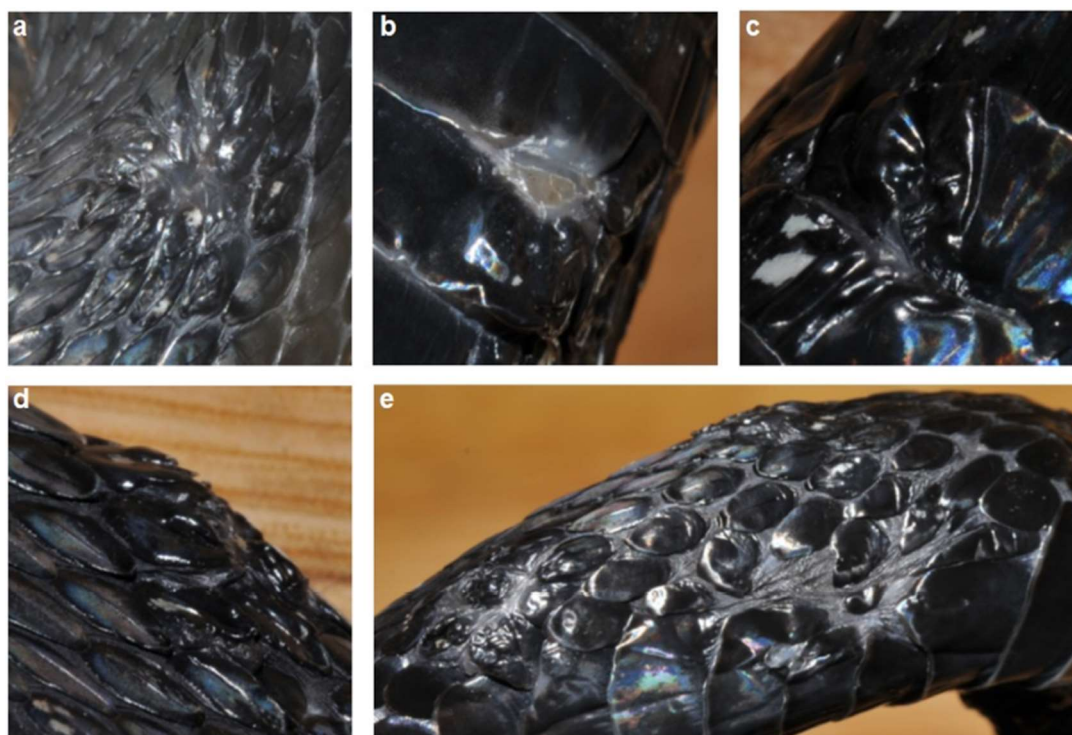


Figure 3 : Exemples des lésions cutanées provoquées par le champignon *Ophidiomyces ophiodiicola* : (a) Desquamation avec érosion centrale ; (b) croûte jaunâtre/brunâtre ; (c) rides de la peau ; (d) Nodule sous-cutané ; (e) cicatrice d'une ancienne croûte (Meier et al., 2018)

En parallèle des syndromes macroscopiques, on peut aussi observer des effets de la SFD sur le comportement des serpents. Les individus contaminés sont alors sujets à des anomalies dans la recherche de nourriture ou dans le comportement de thermorégulation entraînant une

<sup>1</sup> « Nombre de cas de maladie ou de personnes malades ou de tout autre événement tel qu'un accident, existant ou survenant dans une population déterminée, sans distinction entre les cas nouveaux et les cas anciens, soit à un moment précis, soit au cours d'une période donnée » (CNRTL, Méd. Biol. t.3 1972)

augmentation du risque de prédation (McBride et al., 2015). Une remarque détaillant le comportement a été rédigée par l'observateur en cas de telles observations.

Ce protocole a été appliqué durant l'entièreté des missions herpétologiques de la LPO BFC afin de capturer et écouvillonner un maximum de serpents. Un total de 5 personnes furent amenées à effectuer la manipulation. Le parti a été pris de limiter le nombre d'intervenants afin que la procédure soit au maximum standardisée.

Les mues et cadavres frais ont aussi été prélevés pour analyses.

Les analyses des prélèvements ont été réalisées par PCR quantitative (qPCR)<sup>2</sup> par Gaëlle Blanvillain dans le laboratoire de l'Université de Virginia Tech.

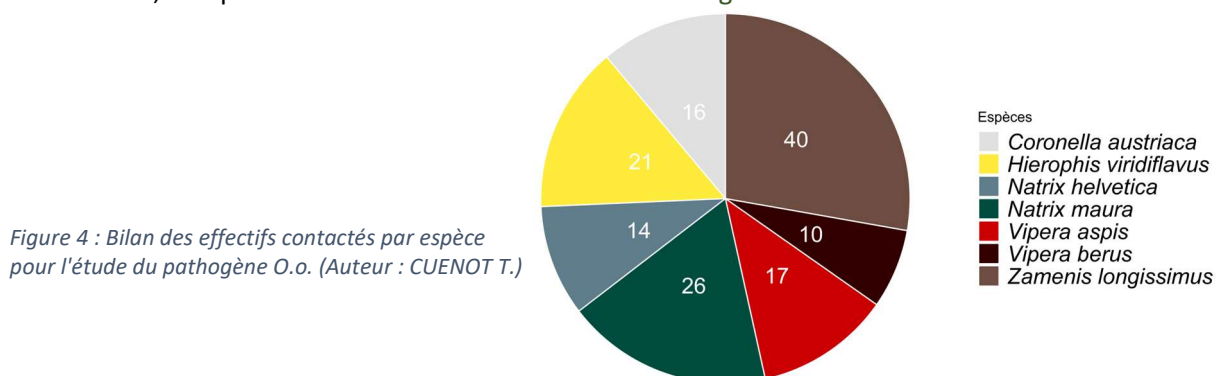
Le traitement statistique a été quant à lui réalisé grâce au logiciel R 4.2.1 (R Core Team, 2022) via l'interface RStudio (RStudio Team, 2020). Les packages « binom » (Dorai-Raj, 2022), « ggplot2 » (Wickham, Chang, et al., 2022), « dplyr » (Wickham, François, et al., 2022) et « tidyr » (Wickham, Girlich, et al., 2022) furent utilisés.

Le traitement cartographique a été réalisé via le Système d'Information Géographique QGIS (QGIS.org, 2022).

## Résultats

### Description de l'échantillon :

Au total, 144 animaux furent échantillonnés. Toutes les espèces présentes en Franche-Comté sont concernées ; la répartition des effectifs est illustrée sur la Figure 4.



Parmi ces 144 animaux, 11 sont issus de prélèvements ou cadavres des années 2020 et 2021 conservés à très basse température. Les 133 individus restants sont tous des prélèvements de l'année 2022 dont 130 serpents et 3 mues.

De plus, 132 animaux ont pu être sexés. Ainsi un sex-ratio (F/M) de 0.9 compose notre échantillon statistique de serpents.

Les classes d'âges sont quant à elles toutes représentées bien qu'assez déséquilibrées avec un total de 97 adultes pour 35 subadultes et 11 juvéniles.

Sur le plan géographique, une grande majorité de la Franche-Comté a été échantillonnée à l'exception d'une partie importante de la Haute-Saône (faute de financements et de temps humain pour ce département) (Figure 5).

<sup>2</sup> Méthode d'amplification des acides nucléiques permettant de quantifier la présence d'un pathogène.

### Analyse de la présence du pathogène :

Après analyse par qPCR, 7 individus sont ressortis positifs à *O.o.* Ces 7 individus sont composés de 5 *Zamenis longissimus* et de 2 *Hierophis viridiflavus*. Ces animaux sont répartis sur 2 sites (Figure 5). Seulement 3 prélèvements ont pu être réalisés sur le site de Myon ce qui limite l'analyse. Le second site est celui de Éternoz sur lequel nous avons réalisé un total de 19 prélèvements.

Bien que l'échantillon d'individus positifs soit trop faible pour dessiner des tendances quant à l'écologie du pathogène en Franche-Comté, il est néanmoins possible d'obtenir plusieurs résultats quant à la prévalence de ce champignon (Tableau 1). En effet, on remarque qu'il existe en région une présence du champignon dans 0.4 à 16% des sites pour un nombre de serpents contaminés par l'ophidiomycose entre 2.2 et 9.9%. De plus, lorsqu'une présence du champignon sur un site est avérée, une prévalence comprise entre 15 et 54% peut-être observée.

Tableau 1 : Différentes prévalences du pathogène *O.o.* en Franche-Comté et leur intervalle de confiance à 95%. La première ligne représente le taux de sites de présence avérée du champignon *O.o.* sur le territoire étudié, la deuxième ligne le taux d'individus positifs à *O.o.* sur le territoire étudié et la troisième ligne le taux d'individus positifs à *O.o.* au sein d'un site de présence avérée du champignon (Auteur : CUENOT T.)

Type de prévalence	Moyenne	Intervalle de confiance à 95% de Agresti-Coull
$\frac{\text{Nbr de sites de présence avérée}}{\text{Nbr de sites total}}$	0.045	[0.004 ; 0.16]
$\frac{\text{Nbr individus positifs}}{\text{Nbr individus total}}$	0.049	[0.022 ; 0.099]
$\frac{\text{Nbr individus Doulaize positifs}}{\text{Nbr individus Doulaize total}}$	0.32	[0.15 ; 0.54]

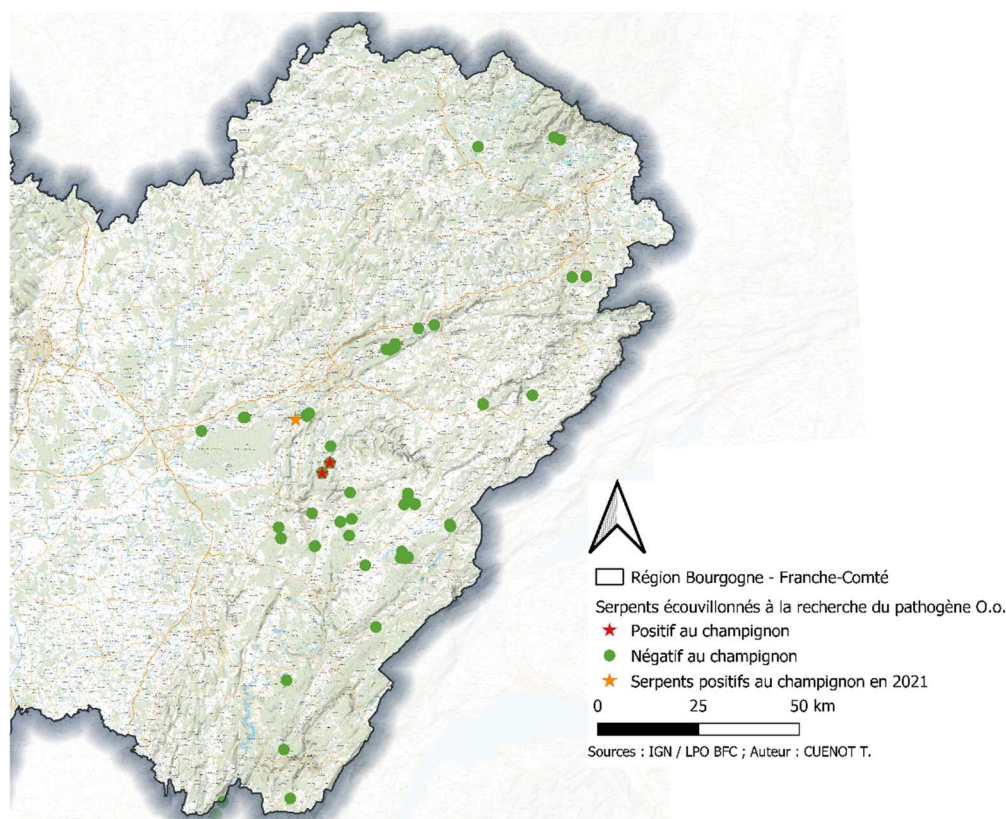


Figure 5 : Répartition des points de prélèvement et des sites avérés de présence du champignon *Ophiomyces ophioidicola* (Auteur : CUENOT T.)




### Caractérisation des lésions en région:


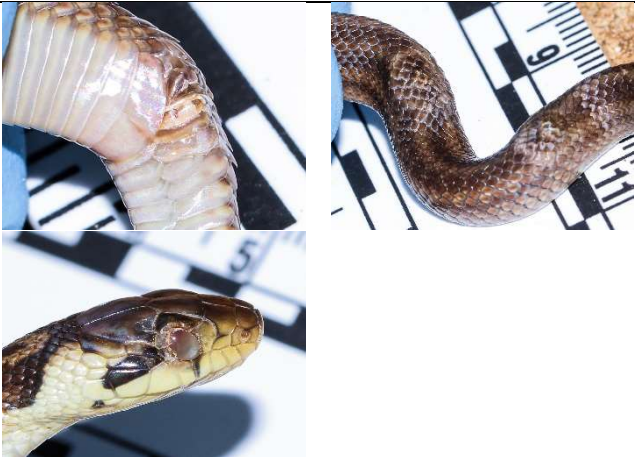


En plus des informations géographiques et épidémiologiques que cette étude a permis de mettre en lumière, des informations quant aux différents types de lésions provoquées par *O.o.* ont elles aussi été relevées. Cela permet notamment de donner une illustration de l'expression du pathogène sur nos espèces locales.

Bien que de nombreux serpents nous soient apparus lésionnels sur le terrain, les signes cliniques étudiés ci-dessous ne concernent que les 7 individus dont la qPCR s'est révélée positive à *O.o.*.

Le **Tableau 2** ci-dessous présente les différents types de lésions engendrées par *O.o.*, observées durant l'année 2022. Celles-ci furent typées selon le travail de Baker et al., 2019. On remarque une grande diversité de signes cliniques avec néanmoins une dominance d'écailles nécrotiques. Les individus 345 et 110 témoignent des stades les plus avancés de l'ophidiomycose avec des lésions mettant en péril la vie de l'individu concerné. L'individu 345 fut observé totalement apathique lors de sa manipulation.

Tableau 2 : Typologie des lésions observées lors de l'année d'échantillonnage 2022 basée sur la typologie de Baker et al., 2019 (Auteur : CUENOT T.)

Numéro de l'individu	Lésions observées	Type de lésion
375		Croûtes + anomalies d'écailles (déplacées ou épaissies)
19		Écailles à la limite de l'ulcération
17		Écailles nécrotiques

378		Ulcères
345		Ulcères avec centre nécrotique + granulome
110		Ulcères + croûtes + écailles nécrotiques
357		Écailles nécrotiques

### Discussion:

Bien que le nombre de sites écouvillonnés reste relativement faible (44), une première estimation du pourcentage quant à la présence du pathogène sur un site en région a pu être évaluée entre 0.4 et 16%. Ces valeurs nous indiquent que le champignon est bel et bien présent sur notre territoire et qu'il est important de considérer le risque de présence à sa juste valeur. De plus, le site de Éternoz nous a donné un exemple de situation lorsqu'un site est réellement touché par *O.o.* Le bilan y est pour le moins inquiétant avec 32% des animaux observés positifs. Ce chiffre est resté une première observation et il est impossible de dégager une tendance quant à la prévalence moyenne d'un site contaminé. Néanmoins une telle observation pousse au questionnement quant au déplacement d'individus lors de mesures d'accompagnement avant travaux. Dans le cas du site de Éternoz, l'intégralité des serpents ressortis positifs à *O.o.* par qPCR ont été déplacés sur une autre parcelle de la commune. Bien que la matrice paysagère soit très favorable et laisse supposer des échanges naturels entre le site de prélèvement et le site de relâcher, la possibilité d'un portage de pathogène et ces conséquences restent inconnus. Pour limiter le risque de transmission du pathogène sur de larges échelles, il paraît donc préférable de déplacer les animaux en derniers recours (risque de destruction avéré des individus) et dans un site le plus proche possible de la zone de capture (pas de barrière géographique infranchissable naturelle ou anthropique entre le site de capture et le site de relâcher).

De plus, un biais quant à une sous-estimation du nombre réel d'individus positifs reste envisageable, et ce pour plusieurs raisons. La première est que le colis contenant les échantillons est resté immobilisé à l'aéroport pour une raison indéterminée faisant passer le temps de livraison de 3 à 9 jours. Cela peut avoir empêché la détection du pathogène sur un effectif de 3-4 individus selon Gaëlle Blanvillain car le matériel génétique des échantillons a pu légèrement se détériorer. De plus, tout au long de la saison de terrain, un grand nombre de serpents furent observés avec des lésions apparentes notamment des individus de *Coronella austriaca* et des individus de *Natrix maura*. Une interrogation quant à la détectabilité du pathogène est donc omniprésente. L'hypothèse la plus probable est donc que l'année 2022, particulièrement favorable aux reptiles, permet une disparition progressive des signes cliniques de l'ophidiomycose ce qui a pour conséquence de réduire la charge du pathogène et donc sa détection à partir des frottis cutanés des animaux.

En parallèle de tout cela, il est aussi possible de se questionner sur la présence d'autres pathogènes engendrant des signes cliniques similaires à ceux d'*O.o.* En effet, si on prend le cas de *Coronella austriaca*, de nombreuses lésions typiques furent observées lors de ce stage et partout en Europe par Gaëlle Blanvillain. Néanmoins, jamais un individu n'a été testé positif. En revanche, 18 autres espèces de champignons ont été découvertes comme pouvant affecter cette espèce (Dubey et al., 2022). La présence d'autres champignons pathogènes est aussi soutenue par la détection récente d'un nouveau pathogène touchant les vipéridés ibériques (observation prochainement publiée). De plus, les champignons ne sont pas les seuls à causer des lésions aux serpents, des bactéries sont aussi connues comme pouvant attaquer ces espèces (Divers & Stahl, 2019).

Cette étude a aussi permis de constituer une base photographique (non exhaustive) des lésions présentes sur le territoire franc-comtois. Cet apport de connaissances aidera les opérateurs de terrain à plus facilement détecter le pathogène, mais contribue aussi à la connaissance vétérinaire du champignon, indispensable dans des projets de conservation tel que celui de *Natrix maura* actuellement en application.

La conclusion principale de cette étude se trouve dans les mesures applicables aux opérateurs de terrains. La présence de ce pathogène sur le territoire français est maintenant avérée et il semble qu'un pourcentage de sites relativement important puisse être positif. L'enjeu majoritaire est donc de réduire au maximum le portage du pathogène par les opérateurs de terrain grâce à des protocoles

sanitaires semblables à ceux déjà utilisés pour les amphibiens. Cela passe notamment par une désinfection entre sites de l'intégralité du matériel en contact avec le milieu et/ou les serpents potentiellement contaminés avec une solution de Virkon S diluée à 1.5% en respectant un temps de contact de 10 à 60 minutes (cf. Notice fabricant pour action fongicide, virucide et bactéricide) ou avec de l'éthanol à 70% non dilué pour un temps de contact d'au moins 3 minutes (*Rzadkowska et al., 2016*) De plus, il est important de réduire les manipulations à leur minimum afin de limiter au maximum la propagation et le stress des individus (celui-ci pouvant être une des causes principales d'émergence de l'ophidiomycose (*Hewlett, 2021*)).

## L'amélioration de la connaissance régionale :

En parallèle des prestations, des prospections visant à l'amélioration des connaissances dans le cadre du programme R-PETO[S] furent effectuées le long de la bande transfrontalière. Ces prospections ont été réalisées à vue ou par la technique d'ADN environnemental (ADNe) (Encadré 1). Cette méthode, en cours de démocratisation, a notamment permis la recherche d'espèces rares et discrètes telles que *Lissotriton vulgaris*, *Triturus cristatus*, *Alytes obstetricans*, *Bombina variegata*, *Hyla arborea* ou encore *Rana arvalis*. Les analyses de ces prélèvements seront réalisées pour la fin d'année. Une pression supplémentaire a été appliquée aux zones dites « à urbaniser » pour que les enjeux soient mieux pris en compte dans les futurs projets d'aménagement.

De plus en plus démocratisée ces dernières années, la méthode d'inventaire par ADN environnemental est une technique innovante basée sur la recherche d'ADN. Ce processus est basé sur l'analyse de prélèvements d'eau contenant des fragments d'ADN de l'espèce recherchée appelés « extra-organismal DNA ». Ces fragments peuvent être des gamètes, des fragments de tissus, les cellules épithéliales ou tout type de sécrétion des organismes. La technique de « barcoding » et de « metabarcoding » permet par la suite aux laboratoires d'identifier ces fragments d'ADN et de déterminer les espèces présentes dans l'eau. Cette méthode est aujourd'hui largement utilisée en eaux stagnantes et devient de plus en plus utilisée en eaux courantes (Jan et al., 2020). La LPO BFC participe notamment à l'amélioration d'une amorce pour la détection de *Natrix maura* en eau courante.

Encadré 1 : Présentation de la méthode d'inventaire par ADN environnemental (Source : Jan et al., 2020)

Ces prospections furent aussi l'occasion de balayer le territoire et d'enrichir la collecte de prélèvements pour l'étude de pathogène.

## Accompagnements herpétologiques de porteurs de projet

### CD25:

Sur deux sites, des dérogations à la capture, aux déplacements d'espèces protégées ainsi qu'à la destruction d'habitats d'espèces protégées furent obtenues par le CD25 afin de faire des travaux de soutènement de voirie. Dans le cadre de la séquence Eviter Réduire Compenser (ERC), j'ai participé à la réalisation d'une action de réduction visant au déplacement d'individus d'espèces protégées de reptiles menacés de destruction directe par les travaux. Pour les deux sites, l'évitement était impossible étant donné l'enjeu public majeur de réfection des deux zones de chaussée menaçant la sécurité des usagers de la route (effondrement en cours).

### Les sites de travaux:

Le premier site d'action était situé sur la commune d'Éternoz dans le Doubs. Il s'agit d'un ancien mur de soutènement en pierres d'une route départementale en cours d'effondrement. Au centre d'une maille paysagère typique de la confluence Loue-Lison, constituée de forêts de feuillus, pelouses marneuses, haies bocagères, murets et tas de pierres, pâtures agricoles, ce site possédait un enjeu fort sur le plan de l'herpétofaune. Cet enjeu est confirmé par la présence de l'ancien mur de soutènement en pierres dont le crépi ancien laisse apparaître de larges et vastes fissures représentant un site d'estive et d'hivernage parfait pour les espèces de reptiles. Sur ce site, les espèces susceptibles d'être mises en péril par les travaux étaient : *Podarcis muralis* (LC), *Anguis fragilis* (NT), *Zamenis longissimus* (NT), *Hierophis viridiflavus* (NT), *Natrix helvetica* (NT), *Vipera aspis* (NT), *Coronella austriaca* (NT) (Bideau et al., 2020).

Le second site était situé sur la commune de Bart dans le Doubs. Il s'agissait ici d'une berge de canal de l'Alan, en cours d'effondrement mettant en péril une route départementale très fréquentée. La maille paysagère était ici constituée d'une matrice forestière de feuillus, de ripisylve, du canal et du cours d'eau l'Alan. La berge de travaux avait une exposition nord, ce qui diminue l'enjeu de destruction

d'individus, car celle-ci limite la thermorégulation des espèces étudiées. Les espèces susceptibles d'être présentes sur site étaient : *Podarcis muralis* (LC), *Lacerta agilis* (NT), *Anguis fragilis* (NT), *Natrix helvetica* (NT), *Coronella austriaca* (NT) (Bideau et al., 2020).

Une dérogation au titre de la destruction d'habitats d'espèces protégées fût obtenue par le CD25 pour les travaux des deux sites. Pour le premier, les travaux correspondent à la projection de béton sur treillis pour consolider le mur existant et boucher toutes les infractuosités. Pour le second site, les travaux consistent à la réfection complète de la berge par pose de palplanches et remblaiement de l'ancienne berge.

#### Protocole:

Une mesure d'accompagnement avant travaux visant au déplacement des reptiles présents fut réalisée. Pour ce faire, la même méthode fut utilisée sur les deux sites. Par emprise de travaux nous considérons, pour toutes les espèces de reptiles, le linéaire de travaux et dans le cas de milieux aquatiques, nous considérons également le linéaire opposé aux travaux exploité également par les espèces semi-aquatiques. Afin d'augmenter les probabilités de détection et de capture des reptiles nous avons cumulé la méthode des détections visuelles et la méthode des abris artificiels. Ce dispositif consiste en la pose hivernale de plaques abris faites à partir de bandes de roulement de carrière recyclées, tout le long de la zone de travaux. Ces plaques étaient floquées « SUIVI SCIENTIFIQUE » afin de limiter au maximum leur déplacement / vol ainsi que la destruction des espèces qu'elles peuvent abriter (Figure 6). Cette méthode, déjà largement éprouvée, permet de faciliter la capture et la détection des espèces présentes sur site (Graitson & Naulleau, 2005; Marc-Antoine Marchand, 2012). Un total de 11 passages fut ensuite réalisé sur le site d'Éternoz et de 6 passages sur le site de Bart durant lesquels la capture sous plaque fut toujours renforcée par de la capture à vue lors de ces mêmes passages.



Figure 6 : *Podarcis muralis* en thermorégulation sur une plaque abri (Auteur : CUENOT T.)

Pour la capture des lézards, une méthode plus atypique fut utilisée. En effet, ceux-ci furent capturés grâce à des cannes à pêche équipées de nœuds coulants. Le but était alors de venir passer le nœud autour du premier tiers du corps de l'animal pour ensuite le soulever. Cette action provoque la fermeture du nœud et la capture de l'animal (Legreneur, 2015). Cette méthode, bien qu'apparemment violente pour l'animal, est largement utilisée au CNRS de Chizé et permet la capture de lézards sans autotomie de la queue.

Une fois les animaux capturés, ceux-ci sont placés individuellement dans des pochons de capture dans le but d'être déplacés. Cette étape fut aussi l'occasion de procéder à l'écouvillonnage des serpents capturés (processus qui sera décrit dans le volet étude du pathogène de ce rapport).

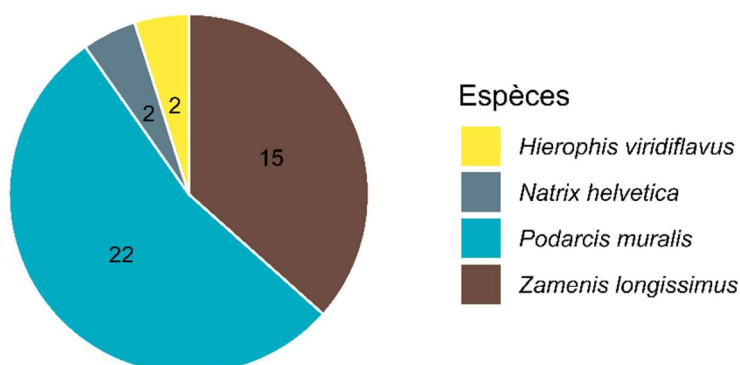
Les zones de déplacements furent choisies le plus proche possible de la zone de capture tout en cherchant à être assez éloignées pour limiter les possibles retours. Pour le site d'Éternoz, un site de déplacement fut choisi à quelques kilomètres, loin de toutes routes départementales afin d'éviter de possibles écrasements. Pour le second site, Bart, les espèces contactées n'étant que des espèces terrestres, le parti fut pris de déplacer les individus en berge opposée, favorable et à l'abri des travaux.

## Bilan

### Éternoz:

Sur le site d'Éternoz, le premier bilan de cette mesure d'accompagnement avant travaux est la capture et le déplacement de 41 animaux pour un total de 45 contacts (Figure 7).

Figure 7 : Bilan des effectifs contactés par espèces sur le site d'Éternoz durant la mesure d'accompagnement avant travaux 2022 (Auteur : CUENOT T.)

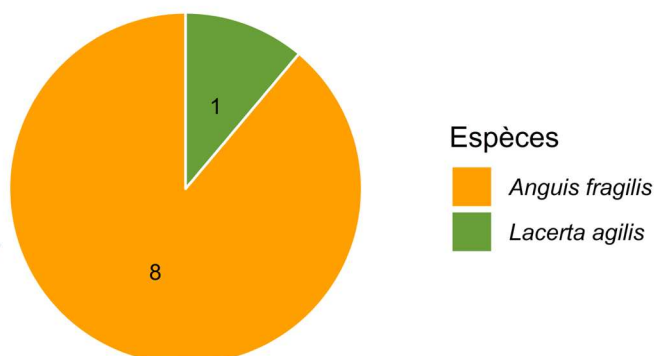


Bien que cette mesure d'accompagnement avant travaux soit en apparence fructueuse, il est possible de s'interroger sur un potentiel effet d'aspiration des populations environnantes. En effet, tout au long du suivi, aucune baisse flagrante des effectifs capturés par session ne fut constatée. De plus cette observation est d'autant plus problématique qu'un contretemps côté maîtrise d'œuvre a provoqué un report de chantier, originellement prévu fin d'été. Au vu de l'impact déjà réalisé au travers du déplacement sur le site, le parti fut pris de décaler les travaux début d'hiver afin de ne pas laisser aux populations environnantes le temps de recoloniser le site. Des travaux reportés d'une année auraient pour conséquence potentielle de doubler l'impact sur site. De nouvelles sessions de captures et de déplacement des reptiles sont donc programmées à l'automne jusqu'au commencement des travaux.

### Bart:

Sur le site de Bart, un total de 26 contacts furent réalisés dont seulement 9 sur la berge de travaux. Les 9 individus de *Lacerta agilis* (1) et *Anguis fragilis* (8) ont été déplacés hors emprise (Figure 8).

Figure 8 : Bilan des effectifs déplacés sur le site de Bart durant la mesure d'accompagnement avant travaux 2022 (Auteur : CUENOT T.)



Sur ce site, aucun contact de serpent n'a eu lieu le long de la zone de travaux et l'ensemble des animaux contactés ont été déplacés. Ce bilan démontre le faible enjeu sur le plan de l'herpétofaune de ce site, dû en grande partie à l'exposition et à la très forte fréquentation de la départementale attenante.

## VNF:

Sur la commune de Deluz, dans le Doubs, deux sites furent le siège de prestations. Un premier, nommé Deluz amont avait pour objectif la réalisation d'un suivi post-travaux réalisés en 2020 ainsi que la mise en place des mesures d'accompagnement avant travaux de deux petits chantiers. Le second tronçon, Deluz aval, avait pour enjeux le recensement des espèces présentes sur le site et la mise en place des mesures d'accompagnement avant travaux afin de réduire de l'impact des travaux par déplacement des reptiles contactés.

### Méthode:

#### Les sites de travail:

Pour le premier site, Deluz Amont, 50m linéaires en berge gauche du canal étaient concernés par la mise en place de palplanches en sommet de perré et une petite zone en berge droite voyait la création d'un enrochement afin de soutenir la berge. Ces deux petites zones de travaux, pour lesquels a été délivrée une dérogation au titre de la destruction d'habitats d'espèces protégées, avaient lieu sur un tronçon où des travaux s'étaient déjà tenus en 2020 et pour lesquels la LPO BFC était déjà intervenue afin d'en réduire les impacts. Les travaux touchant le corps de berge, l'enjeu principal concerne les couleuvres semi-aquatiques. Les autres espèces terrestres de reptiles menacées de destruction directe ont également été déplacées. Les espèces potentiellement présentes sur le site était *Podarcis muralis* (LC), *Anguis fragilis* (NT), *Zamenis longissimus* (NT), *Hierophis viridiflavus* (NT), *Natrix helvetica* (NT), *Vipera aspis* (NT), *Coronella austriaca* (NT) et surtout *Natrix maura* (EN) (Bideau et al., 2020). Ces zones de travaux futures et la zone de travaux passés engendraient un double travail sur ce site. D'une part il fallait agir afin de réduire l'impact des travaux de 2022 en déplaçant les animaux mis en danger et, d'autre part, il fallait réaliser la première année de suivi post-travaux 2020.

Le second site, Deluz Aval, était quant à lui un linéaire de 850m en berge gauche concerné par la mise en place d'un rideau de palplanches afin de restaurer l'étanchéité de la digue. Les espèces potentiellement présentes étaient les mêmes que sur Deluz amont. L'enjeu était double, car l'espèce la plus sensible potentiellement présente, *Natrix maura*, n'était indiquée sur le tronçon que par une donnée historique d'un herpétologue confirmé. Sa potentielle présence augmentait l'enjeu du tronçon.

### Protocole:

Que ce soit pour le suivi post-travaux de Deluz amont ou pour les mesures d'accompagnement avant travaux par déplacement des individus des deux sites, une méthode similaire à celle détaillée pour CD25 fût utilisée. Des plaques abris furent déposées le long de la berge concernée par les travaux / anciens travaux et un total de 24 passages furent effectués. La prospection a été réalisée en sommet de berge et de chaque côté de la digue pour le tronçon de Deluz aval. Pour le tronçon Deluz amont, la hauteur et la pente importantes de berge ont justifié une prospection double par binôme : une personne en haut de berge et une personne équipée de waders en pied de berge dans le canal. Cette méthode de prospection aquatique facilite la détection et la capture des espèces présentes sur site et plus particulièrement l'espèce avec l'enjeu majoritaire, *Natrix maura*. Les prospections ont été réalisées en berges gauche et droite (enjeu couleuvres semi-aquatiques exploitant les deux berges).

Pour ce qui est du déplacement des individus contactés, les deux sites furent étudiés différemment. Pour le site amont, les travaux n'ayant que très peu d'emprise, le parti fut pris de ne déplacer que les individus présents directement sur les zones de travaux pour les grandes couleuvres (*Hierophis viridiflavus* et *Zamenis longissimus*) et de déplacer toutes les couleuvres semi-aquatiques (*Natrix sp.*). Les grandes couleuvres furent déplacées en lisière forestière le long d'une pelouse calcicole située dans la commune et les couleuvres semi-aquatiques furent déplacé d'1km en aval pour *Natrix helvetica* et les *Natrix maura* inférieures à 25cm (individus de l'année précédente (Vacher & Geniez, 2010) particulièrement difficiles à nourrir en captivité (observations du Muséum de Besançon en 2021)). Les individus de *Natrix maura* de longueur supérieure furent mis en captivité au Muséum de Besançon

(Figure 9) afin d'être relâchés à la fin des travaux. Cette mesure d'accompagnement avant travaux, utilisée pour la première fois par la LPO BFC en 2021, fut choisie afin de ne pas vider la station de cette espèce sensible et déjà très menacée. En effet, le déplacement de cette espèce, à la répartition fortement fragmentée en Franche-Comté de par son contexte de limite nord de répartition (*Pinston et al., 2000*), risquerait de créer des isolats de population non viables à long terme. Le parti fut pris de ne pas amener en captivité les juvéniles et petits subadultes pour les raisons liées au nourrissage exprimées précédemment. De plus, les jeunes individus étant dans leur phase de dispersion, ils sont théoriquement moins sensibles à un déplacement.



Figure 9 : Installation pour la mise en captivité des individus de *Natrix maura* au Muséum de Besançon (Auteur : CUENOT T.)

Pour le site aval, tous les animaux furent déplacés dans un milieu très favorable en bordure du Doubs à quelques centaines de mètres du site de capture. Le choix de la proximité fut pris au vu de la matrice paysagère extrêmement favorable aux reptiles laissant espérer l'installation rapide des animaux après déplacement et un retour limité. Les mêmes mesures que pour le tronçon amont furent prévues pour les *Natrix maura*.

Tout comme lors des prestations pour le CD25, chaque capture fut l'occasion d'écouvillonner les animaux pour la recherche du pathogène.

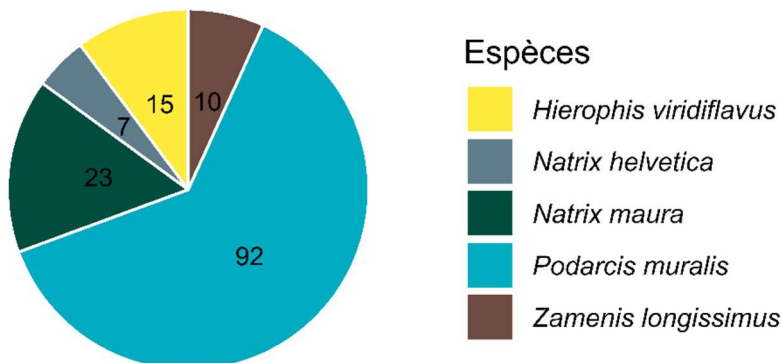
En plus de l'herpétofaune, une vigilance accrue fut donnée à l'observation de Martin-pêcheur d'Europe (*Alcedo atthis*), dont la présence avait été perturbée lors des travaux de 2020 du tronçon amont.

### Bilan:

#### Deluz amont:

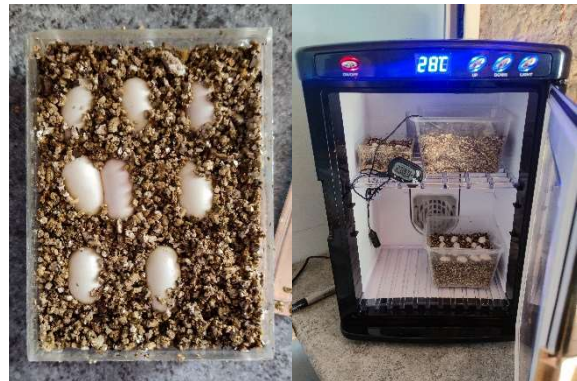
Pour le tronçon amont, le bilan de cette année 2022 se divise en deux. Tout d'abord, pour ce qui est du suivi post-travaux 2022, nous avons contacté cette année un total de 147 animaux dont la répartition des effectifs est illustrée sur la Figure 10.

Figure 10 : Bilan des effectifs contactés par espèces sur le site de Deluz durant le suivi 2022 post-travaux 2020 (Auteur : CUENOT T.)



Le bilan des mesures d'accompagnement pour les petits travaux de 2022 sur ce tronçon est quant à lui plus axé autour de *Natrix maura*. En effet, au total, 20 serpents ont été déplacés des zones de travaux dont 1 *Hierophis viridiflavus*, 4 *Natrix helvetica* et 15 *Natrix maura*. Parmi ces 15 individus, 11 furent placés en captivité au Muséum de Besançon et 4 déplacés en aval. Au sein des individus captifs on retrouve 6 individus femelles et 5 mâles. Les 3 femelles adultes reproductrices ont pondu en captivité un total de 38 œufs en bonne santé. Ces derniers furent placés en incubateurs à 28°C afin d'assurer un bon développement des embryons (Figure 11). Un succès reproducteur de 100% peut être espéré pour le petit pool d'individus captifs en 2022, ainsi que la perspective d'une remise en liberté de 38 juvéniles en bonne forme physique dès le départ des engins de travaux début octobre 2022.

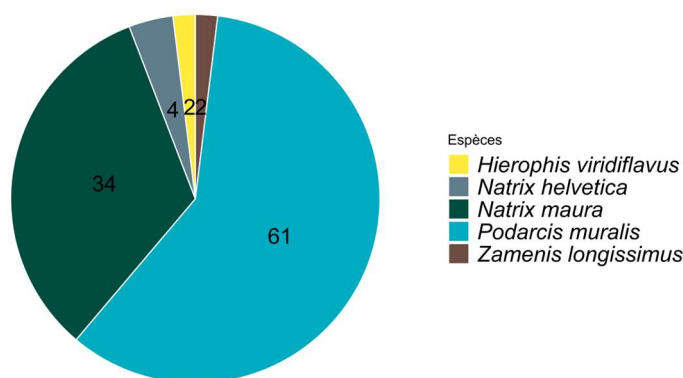
Figure 11 : Mise en place des œufs de *Natrix maura* dans un substrat de vermiculite et disposition dans un incubateur à 28°C et saturé en humidité (Dispositif du Muséum de Besançon ; Auteur : CUENOT T.)



Le bilan du suivi post-travaux 2020 est quant à lui plus mitigé. Les protocoles 2020 et 2022 étant identiques et le nombre de passages étant proches, les données des deux années peuvent être comparées. En 2020, un total de 103 animaux furent contactés. La répartition des effectifs est illustrée sur la Figure 12. Pour ce qui est des grandes couleuvres (*Hierophis viridiflavus* et *Zamenis longissimus*), *Natrix helvetica* et *Podarcis muralis*, les effectifs contactés pendant l'année 2022 ont été multipliés respectivement par 7.5, 5, 1.75 et 1.5. Cette augmentation peut s'expliquer par le fait que toutes les prospections de l'année 2022 furent réalisées en binôme alors que certains passages de 2020 n'étaient réalisés que par une seule personne. Pour *Natrix maura* le bilan est beaucoup moins optimiste. Les effectifs contactés sont 1.5 fois en dessous de ceux de 2020 malgré la pression d'observation supérieure durant leur phase d'activité. Plusieurs hypothèses sont possibles afin d'expliquer cette probable régression de la population. L'année 2021 fut marquée par des épisodes pluvieux très denses durant la phase principale d'activité de l'espèce. Celle-ci étant principalement piscivore, la turbidité accrue de l'eau due aux précipitations a certainement réduit le taux de réussite de prédation. Ce manque de nourriture a probablement affaibli les animaux qui ont ensuite eue des difficultés pour passer l'hiver. Cette hypothèse est notamment confirmée par le fait que la majorité des individus de *Natrix maura* contactés en 2022 étaient particulièrement amaigris et qu'aucun des grands individus présents en 2020 ne fut recontacté. D'autres facteurs tels que les travaux 2020 et la fauche intensive du site peuvent, eux aussi, être en partie responsables de cette réduction d'effectif. Aucune conclusion quant à la cause exacte de disparition des individus de *Natrix maura* ne peut être établie avec certitude néanmoins la perspective d'un soutien de population grâce à la reproduction réussie des individus captifs est une nouvelle encourageante pour l'avenir de la station.

Pour ce qui est du Martin-pêcheur d'Europe, de nombreux contacts furent réalisés bien que très rarement sur le canal. Toutefois deux terriers semblent avoir été récemment visités laissant penser à un début de recolonisation du canal par l'espèce.

Figure 12 : Bilan des effectifs contactés par espèces sur le site de Deluz amont durant la mesure d'accompagnement avant travaux 2020 (Auteur : CUENOT T.)



#### Deluz aval:

Les mesures d'accompagnement avant travaux 2022 du tronçon aval se résument à 12 serpents déplacés dont 10 *Zamenis longissimus*, 1 *Hierophis viridiflavus* et 1 *Natrix helvetica* parmi les 56 animaux contactés. La capture fut un échec pour les 5 *Hierophis viridiflavus*, une *Zamenis longissimus* ainsi que pour les 38 *Podarcis muralis* observés.

Bien que, au départ, une hésitation persistait quant au fait de déplacer les animaux présents sur les deux côtés de la digue, le début des travaux est venu conforter la décision de ce déplacement. En effet, bien que la maîtrise d'ouvrage soit de bonne volonté et tente de réduire au maximum l'ampleur de son impact, les deux côtés de la digue furent totalement touchés par l'installation du rideau de palplanche. Les anciens blocs d'enrochements constituant l'ancienne berge ont en effet été extraits puis stockés de l'autre côté de la digue.

Aucun contact de Martin-pêcheur d'Europe ne fut réalisé sur ce tronçon.

Certes réduit étant donné le déplacement de plus d'une dizaine de serpents, l'impact des travaux reste existant, car il est impossible que l'entière des serpents ait été capturée. C'est pourquoi, deux mesures de réduction / compensation supplémentaires visant à l'installation de passages à faune et à la confection de niches pierreuses le long du linéaire de travaux sont en cours de réflexion. Le tout sera mis en place fin août / début septembre.

#### Veolia / EDF DPIH:

Deux prestations de suivi furent aussi réalisées pour l'entreprise VEOLIA et pour deux sites hydroélectriques EDF DPIH. Le but était ici de recenser les espèces présentes sur place afin d'orienter au mieux les conseils de gestion. Pour les 3 sites, des plaques abris furent disposées et un total de 3 passages fut réalisé pour VEOLIA et 2 passages pour EDF. Bien qu'aucun serpent n'a été contacté sur le site de VEOLIA, les passages pour EDF ont permis d'enrichir la collecte de prélèvements pour l'étude de pathogène.

#### SCE Sombacour:

Une prestation d'inventaire a été réalisée dans la carrière de SCE Sombacour en mettant l'accent dans la future zone d'extension de la carrière. C'est ainsi qu'une espèce à très fort enjeu : *Vipera berus* et des espèces à fort enjeu : *Lacerta agilis*, *Zootoca vivipara* ont été découvertes dans ce périmètre. Ces observations permettent de savoir dès maintenant que des mesures devront être mises en place afin de limiter au maximum l'impact de la zone d'extension sur ces espèces.

Le partenariat avec cette entreprise a aussi permis de monter un projet de restauration d'un cordon de pierre dans la commune afin de recréer un milieu favorable à *Vipera berus*. SCE Sombacour fournit gracieusement les pierres pour ce projet qui sera normalement mis en place en fin d'année.

## La création de nouveaux outils et animation du réseau herpétologique franc-comtois :

En parallèle des missions présentées ci-dessus, ce stage fut aussi l'occasion de travailler sur l'élaboration de nouveaux outils de travail et de communication à destination des salariés et/ou des bénévoles.

### Protocole de photo-identification des couleuvres vipérines :

Lorsque des mesures d'accompagnement avant travaux ont lieu, un suivi post-travaux est imposé par arrêté préfectoral à l'entreprise à partir de l'année N+2. *Natrix maura* étant particulièrement menacée en région, ces mesures d'accompagnement avant travaux font régulièrement intervenir un programme de captivité afin de relâcher les animaux en fin de travaux (voir chapitre VNF). L'enjeu du suivi est donc double pour cette espèce : vérifier que les travaux n'ont pas eu un impact trop conséquent sur le milieu et vérifier la validité du programme de captivité à long terme. Pour cela, un suivi quantitatif par Capture Marquage Recapture (CMR) semble le plus adapté. L'espèce étant encore relativement peu étudiée, très peu de protocoles ont déjà été appliqués à cette espèce. Ce stage fut l'occasion de construire un protocole de photo identification des individus de *Natrix maura* afin de simplifier le travail des opérateurs de terrain qui feront le suivi post-travaux.

### Présentation du protocole :

Afin de réaliser ce protocole, la décision fut prise d'utiliser le logiciel I3S Pattern (*Jurgen den Harto & Renate Reijn, 2014*) (logiciel déjà couramment utilisé dans divers protocoles de CMR (*Calmanovici et al., 2018*)) afin d'automatiser la procédure. L'espèce cible étant *Natrix maura*, le damier ventral fut choisi comme critère d'identification individuelle. Cette méthode d'identification fut déjà utilisée en 2021 par la LPO BFC et le Muséum de Besançon afin de différencier environ une centaine d'individus. Le tout fut détaillé dans une fiche méthode (*Annexe 3*) faisant office de protocole et de guide pour le logiciel.

Les points de repère sont choisis aux extrémités des écailles mentonnières et de la 15<sup>e</sup> plaque ventrale (schéma en *Annexe 3*). Le périmètre d'identification entoure quant à lui les 15 premières plaques ventrales. Le critère du sexe est, lui aussi, implémenté dans la base afin de faciliter la vérification par l'utilisateur.

### Méthode de validation et résultats :

Afin de valider ce protocole, une base de données composée des 134 individus photographiés en 2021 a été réalisée. Celle-ci a été complétée avec 10 individus photographiés en 2022 pour lesquels deux photos ont été réalisées sur le terrain. Une photo par individu était implémentée dans la base et la seconde servait à faire une recherche dans la base de données. Les résultats de ces recherches sont exprimés dans le *Tableau 3*.

Le logiciel I3S Pattern proposant les 10 animaux les plus ressemblants, la position de l'individu recherché est relevée ainsi que le score de ressemblance (plus le score est faible, plus les photos sont ressemblantes).

On peut observer que parmi les 10 individus considérés pour la validation, 8 ont été identifiés par le logiciel.

Tableau 3 : Bilan de la validation du protocole de photo identification des individus de *Natrix maura* (Auteur : CUENOT T.)

<i>Numéro de l'individu</i>	<i>Rang de la proposition</i>	<i>Score de la recherche</i>
364	2	12.52
355	7	20.45
139	9	28
131	10	18.66
95	Non trouvé	/
92	Non trouvé	/
90	10	18.04
88	9	25.91
24	1	9.90
391	3	16.71

#### *Bilan:*

Bien que le logiciel ait réussi à détecter 8 animaux sur les 10 recherchés parmi les 144 animaux implémentés dans la base de données, la grande majorité était proposée parmi les derniers choix. De plus, les scores de recherches sont relativement hauts et les 10 propositions ont toutes un score très proche. L'identification est donc légèrement incertaine. De plus deux animaux n'ont pas été détectés. Le bilan de cette validation de protocole est donc mitigé. Ce dernier fonctionnerait sans problème dans le cas de petites populations comme celle de Deluz, avec des effectifs aux alentours de 30 individus. Néanmoins, dans le cas de grosse population, ce protocole manquerait de précision. Afin de combler cette lacune, il est nécessaire de déplacer le 3<sup>e</sup> point de référence de la 15<sup>e</sup> plaque ventrale à la 20<sup>e</sup> (au minimum) et d'étendre le périmètre d'identification de la même manière. Cette méthode sera testée à plus grande échelle lors du suivi post-travaux d'Osselle qui débutera en 2023.

#### *Création de nouveaux supports de travail et d'échange :*

Ce stage m'a aussi donné l'occasion de confectionner des supports techniques. Une clé de terrain des urodèles (adultes et larves) (Annexe 5) ainsi qu'une clé de terrain des anoues (adultes et larves) (Annexe 4) ont été créées à destination des bénévoles. Ces deux clés sont issues de la réunion de divers ouvrages reconnus pour l'identification des amphibiens de France (Bühler et al., 2007; Duguet & Association pour la Connaissance et l'Étude du Monde Animal et Végétal, 2003; Muratet, 2008; Paysant, 2008c, 2008d, 2008b, 2008a; Speybroeck et al., 2018; Vacher, 2016). En parallèle, un livret de présentation des serpents franc-comtois a été débuté dans le cadre du programme R-PETO[S] à destination du grand public.

En plus de cette confection de support technique, un article fut réalisé lors de ce stage à la suite de la sollicitation de la journaliste Sabine ZAHARAN (Le Progrès) afin de sensibiliser le grand public face aux vipères et améliorer leur image (Annexe 6).

## Conclusion

Pour conclure ce rapport, ce stage fut une première expérience du poste de chargé d'études naturaliste avec un cas pratique en herpétologie. Celle-ci vient fortement compléter la vision purement axée recherche découverte lors du stage de 4<sup>ième</sup> année réalisé en Belgique autour d'un protocole CMR de *Vipera berus*. Les diverses missions m'ont permis de côtoyer les différents acteurs de l'aménagement tel que VNF, CD25, EDF... dont l'intérêt environnemental est le plus souvent d'ordre obligatoire. Au fil de mes missions, j'ai également pu appréhender les missions juridiques des agents de l'Office Français de la Biodiversité (OFB) sollicités par les associations de protection de la nature, notamment dans des cas de destruction d'habitats et des d'espèces protégées.

En plus de cela, un volet recherche fut abordé au travers de l'étude du pathogène *O.o.* permettant de travailler à l'internationale autour d'un sujet de conservation n'ayant pas de frontières. L'étude de ce pathogène m'a effectivement permis de découvrir un volet relativement peu connu de la conservation, celui des maladies émergentes et leur impact sur le travail de terrain. Cette mission m'a ainsi apporté une réelle rigueur sanitaire, passant par la désinfection permanente du matériel et des vêtements de terrain, applicable dans le cadre professionnel et personnel. Ce stage fut aussi une découverte méthodologique notamment au travers de l'inventaire par ADN environnemental des espèces d'amphibiens et de reptiles que ce soit en eau stagnante et en eau courante.

Ce stage m'a aussi donné l'occasion de tenir de nombreux stands d'animation me permettant de travailler mes compétences de vulgarisation et de sensibilisation du grand public. Cela a aussi favorisé la prise de contact avec les différents acteurs de l'environnement, du particulier au professionnel. Bien que délicat auprès du grand public, la présentation des mal aimés de nos régions, les serpents, fut pour moi un fil directeur tout au long de ces 6 mois de stage. Ces compétences ont aussi été mises en application lors d'une conférence pour la Société d'Histoire Naturelle du Doubs (SHND) à laquelle j'ai été amené à participer pour le temps d'échange post-conférence et pour un temps de questions / réponses sur le thème du plan de captivité des individus de *Natrix maura* organisé par le Muséum de Besançon. Cette capacité de vulgarisation et de communication sera encore mobilisée lors du congrès de la Société Herpétologique de France où une communication aura probablement lieu afin de sensibiliser les opérateurs de terrain aux problématiques de pathogènes impactant les serpents.

En parallèle de l'herpétologie, ce stage fut aussi un vecteur de compétences pour le travail en équipe et plus particulièrement en binôme. Ainsi de nombreuses concertations et remises en cause des différents travaux en cours ont eu lieu tout au long du stage afin de toujours répondre à la problématique de moindre impact.

Bien que restreint à 6 mois, ce stage a aussi permis la mise en place de missions futures qui seront abordées lors d'un service civique débutant en novembre 2022. Les missions seront la rédaction d'un article / note permettant de publier les résultats de l'étude du pathogène *O.o.*, la modélisation des habitats favorables aux espèces du programme R-PETO[S] afin de définir les espaces à plus forte priorité ainsi que la poursuite des travaux autour de *Natrix maura* avec le suivi post-travaux d'Osselle 2021 et par conséquent la première utilisation du protocole de photo-identification définie lors de ce stage.

## Bibliographie

- Allender, M. C., Dreslik, M., Wylie, S., Phillips, C., Wylie, D. B., Maddox, C., Delaney, M. A., & Kinsel, M. J. (2011). *Chrysosporium* sp. Infection in Eastern Massasauga Rattlesnakes. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2383-2384. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110240>
- Allender, M. C., Raudabaugh, D. B., Gleason, F. H., & Miller, A. N. (2015). The natural history, ecology, and epidemiology of *Ophidiomyces ophiodiicola* and its potential impact on free-ranging snake populations. *Fungal Ecology*, 17, 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.05.003>
- Arrêté du 8 janvier 2021 fixant la liste des amphibiens et des reptiles représentés sur le territoire métropolitain protégés sur l'ensemble du territoire national et les modalités de leur protection, (2021).
- Baker, S., Haynes, E., Stanford, K., Christman, M., Conley, K., Jr, S., Ossiboff, R., Lobato, D., & Allender, M. (2019). Case Definition and Diagnostic Testing for Snake Fungal Disease. *Herpetological Review*, 50, 279-285.
- Bideau, A., Michon, A., Vaniscotte, A., Pinston, H., Cottet, M., Giroud, I., Bannwarth, C., Paul, J.-P., & Mora, F. (2020). *Listes rouges des Amphibiens et des Reptiles de Franche-Comté. LPO Franche-Comté. LPO Franche-Comté, DREAL Bourgogne-Franche-Comté, Conseil régional de Bourgogne-Franche-Comté.*
- Bühler, Ch., Cigler, H., & Lippuner, M. (2007). *FAUNA HELVETICA 18: Larves d'amphibiens ; Détermination* (karch, CSCf&SEG).
- Calmanovici, B., Waayers, D., Reisser, J., Clifton, J., & Proietti, M. (2018). I3S Pattern system as a mark-recapture tool for captured and free-swimming sea turtles : An assessment. *Marine Ecology Progress Series*, 589. <https://doi.org/10.3354/meps12483>
- Clark, R. W., Marchand, M. N., Clifford, B. J., Stechert, R., & Stephens, S. (2011). Decline of an isolated timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) population : Interactions between climate change, disease, and loss of genetic diversity. *Biological Conservation*, 144(2), 886-891. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.12.001>
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E., & Speare, R. (1999). Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6), 735-748. <https://doi.org/10.3201/eid0506.990601>
- Divers, S. J., & Stahl, S. J. (2019). *Mader's reptile and amphibian medicine and surgery*. SAUNDERS.
- Dolinski, A. C., Allender, M. C., Hsiao, V., & Maddox, C. W. (2014). Systemic *Ophidiomyces ophiodiicola* Infection in a Free-Ranging Plains Garter Snake (*Thamnophis radix*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 24(1), 7. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-24.1.7>

- Dorai-Raj, S. (2022). *binom : Binomial Confidence Intervals for Several Parameterizations* (1.1-1.1). <https://CRAN.R-project.org/package=binom>
- Dubey, S., Pellaud, S., Gindro, K., Schuerch, J., Golay, J., Gloor, R., Ghali, K., & Dubey, O. (2022). Fungal infection in free-ranging snakes caused by opportunistic species. *Emerging Animal Species*, 3, 100001. <https://doi.org/10.1016/j.eas.2022.100001>
- Duguet, R., & Association pour la Connaissance et l'Étude du Monde Animal et Végétal (Éds.). (2003). *Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg*. Éditions Biotope.
- Fisher, M. C., Henk, Daniel. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186-194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Franklinos, L. H. V., Lorch, J. M., Bohuski, E., Rodriguez-Ramos Fernandez, J., Wright, O. N., Fitzpatrick, L., Petrovan, S., Durrant, C., Linton, C., Baláž, V., Cunningham, A. A., & Lawson, B. (2017). Emerging fungal pathogen *Ophidiomyces ophidiicola* in wild European snakes. *Scientific Reports*, 7(1), 3844. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03352-1>
- Glorioso, B. M., Waddle, J. H., Green, D. E., & Lorch, J. M. (2016). First Documented Case of Snake Fungal Disease in a Free-Ranging Wild Snake in Louisiana. *Southeastern Naturalist*, 15(1), N4-N6. <https://doi.org/10.1656/058.015.0111>
- Graitson, E., & Naulleau, G. (2005). *Les abris artificiels : Un outil pour les inventaires herpétologiques et le suivi des populations de reptiles*. 115.
- Hewlett, J. (2021). Assessing the Influence of Stress and Behavior on Susceptibility to and Recovery from Snake Fungal Disease in the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Scholars Week*. <https://digitalcommons.murraystate.edu/scholarsweek/Spring2021/Watershed/11>
- Jan, P., Laure, A.-P.-G., Elvira, M., & Florian, A. (2020). *Environmental DNA applications for biomonitoring and bioassessment in aquatic ecosystems*. <https://doi.org/10.5167/UZH-187800>
- Jurgen den Harto, & Renate Reijn. (2014). *I3S-Pattern version 4.0.2*. [www.reijns.com/i3s](http://www.reijns.com/i3s)
- Ladner, J. T., Palmer, J. M., Ettinger, C. L., Stajich, J. E., Farrell, T. M., Glorioso, B. M., Lawson, B., Price, S. J., Stengle, A. G., Grear, D. A., & Lorch, J. M. (2022). *Population genetic analysis of Ophidiomyces ophidiicola, the causative agent of snake fungal disease, indicates recent introductions to the USA* (p. 2022.03.23.485546). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.03.23.485546>
- Legreneur, P. (2015). *Répartition et statut des Anolis de la Guadeloupe. Cas des îles de La Désirade, de Petite Terre et des Saintes en comparaison avec la Grande Terre et la Basse Terre*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26232.85765>

- Lorch, J. M., Knowles, S., Lankton, J. S., Michell, K., Edwards, J. L., Kapfer, J. M., Staffen, R. A., Wild, E. R., Schmidt, K. Z., Ballmann, A. E., Blodgett, D., Farrell, T. M., Glorioso, B. M., Last, L. A., Price, S. J., Schuler, K. L., Smith, C. E., Wellehan, J. F. X., & Blehert, D. S. (2016). Snake fungal disease : An emerging threat to wild snakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709), 20150457. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0457>
- Lorch, J. M., Lankton, J., Werner, K., Falendysz, E. A., McCurley, K., & Blehert, D. S. (2015). Experimental Infection of Snakes with *Ophidiomyces ophiodiicola* Causes Pathological Changes That Typify Snake Fungal Disease. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.01534-15>
- LPO BFC. (2022). Site web—LPO Bourgogne-Franche-Comté -. <https://bourgogne-franche-comte.lpo.fr/>
- LPO France. (2022). LPO.fr—LPO (Ligue pour la Protection des Oiseaux). <https://www.lpo.fr/>
- Marc-Antoine Marchand. (2012). Une méthode de suivi standardisée des communautés de reptiles *squamates*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1809.4960>
- McBride, M. P., Wojick, K. B., Georoff, T. A., Kimbro, J., Garner, M. M., Wang, X., Childress, A. L., & Wellehan, J. F. X. (2015). OPHIDIOMYCES OPHIODIICOLA DERMATITIS IN EIGHT FREE-RANGING TIMBER RATTLESNAKES (CROTALUS HORRIDUS) FROM MASSACHUSETTS. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(1), 86-94. <https://doi.org/10.1638/2012-0248R2.1>
- MEBFC. (2022). Site web/ Maison de l'environnement Bourgogne-Franche-Comté (MEBFC). <https://maison-environnement-bfc.fr/>
- Meier, G., Notomista, T., Marini, D., & Ferri, V. (2018). First case of Snake Fungal Disease affecting a free-ranging *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) in Ticino Canton, Switzerland. *Herpetology Notes*, 11, 885-891.
- Muratet, J. (2008). *Identifier les amphibiens de France métropolitaine : Guide de terrain*. Association Écodiv.
- Paysant, F. (2008a). *Clé de détermination des urodèles (tritons et salamandre) de Bretagne*.
- Paysant, F. (2008b). *Clé des anoues adultes*.
- Paysant, F. (2008c). *Clé des larves d'urodèles (tritons et salamandre) de Bretagne*.
- Paysant, F. (2008d). *Clé des têtards de Bretagne*.
- Pinston, H., Craney, E., Pepin, D., Montadert, M., & Duquet, M. (2000). *Amphibiens et reptiles de Franche-Comté : Atlas commenté de répartition*. Conseil régional de Franche-Comté ; Groupe naturaliste de Franche-Comté.
- QGIS.org. (2022). *QGIS Geographic Information System*. QGIS Association. <http://www.qgis.org>
- R Core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- RStudio Team. (2020). *RStudio : Integrated Development for R*. RStudio. <https://www.rstudio.com/>


- Rzadkowska, M., Allender, M. C., O'Dell, M., & Maddox, C. (2016). Evaluation of Common Disinfectants Effective against *Ophidiomyces ophiodiicola*, the Causative Agent of Snake Fungal Disease. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(3), 759-762. <https://doi.org/10.7589/2016-01-012>
- Sigler, L., Hambleton, S., & Paré, J. A. (2013). Molecular Characterization of Reptile Pathogens Currently Known as Members of the Chrysosporium Anamorph of Nannizziopsis vriesii Complex and Relationship with Some Human-Associated Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3338-3357. <https://doi.org/10.1128/JCM.01465-13>
- Speybroeck, J., BEUKEMA, W., & VAN DER VOORT, J. (2018). *Guide Delachaux des Amphibiens et Reptiles de France et d'Europe*. delachaux et Niestlé.
- Thompson, N. E., Lankau, E. W., & Rogall, G. M. (2018). *Snake Fungal Disease in North America : US Geological Survey Updates* (Fact Sheet N° 2017-3064; Fact Sheet). U.S. Geological Survey.
- Vacher, J.-P. (2016). *Cahier technique : Comment différencier la Grenouille des champs des autres grenouilles brunes ?*
- Vacher, J.-P., & Geniez, M. (Éds.). (2010). *Les reptiles de France, Belgique, Luxembourg et Suisse : Cahier d'identification. Cartes de distribution*. Biotope Éditions.
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., & RStudio. (2022). *ggplot2 : Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics* (3.3.6). <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & RStudio. (2022). *dplyr : A Grammar of Data Manipulation* (1.0.9). <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- Wickham, H., Girlich, M., & RStudio. (2022). *tidyr : Tidy Messy Data* (1.2.0). <https://CRAN.R-project.org/package=tidyr>

## Annexes

Annexe 1 : Protocole d'hygiène en cours de mise à jour (Source : LPO BFC)

### Protocole d'hygiène

#### Lutte contre la dissémination des pathogènes des amphibiens dans la nature



##### Contexte

Ce document fournit des mesures simples et efficaces pour limiter la dissémination des champignons et des virus pathogènes des amphibiens dans la nature.

Les maladies infectieuses émergentes telles que la Chytridiomycose et la Ranavirose menacent les populations d'amphibiens d'Europe. Par nos activités, nous pouvons être d'importants vecteurs de dissémination des agents infectieux à l'origine de ces maladies dans la nature. Comparativement aux « vecteurs naturels » (amphibiens, oiseaux d'eau, etc.) nous pouvons disperser les agents pathogènes sur de bien plus longues distances (commerce international d'animaux vivants) et en grandes quantités (déplacements de matériaux d'extraction à partir des masses d'eau).

Nous encourageons tous les opérateurs de terrain à appliquer rigoureusement le protocole d'hygiène. Nous pourrions ainsi réduire la dissémination des agents pathogènes et « gagner » du temps en alimentant la recherche pour trouver de nouvelles solutions conservatoires et permettre aux amphibiens de s'adapter.

##### Conseils

- Ne capturez les amphibiens et autres animaux/végétaux aquatiques qu'en cas de nécessité absolue.
- Toujours relâcher les amphibiens sur leur site\* de capture.
- En cas de manipulation d'amphibiens, utilisez des gants à usage unique non poudrés. Les gels désinfectants non parfumés, virucides, fongicides et bactéricides sont aussi efficaces.
- L'ensemble du matériel utilisé dans un site\* doit être désinfecté avant réutilisation sur un site différent.
- Chaussures, vêtements, outils de chantier (manuels et engins) en contact direct avec l'eau et la boue doivent être désinfectés rigoureusement.
- Garez votre véhicule sur des chemins carrossables ; évitez la boue.
- Les amphibiens potentiellement malades (morts ou vivants) représentent un haut risque écologique. Si besoin, ne les manipulez qu'avec des gants à usage unique et appliquez la procédure de vigilance et d'alerte. Leurs capture, transport, détention sont interdits par la loi.

\*Site = point d'eau stagnant ou cours d'eau qui n'est pas directement connecté à d'autres zones d'eau au sein d'une surface donnée. Dans un site on considère que les animaux sont déjà en contact étroit les uns avec les autres.

##### Procédure de vigilance et d'alerte

###### 1\_

**Prenez des photos et des notes** (nombre d'animaux, espèce, endroit précis, date et heure, etc.)

###### 2\_

Saisissez-les sur le **formulaire dédié** du site [alerte-amphibien.fr](http://alerte-amphibien.fr), sur **Faune France** <https://www.faune-france.org/>, et la **base de données de la SHF** avec les mots clés « **alerte amphibien** » dans le champ **remarque**.

###### 3\_

**Cherchez bien** dans les environs de votre découverte car si le pathogène est présent, il est très probable qu'il y ait plus d'un animal infecté. **Les talus et bords de chemin** sont généralement de bons endroits où chercher.

Source : <https://bsalinfoeurope.wixsite.com/eubsalmitigation2017/>

## Protocole d'hygiène

### Lutte contre la dissémination des pathogènes des amphibiens dans la nature

## Nettoyage et désinfection

1. Avec une brosse, enlevez l'ensemble des résidus de végétaux et de sol de vos chaussures et autre matériel de terrain.

2. Rincez à l'eau. L'eau d'une mare est suffisante. Assurez-vous que le matériel est aussi propre que possible.

3. Désinfectez toujours votre matériel comme suit : préparez votre solution désinfectante en petite dose (250 mL) dans un pulvérisateur dédié. Pulvérisez votre matériel à distance de toutes zones humides (mares, cours d'eau, etc.) et évitez au maximum de contaminer l'environnement. Idéalement, utilisez des bacs, a minima, désinfection sur chemin carrossable.

4. Privilégiez l'utilisation du Virkon S (dilution 1,5%). D'autres désinfectants plus impactants sont efficaces : eau de javel à 4 % de NaCl (dilution 1:5) ou éthanol à 70 % non dilué.

Toujours utiliser des solutions désinfectantes « fraîches » : les préparer sur place, en petit volume (250 mL) avant votre intervention (propriétés désinfectantes perdues au cours du temps).

Pour les vêtements : machine à >60°C, >30 minutes.

5. Laissez le matériel sécher au moins 10 minutes (respect du temps d'action des désinfectants).

6. Si la mise en œuvre du protocole d'hygiène n'est pas possible sur place enlevez l'ensemble des résidus de végétaux et de sol et rincez à l'eau votre matériel. Transportez votre matériel à domicile dans des sacs poubelles. Appliquez le protocole à votre domicile et jetez les sacs/gants usagés.

8. Lavez vos mains à l'aide d'un gel désinfectant.

**N.B. : temps de contact eau de javel/éthanol >3min. puis rinçage/Virkon >10min à 60 min**

## Approvisionnement et élimination des produits désinfectants

Pour obtenir du Virkon S (1,5%) en poudre et vous débarrasser du produit brut périmé contactez les coordinateurs herpétologiques régionaux.

Conserver le désinfectant dans un endroit sec, frais, à l'abri du soleil, dans un contenant hermétique (couvercle toujours clos).

Les restes de solution désinfectante doivent être versés dans les réseaux d'eaux usées ; ne jamais les verser dans le milieu.

Le produit périmé et son contenant doivent être éliminés comme produits spéciaux dans une déchetterie.



## Evitez tout contact direct

Les solutions désinfectantes décrites dans ce document peuvent être dangereuses pour les humains mais aussi les amphibiens, les poissons et autres organismes. Utilisez-les avec précaution.

## Check-list matériel d'hygiène

- ✓ Brosse
- ✓ Gants à usage unique non poudrés
- ✓ Pulvérisateur
- ✓ Désinfectant
- ✓ Gel désinfectant non parfumé à action virucide, fongicide, bactéricide
- ✓ Sacs poubelle
- ✓ Bouteille d'eau
- ✓ Bacs plastiques (désinfection/rangement)



Crédits photographiques : P. M. van Diepenbeek, J. Herder, R. van Leeningen, T. Stark, LPO FC

Protocole adapté par la LPO  
Franche Comté, 2018



AGIR pour la  
BIODIVERSITÉ  
FRANCHE COMTÉ

Financé par



AGIR pour la  
BIODIVERSITÉ



Protocole terrain SFD:

Ce protocole s'applique dans le cadre de la capture des serpents franc-comtois pour l'étude de la SFD (Snake Fungal Disease).

**Protocole:**

Dès la sortie du véhicule:

- Prévoir dans un sac ou contenant facilement accessible :
  - Un lot de gants à usage unique (gants classiques ou gants de vélage en fonction des cas).
  - Une boîte de microtubes numérotés contenant de l'eau.
  - Quelques packs froids.
  - Un lot d'écouvillons.
  - Un lot de microtubes vides.
  - Un marqueur.
  - Une réglette.
  - Un mètre ruban.
  - Une balance / un peson.
  - Un thermomètre.
  - Une lingette microfibre.
  - Un ciseau chirurgical.
  - Une pince chirurgicale.
  - Un bocal d'alcool à 70% permettant l'immersion des ciseaux et pinces.
  - Un lot de feuilles de terrain.
  - Un lot de feuilles « lésion ».
- S'équiper de gants à usage unique :
  - Gants à usage unique classiques si aucun risque de rencontres d'espèces venimeuses.
  - Gants en croute de cuir + gants de vélage à usage unique si possibilité de rencontrer des espèces venimeuses.

Lors de la capture d'un individu:

- **ÉCOUVILLONNAGE :**

*Pour tous les individus:*

- Examiner attentivement le serpent : tête, corps (faces latérales, ventrales et dorsales), cloaque et queue à la recherche de lésion ou quelconques anomalies cutanées.
- Attraper une boîte de microtubes.
- Attraper un microtube (le 1er de chaque boîte est en haut à gauche, puis prendre les tubes en ordre consécutif).
- Taper le microtube afin que l'eau tombe au fond.
- Sortir un écouvillon, ouvrir le microtube et plonger la tête de l'écouvillon dans le tube de façon à absorber l'eau.
- Refermer le tube.
- Écouvillonner la face ventrale du serpent, du cou jusqu'au cloaque, faire 5 allers-retours de façon appuyée, tout en faisant une rotation de l'écouvillon afin que toute la surface de l'écouvillon soit en contact avec la peau.
- Recommencer, avec le même écouvillon, avec la partie dorsale de l'animal (5 allers-retours), puis une fois de chaque côté de la tête et autour des yeux.
- Attraper le microtube précédemment cité.
- Placer la tête de l'écouvillon dans le microtube et la casser de manière à pouvoir refermer le microtube.

**ATTENTION À NE JAMAIS TOUCHER LA TÊTE DE L'ÉCOUVILLON**

- Noter les 4 derniers chiffres du microtube sur la feuille de terrain dans la colonne « skin swab ID ».
- Remplacer le microtube avec la tête de l'écouvillon dans un sac zip ou dans une boîte à tubes dédiée vers les packs froids.

*Pour les individus comportant des lésions (à faire en plus des étapes précédentes):*

**AVEC UN NOUVEAU MICROTUBE ET UN NOUVEL ÉCOUVILLON**

- Attraper un microtube (le 1er de chaque boîte est en haut à gauche, puis prendre les tubes en ordre consécutif).
- Taper le microtube afin que l'eau tombe au fond.
- Sortir un écouvillon, ouvrir le microtube et plonger la tête de l'écouvillon dans le tube de façon à absorber l'eau.
- Refermer le tube.

- Écouvillonner chaque lésion et les écailles autour (avec le même écouvillon) de façon assez forte afin de récupérer les spores.
- Attraper le microtube précédemment cité.
- Placer la tête de l'écouvillon dans le microtube et la casser de manière à pouvoir refermer le microtube.

#### ATTENTION À NE JAMAIS TOUCHER LA TÊTE DE L'ÉCOUVILLON

- Noter les 4 derniers chiffres du microtube sur la feuille de terrain dans la colonne « lesion swab ID ».
- Replacer le microtube avec la tête de l'écouvillon dans un sac zip ou dans une boîte à tubes dédiée vers les packs froids.
- Remplir la feuille « lésion » en ajoutant les 4 derniers chiffres du microtube.

#### Prélèvement de tissus : Si l'animal comporte des lésions

*Prendre la pince et les ciseaux et vérifier que ceux-ci sont bien désinfectés à l'alcool.*

*Prélever un morceau de la lésion (cf. vidéo).*

*Placer le prélèvement dans un tube vierge et noter le code « lesion swab » sur celui-ci.*

*Placer de la poudre cicatrisante sur la plaie.*

*Désinfecter la pince et les ciseaux avec l'alcool.*

#### - PHOTOGRAPHIES :

##### INCLURE LA PETITE RÈGLE EN PLASTIQUE SUR TOUTES LES PHOTOS COMME REPÈRE DE TAILLE

- Prendre une photo de la tête du serpent.
- Prendre une photo de vue d'ensemble du côté ventral et du côté dorsal (on doit pouvoir voir tout l'animal).

*Si des lésions sont présentes :*

##### INCLURE LA PETITE RÈGLE EN PLASTIQUE SUR TOUTES LES PHOTOS COMME REPÈRE DE TAILLE

- Prendre en photos chaque lésion.
- Prendre une première photo du serpent posé sur la feuille « lésion » en faisant attention à ce que le numéro de l'écouvillon soit bien en vue ainsi que la date.
  - 1<sup>er</sup> tiers ventral pour la couleuvre vipérine et couleuvre helvétique.
  - 1<sup>er</sup> tiers dorsal avec la tête pour les autres espèces.

#### - MESURES :

- Avec le mètre ruban, mesurer la longueur du museau au cloaque et la reporter dans la colonne « SVL » de la feuille de terrain (en cm).
- De la même manière, mesurer la longueur de la queue (du cloaque à l'extrémité de la queue) et la reporter dans la colonne « TL » de la feuille de terrain (en cm).
- Avec la balance / le peson, mesurer la masse de l'individu et la reporter dans la colonne « Mass » de la feuille de terrain (en grammes).
- Avec le thermomètre, mesurer la température de la surface où se trouvait le serpent au moment de la capture et la reporter dans la colonne « Surf temp » de la feuille de terrain.
- Mettre en pochon ou relâcher l'individu en fonction du site d'étude.

#### - SEXAGE :

- Sexer l'individu et reporter M, F ou IND dans la colonne « Sex » de la feuille de terrain.

*Après le relâché de l'individu ou sa mise en pochon :*

- Relever les coordonnées GPS de la place de capture du serpent et les noter dans les colonnes « Latitude » et « Longitude » de la feuille de terrain (WGS 84 ou Lambert RGF 93).
- Noter la date dans la colonne « Date » de la feuille de terrain.
- Noter l'abréviation d'espèce dans la colonne « Species » de la feuille de terrain :
  - NH : couleuvre helvétique
  - NM : couleuvre vipérine
  - HV : couleuvre verte et jaune
  - ZL : couleuvre d'esculape
  - CA : coronelle lisse
  - VA : vipère aspic
  - VB : vipère péliade
- Cocher la colonne « Photos » si celles-ci ont bien été réalisées.
- Noter dans la colonne « Notes » de la feuille de terrain le nom de la station prospectée.
- Noter le comportement de l'individu dans la colonne « Behav code » de la feuille de terrain :
  - UNC : sous couvert naturel
  - UAC : sous couvert artificiel

- BIO : en thermorégulation
- OTC : en déplacement
- LOR : vivant sur route
- DOR : mort sur route
- Dans la colonne « Commentaires », noter le numéro de plaque s'il y en a un.
- Désinfecter tout le matériel utilisé avec l'alcool à 70% (y compris les téléphones et appareils photo).
- Changer de gants à usage unique

Encodage sur Naturalist:

Ajouter dans le champ « Remarque » (le rouge représente les éléments à remplacer et le noir les éléments à conserver) :  
*abréviation espèce/SFD/numéro de « skin swab »*

Après le terrain:

- Stocker les micro-tubes, dans l'ordre numérique, dans les boîtes prévues à cet effet dans le congélateur.
- Remplir le document « SFD\_LPO\_France2022 » (<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1Rin70yulntFbg9TGraVcaG8-xy7hCHYaHz-ktMYKc-s/edit?usp=sharing>)
  - Reporter le contenu de la feuille de terrain et compléter les colonnes « Observateur(s) », « Localité », « Code INSEE », « Précision » (si possible), « Nom latin », « Nom vernaculaire », « Adulte », « Juvenile ».
  - Remplir la colonne commentaire de la façon suivante (le rouge représente les éléments à remplacer et le noir les éléments à conserver) :

*Mission/Commune (abréviation si nom long)/Année2022/Protocole (à vue et/ou plaques)/Prospecteur(s) : nom(s) et prénom(s)/N° de passage sur le transect : X/Heure début : XhY/Heure fin : XhY/T°C début : X/T°C fin : X/Météo : description rapide/Vent (kmh) : X*

- Nommer les photos de la façon suivante (le rouge représente les éléments à remplacer et le noir les éléments à conserver) :

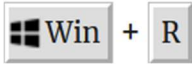
*Abréviation espèce\_numéro de « skin swab »\_lieu\_année.jpg*

- Ranger les photos dans un dossier du type : lieu\_jj/mm/aaa

## Fiche méthode I3S Pattern

### Installation du logiciel :

- **Désactivation du contrôle de compte d'utilisateur :**

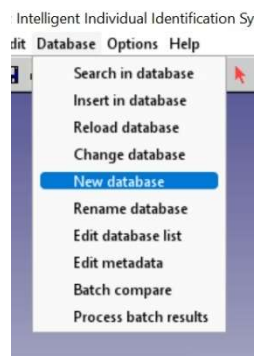
-  et taper « regedit » puis cliquer sur « OK ».
- Suivre le chemin suivant :

HKEY\_LOCAL\_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows\CurrentVersion\Policies\System

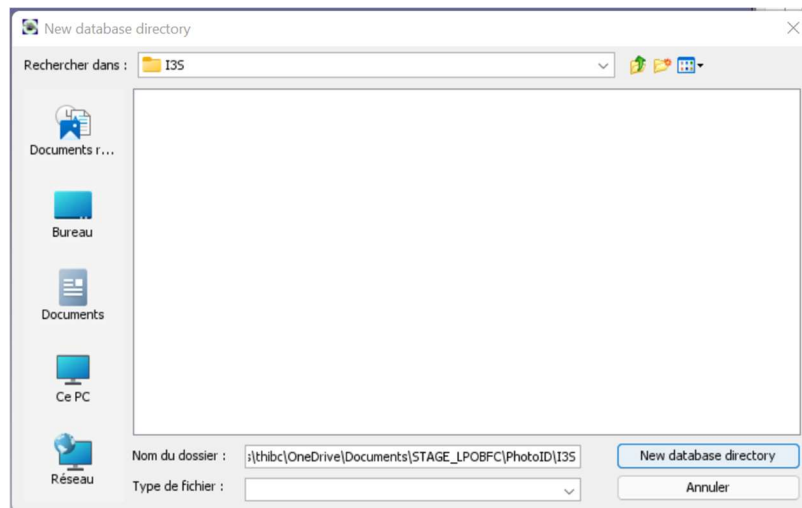
- Cliquer sur le fichier « EnableLUA ».
- Changer la valeur de 1 à 0 et cliquer sur « OK ».
- **Installation de JAVA :**
  - Ouvrir le fichier « java-runtime-environment\_8u321\_fr\_121472\_32.exe » et installer JAVA.  
→ Toutes versions **32 bits** de JAVA sont compatibles.
- **Installation de I3S Pattern :**
  - Ouvrir le fichier « I3SPv4.02Setup.exe » et suivre la procédure d'installation du logiciel.
  - Le logiciel demande à redémarrer l'ordinateur.

### I3S Pattern :

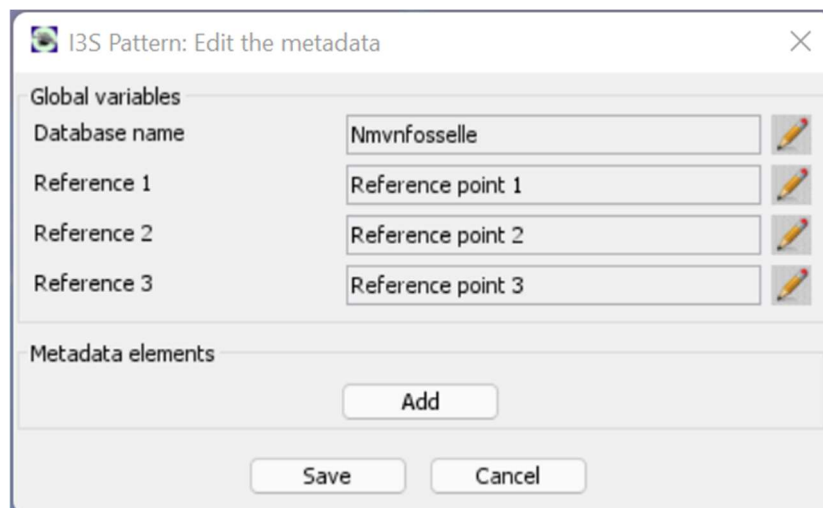
- **Créer une nouvelle DATABASE :**
  - Cliquer sur « Database » puis sur « New database ».



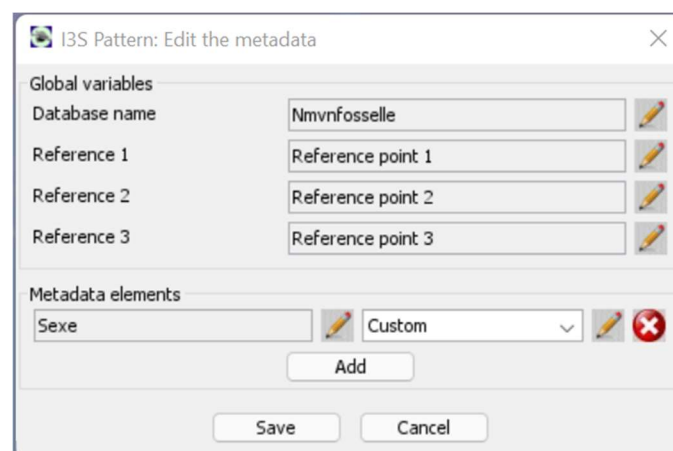
- Sélectionner l'emplacement de stockage de la Database et cliquer sur « New database directory » :



- Personnaliser la database en cliquant sur le crayon pour éditer chaque champ :
- Ajout de metadatas :



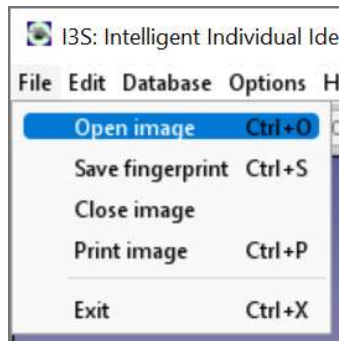
- Cliquer sur « Add » et éditer les champs :



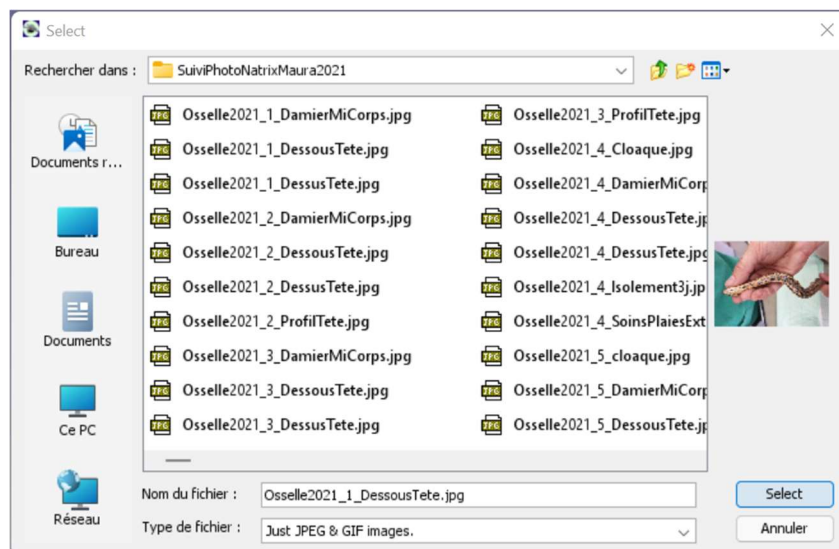
- Cliquer sur « Save ».

- **Ajouter des photos dans la database :**

- Clicker sur « File » puis « Open image » :

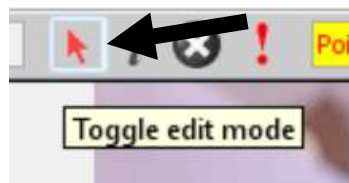


- Sélectionner l'image à ouvrir :

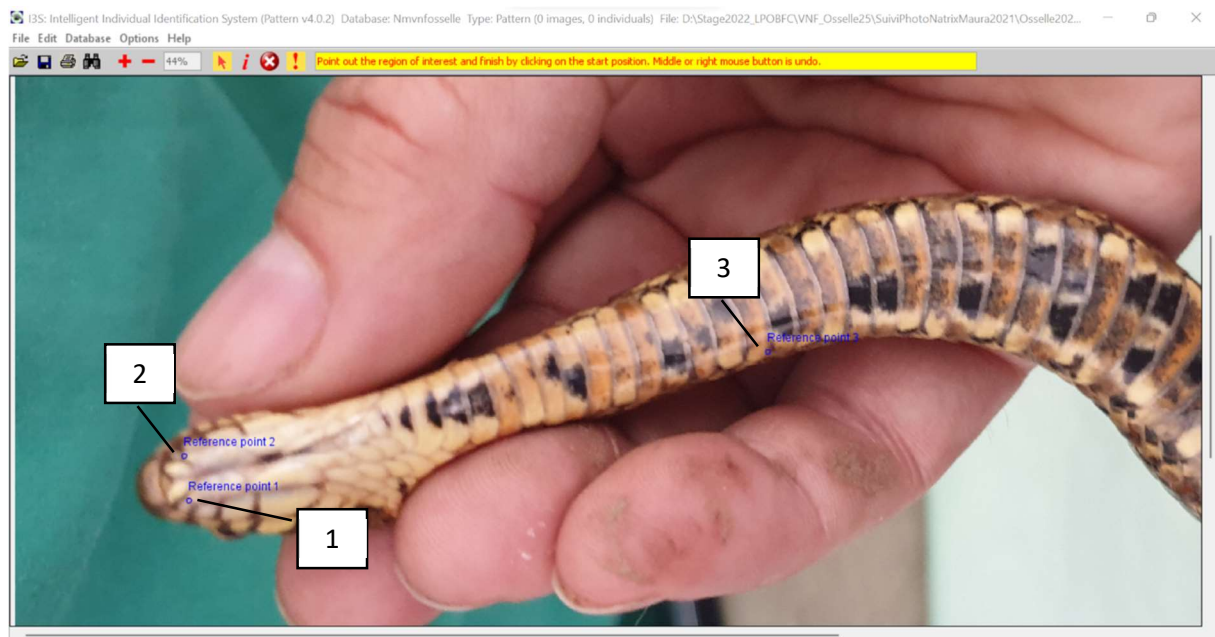


- Activer le mode édition :

ation System (Pattern v4.0.2)

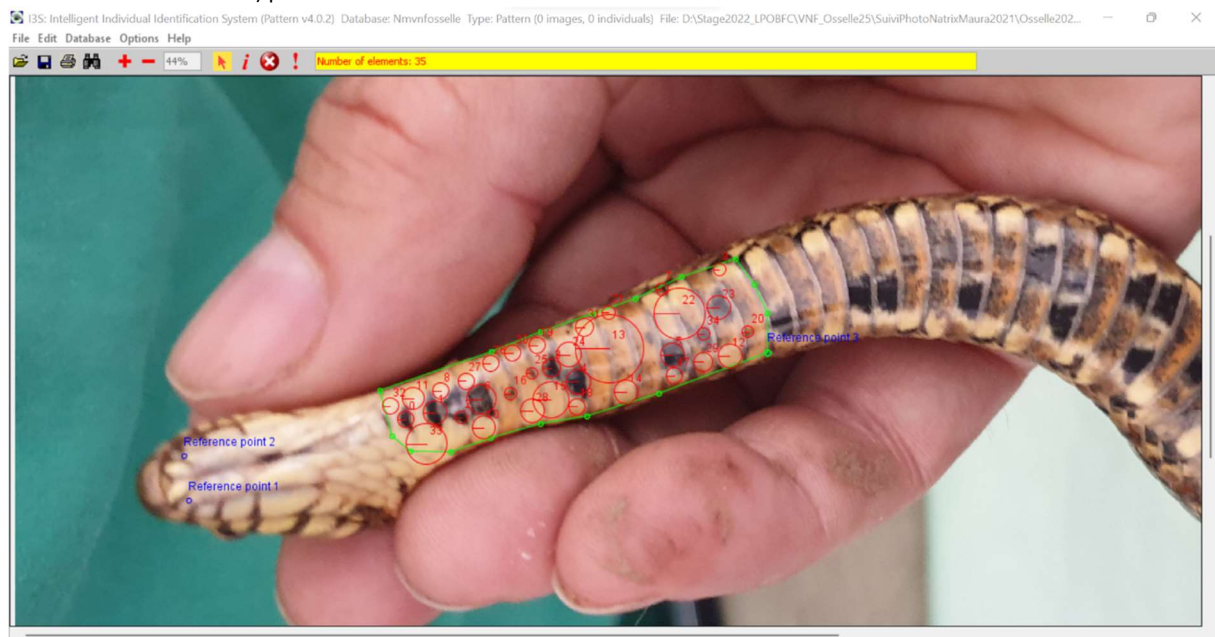


- Sélectionner les 3 points de références :

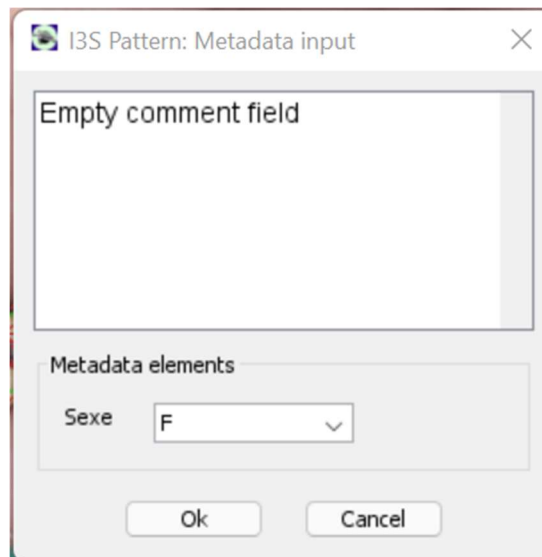


Dans le cas de *Natrix maura*, on pose comme points de référence le sommet des deux écailles mentonnières et le bas de la 15<sup>e</sup> plaque ventrale.

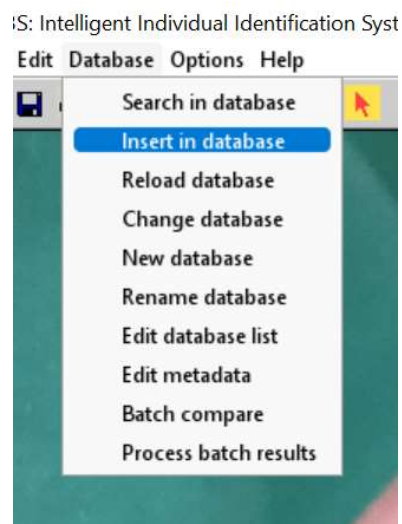
- Sélection du périmètre : par clics successifs, dessiner le contour des plaques ventrales (de la première à la 15<sup>e</sup>) puis faire **CTRL+S**.



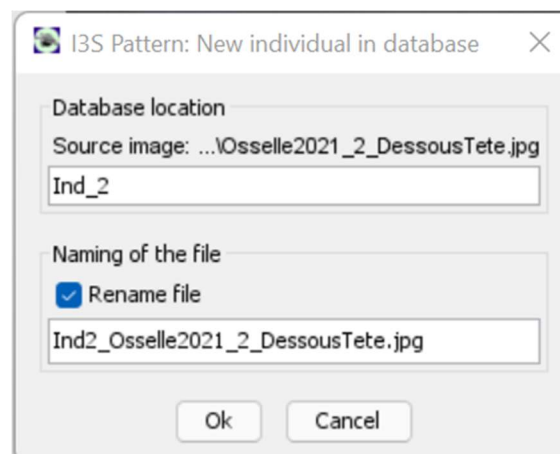
- Ajouter le sexe de l'individu en cliquant sur « i » et sélectionner le sexe (possibilité d'ajouter des commentaires) :



- Clicker sur « Database » puis « Insert in database » :

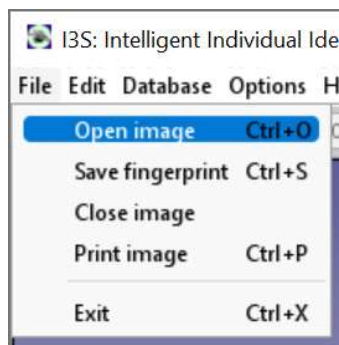


- Renommer le fichier du type « Ind2\_nomfichier » et cliquer sur « ok »:

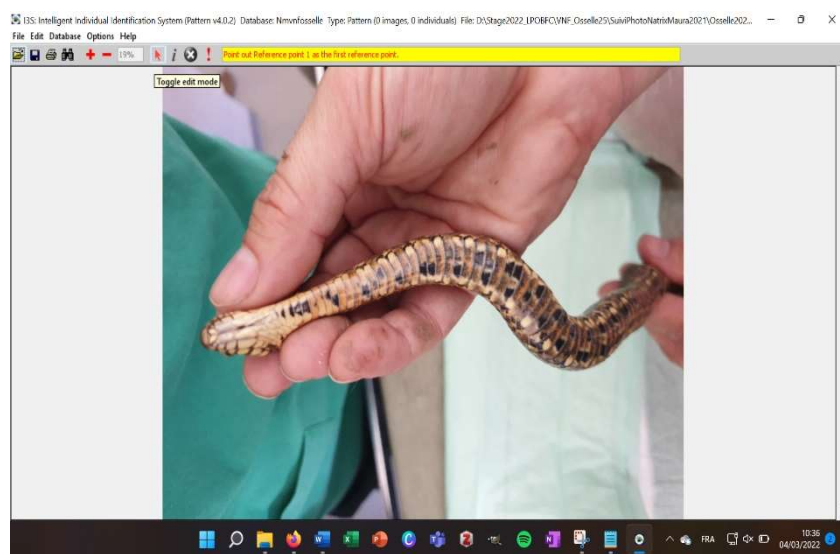


- Rechercher une correspondance avec un individu dans la base :

- Clicker sur « **File** » puis « **Open image** » :

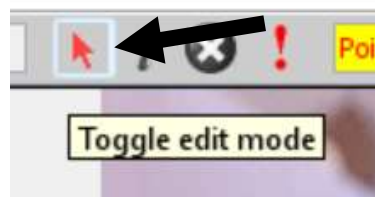


- Sélectionner l'image à ouvrir :

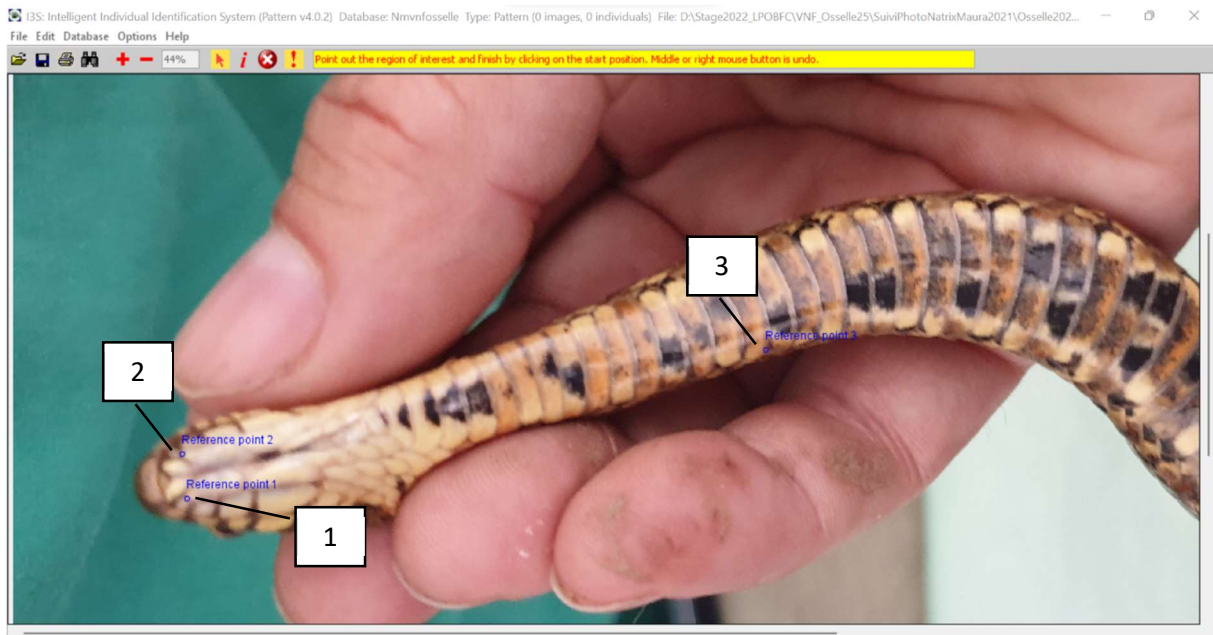


- Activer le mode édition :

ation System (Pattern v4.0.2)

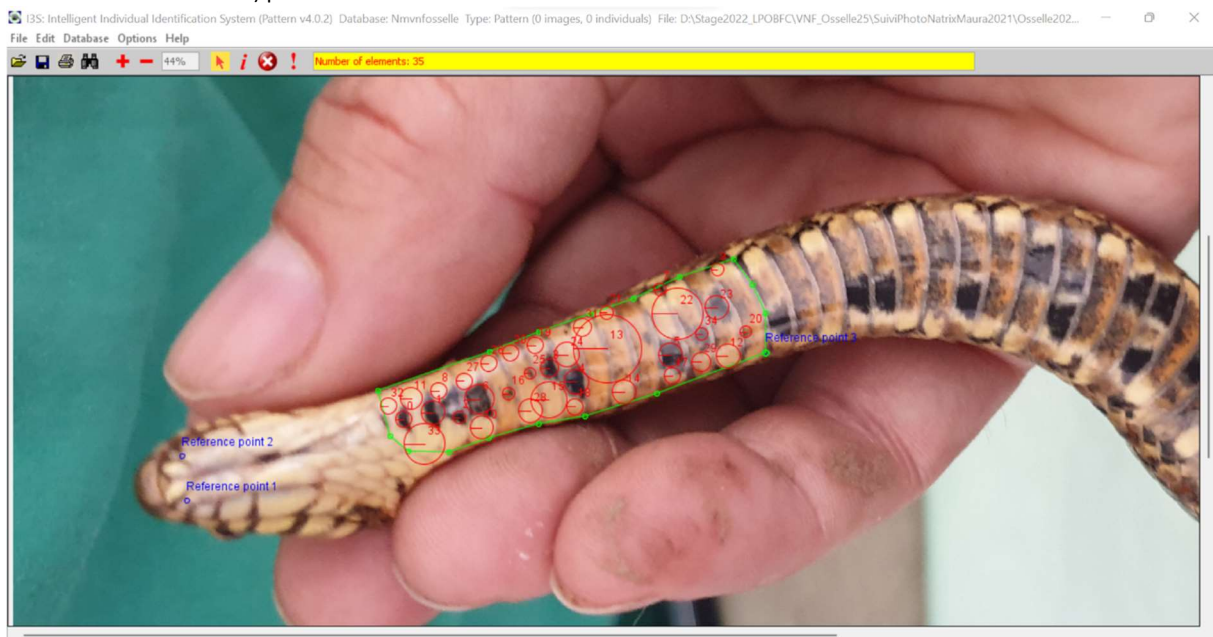


- Sélectionner les 3 points de références :

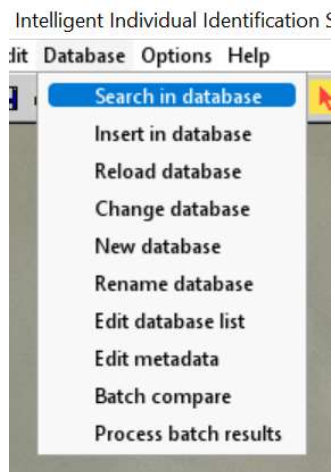


Dans le cas de *Natrix maura*, on pose comme points de référence le sommet des deux écailles mentonnières et le bas de la 15<sup>e</sup> plaque ventrale.

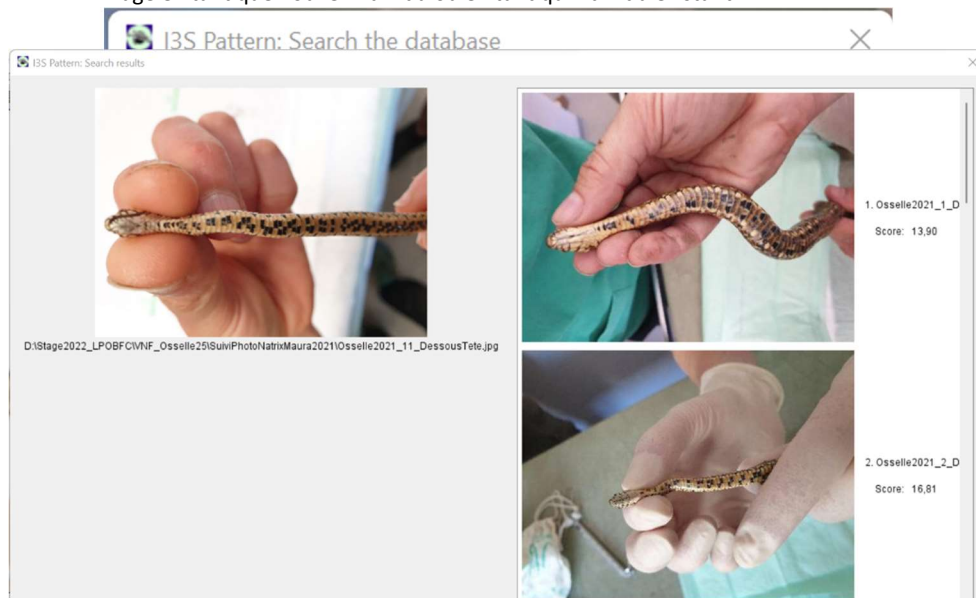
- Sélection du périmètre : par clics successifs, dessiner le contour des plaques ventrales (de la première à la 15<sup>e</sup>) puis faire **CTRL+S**.

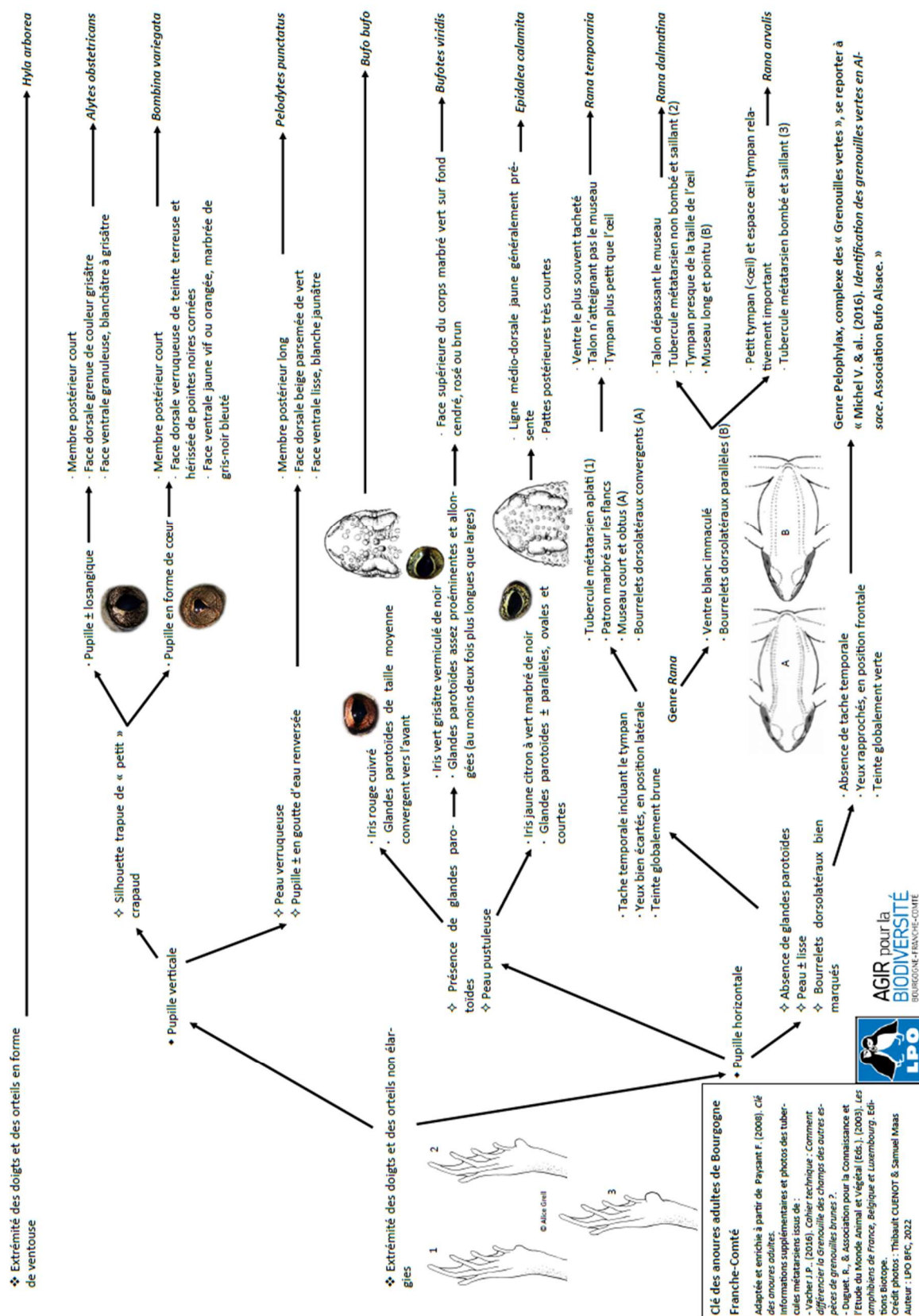


- Cliquer sur « Database » puis sur « Search in database » :



- Décider si la recherche doit prendre en compte (ou non) le sexe de l'individu sachant qu'une recherche comprenant le sexe risque de négliger les individus précédemment non sexés :
- Plus le score est proche de 0 plus les individus sont similaires. Comparer les meilleurs résultats et ajouter l'image en tant que nouvel individu ou en tant qu'individu existant.





❖ Yeux en position latérale



*Hyla arborea*



© Harald Cigler

*Alytes obstetricans*



© Harald Cigler

*Bombina variegata*



© Harald Cigler

*Bufo bufo*



© Harald Cigler

*Epidalea calamita*



© Harald Cigler

*Bufo viridis*



© Harald Cigler

*Pelodytes punctatus*



© Harald Cigler

*Rana dalmatina*



© Harald Cigler

*Rana temporaria*



© Harald Cigler

Genre des *Pelophylax*



© Harald Cigler

- Têtards de grande taille avec un museau proéminent
- Face ventrale bleue / translucide
- Spiracle plus proche de la bouche que du cloaque
- Crête caudale supérieure basse naissant en arrière du tronc
- Nombreuses taches sombres sur le corps et la queue
- Longueur de la queue > 1.5x la longueur du corps et extrémité obtuse

- Têtards de grande taille avec un museau proéminent
- Crête caudale supérieure atteignant au moins le tiers postérieur du tronc
- Queue ayant un aspect de résille (lignes entrecroisées) noire (contre éclairage et loupe nécessaire)
- Queue courte dont la longueur est < 1.5x la longueur du corps

- Profil symétrique en forme de selle
- Crête caudale opaque et sombre
- Queue au profil symétrique
- Muscle caudal s'amincissant régulièrement de la base à l'extrémité

- Généralement, présence d'une tache pâle sous la bouche
- Crête caudale devenant transparente aux stades avancés
- Queue au profil asymétrique
- Muscle caudal d'épaisseur constante jusqu'à mi-longueur

- Têtard plus clair que les deux espèces précédentes
- Crête caudale presque transparente
- Crête caudale supérieure souvent lignée

- Nageoire assez effilée et se terminant en arrondi
- Face supérieure du corps gris foncé avec des reflets ardoisés
- Fin maillage ligné tel des lignes de couture sur la face dorsale (loupe obligatoire)

- Peau avec des grandes taches claires diffuses
- Ventre blanchâtre avec de nombreuses taches dorées
- Crête caudale supérieure élevée atteignant le 1/3 médian du tronc
- Extrémité de la queue pointue

- Peau parsemée de nombreuses petites taches noires
- Ventre constitué de taches dorées et argentées
- Insertion de la crête caudale supérieure basse et en forme de selle
- Extrémité de la queue arrondie
- Ventre blanc-rose brillant quasiment sans tache
- Extrémité de la queue très effilée
- Ligne claire plus ou moins marquée allant de l'œil vers la bouche

❖ Spiracle ventral médian et cloaque médian

❖ Teinte claire, gris-brun



❖ Spiracle à gauche et cloaque médian

❖ Teinte presque noire

❖ Forte échancrure entre le tronc et la queue



❖ Spiracle gauche et cloaque médian



❖ Spiracle gauche et cloaque dextre



• Yeux rapprochés



❖ Yeux en position dorsale



• Yeux écartés

• Continuité entre le tronc et la queue

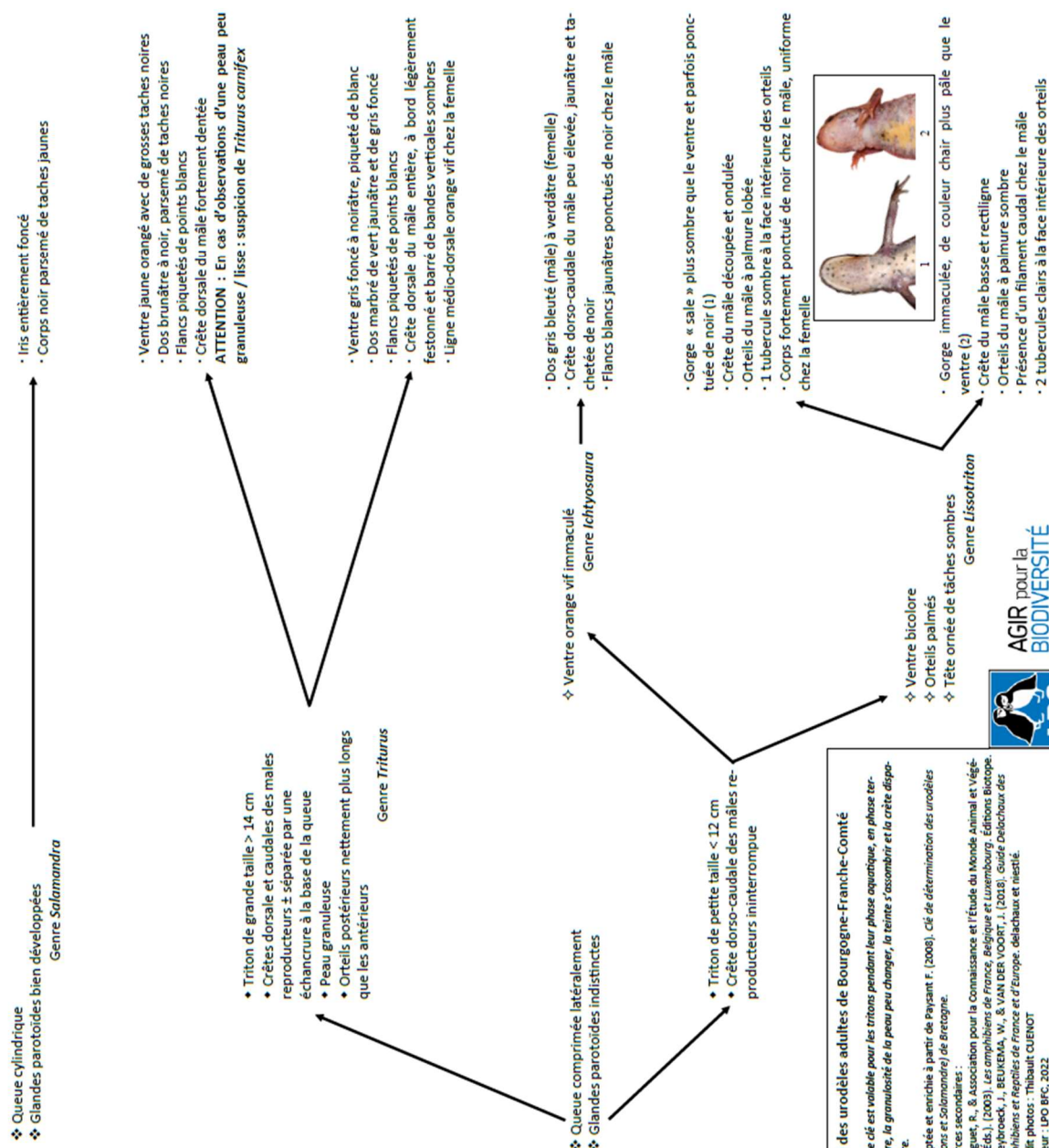
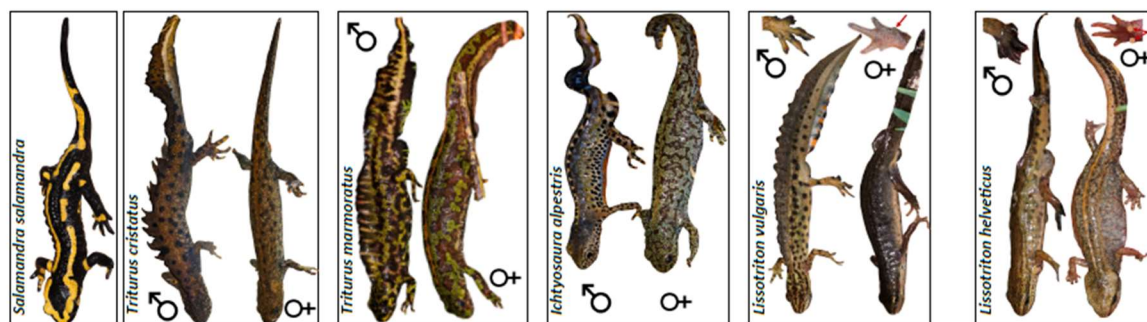


Clé des têtards de Bourgogne Franche-Comté

Conté  
Adaptée et enrichie à partir de Paysant F. (2008). Clé des têtards de Bourgogne. Informations supplémentaires et schémas (hors Pelodytes punctatus et schémas généraux) issus de :  
- Buisson et al. (2007). Larves d'amphibiens ; Détermination. FAUNA HELVETICA 118.  
- Duguet, R., & Association pour la Connaissance et l'Étude du Monde Animal et Végétal (Eds.). (2003). Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. Éditions Biotrop.  
Auteur : LPO BFC, 2022



AGIR pour la BIODIVERSITÉ  
BOURGOGNE-FRANCHE-COMTÉ



## Clé des larves d'urodèles de Bourgogne-Franche-Comté

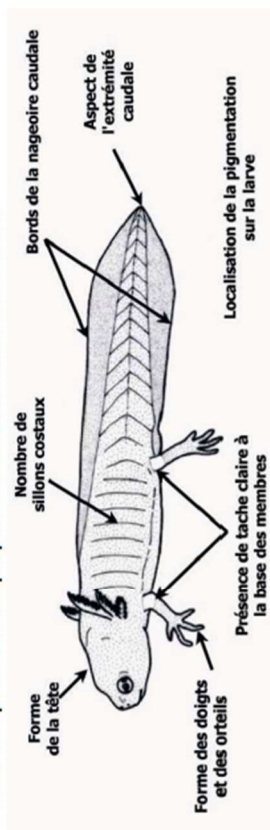
Les différentes espèces de larves sont représentées à un stade de développement avancé (proche de la métamorphose)

Adaptée et enrichie à partir de : Paysant F. (2008). Clé des larves d'urodèles (tritons et Salamandres) de Bretagne.  
Informations supplémentaires et schémas (hors morphologie et *Triturus marmoratus*) issus de :  
Bunliet et al. (2007). Larves d'amphibiens ; Détermination. FAUNA HELVETICA 18.

Auteur : LPO BFC, 2022



❖ Éléments à prendre en compte pour l'identification des larves d'urodèles



❖ Tache claire à la base des membres

- ❖ Crête caudale supérieure remontant tout au plus jusqu'au tiers postérieur du tronc
- ❖ Branchies plumbeuses courtes
- ❖ Tête massive et large, forme quadrangulaire
- ❖ Coloration brune, tachetée de sombre

*Salamandria salamandra*



*Lissotriton* sp.

- ❖ Nageoire caudale en pointe allongée
- ❖ Crête caudale aux bords supérieur et inférieur non parallèles
- ❖ Extrémité caudale en pointe allongée
- ❖ Larve de teinte claire, crème-jaunâtre



*Ichtyosaura alpestris*

- ❖ Nageoire caudale à bords ± parallèles
- ❖ Queue portant fréquemment une brève pointe terminale
- ❖ Pigmentation sombre se densifiant vers l'extrémité de la queue



*Triturus cristatus*

- ❖ Taches sombres sur la nageoire et sur le corps
- ❖ Larve de teinte sombre sans nuances vertes
- ❖ 15-16 sillons costaux entre les membres



*Triturus marmoratus*

- ❖ Taches sombres uniquement localisées sur les bords de la nageoire caudale
- ❖ Larve de teinte dorée verdâtre
- ❖ 12-13 sillons costaux entre les membres



❖ Absence de tache claire à la base des membres

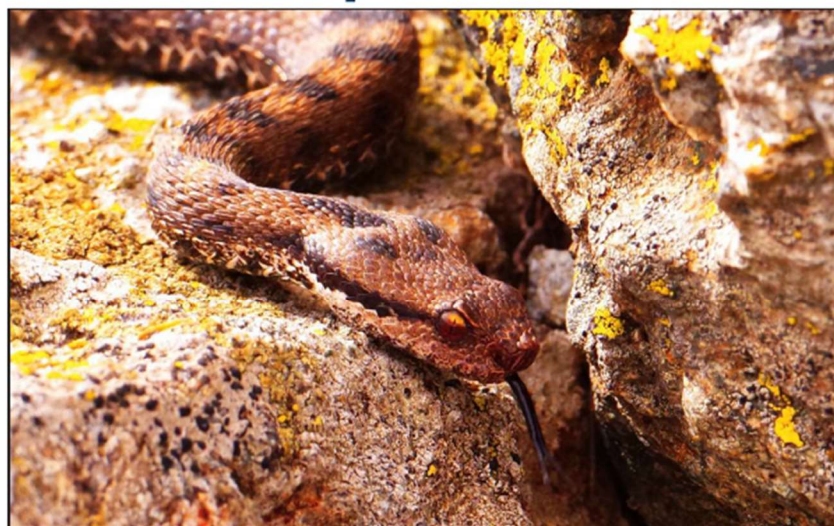
❖ Crête caudale remontant au minimum jusqu'au milieu du tronc

- Larve inférieure à 50mm aux stades avancés
- Doigts et orteils assez courts

- Larve supérieure à 50mm aux stades avancés
- Doigts et orteils très filiformes
- Queue longue et effilée avec filament caudal

JURA

## Vipères : faut-il en avoir peur dans notre quotidien ?



Les serpents sont des espèces protégées, il est interdit de les tuer ou de les manipuler. Illustration Cyril SERRALTA

Elles ont mauvaise presse depuis la nuit des temps. Pourtant, les vipères font partie des espèces protégées comme tous les serpents, depuis l'arrêté ministériel du 8 janvier 2021. Il est interdit de les tuer ou de les manipuler, de les transporter, de les prélever ainsi que d'altérer leur habitat. Des spécialistes décryptent pour nous les situations les plus rencontrées.

### ■ Que faire si j'en croise en randonnée ?

Qui n'a jamais eu peur, lors d'une randonnée, de confondre un morceau de bois et une vipère ? Dans les faits, très peu de chance que cela arrive. « Ça peut arriver de passer à proximité. Elle sera en train de dormir au soleil et va juste fuir en sifflant. Il faut comparer cela à quelqu'un que l'on réveille de bon matin et qui serait rorchor », dramatise Thibault Cuenot, stagiaire herpétologue à la Ligue de protection des oiseaux de Bourgogne-Franche-Comté (LPO BFC).

« Bien que cela soit peu probable, si on leur marche dessus sans faire exprès, elles chercheront à fuir. Il n'y a que si elle est vraiment acculée qu'il y a un risque qu'elle se retourne pour mordre. Dans tous les cas, cela ne traverse jamais une chaussure montante », détaille-t-il. D'autant plus que les vibrations d'une randonnée font fuir les serpents.

« Ce sont des animaux qui ne recherchent pas la confrontation, qui fuient. Il faut vraiment l'embêter, la bloquer, la manipuler ou la stresser pour qu'elle morde. Mais elle n'attaquera jamais d'elle-même », précise-t-il.

### ■ Que faire si j'en ai dans mon jardin ?

« Si c'est un espace du jardin peu pratiqué, peu exploité, le mieux, c'est d'aller les observer si on en a envie mais sans les toucher, sans les bloquer. La vipère ne va pas sortir tous les jours. Elle aime les lisières de haie, les endroits rocheux, les tas de bois dans le jardin... Si la vipère est gênée, il est possible de lui aménager un habitat, sous les conseils d'un spécialiste de la LPO », explique Thibault Cuenot.

Et de poursuivre : « Si les gens n'en veulent vraiment pas, c'est compliqué de les faire fuir, il faut donc retirer les habitats favorables (idéalement les mois de septembre et octobre sont à privilégier) en se munissant de gants. Les tas de branches, les pierres, avoir un gazon bien tondue – mais faire attention à ne pas les tuer en passant la tondeuse. Si on

veut les tolérer à proximité mais pas en bordure de maison, avoir des poules clôturées sur les quelques premiers mètres de la maison peut aider. Mais pas en liberté, car les volatiles tueraient toute la petite faune du jardin (papillons, lézards, grenouilles...).

« En cas de vipère ayant élu domicile en bordure de la maison, il est possible de faire appel à SOS Serpents, où des spécialistes prodigueront des conseils. Si une vipère se trouve dans votre maison ou garage, surtout ne pas la tuer, mais préférer appeler les pompiers ou la LPO, habilités pour les déplacer », préconise le spécialiste.

### ■ Que faire si je suis mordu (ou mon animal) ?

« Les trois quarts des morsures sont "sèches", sans venin. La vipère met dix jours pour refaire son venin et il lui sert à

se nourrir, non pas à se défendre », affirme Thibault Cuenot.

En cas de morsure, « ne pas faire de garrot, ne pas utiliser d'aspi-venin, ne pas aspirer avec la bouche, juste désinfecter et éviter tout accélérateur cardiaque tel que le café, les boissons énergisantes ou encore l'aspirine. Consulter un médecin ensuite. Vous avez plusieurs heures pour agir ».

Toujours selon Thibault Cuenot, « si la douleur lors de la morsure est extrêmement vive, contacter le 15 reste le plus prudent, car il pourrait y avoir du verin (les recommandations ci-dessus sont néanmoins à appliquer). Chez l'homme, les morsures fatales restent très rares : 50 à 100 emvenimations graves par an en France et trois décès par décennie » (source : Anses).

### « Le dernier animal décédé que j'ai eu, c'était il y a une quinzaine d'années »

Si votre animal est mordu, « l'amener dans les deux heures chez un vétérinaire. Laisser le chien ou le chat au calme, ne pas faire de garrot, ne pas faire de saignée et l'aspi-venin ne fonctionne pas. Il faut faire des perfusions et injections dans un délai raisonnable chez votre vétérinaire. On en voit certains plus de six heures après morsure et on arrive quand même à les sauver », précise le Dr Frédéric Violot, spécialiste des NAC (Nouveaux animaux de compagnie). Mais il tient à rassurer : « Le dernier animal décédé que j'ai eu, c'était il y a une quinzaine d'années, un tout petit chien. »

Sabrine ZAHARAN

## Des espèces menacées

Sept espèces de serpents sont répertoriées en Franche-Comté : cinq couleuvres et deux vipères. Toutes sont présentes dans le Jura et toutes sont protégées. La vipère aspic et la vipère péliade sont présentes dans le Jura. « La vipère péliade est plus menacée que sa cousine. Son habitat est particulièrement touché dû à l'activité humaine et au réchauffement climatique. En plus de ça, elles ont toutes les deux une très mauvaise image auprès du grand public, ce qui engendre de nombreuses destructions volontaires », précise Thibault Cuenot.

Les cinq couleuvres sont la couleuvre helvétique, la couleuvre d'Esculape, la couleuvre verte et jaune, la coronelle lisse et la couleuvre vipérine. Si vous n'arrivez pas à distinguer couleuvre ou vipère, le mieux est « de la prendre en photo et de poser la question à une personne qui s'y connaît. De nombreux groupes spécialisés existent sur les réseaux sociaux. Mais surtout, ne pas la tuer, c'est totalement interdit », complète Thibault Cuenot.



POLYTECH<sup>®</sup>  
TOURS

35 ALLÉE FERDINAND DE LESSEPS  
37200 TOURS

Thibault Cuenot

2021-2022

## *Ophidiomyces ophiodiicola* : un champignon pathogène émergent touchant les serpents

**Résumé** : Récemment découvert en Franche-Comté, un champignon pathogène nommé *Ophidiomyces ophiodiicola* affecte les serpents autochtones de notre territoire. Durant ce stage de fin d'étude d'une durée de 6 mois, l'objectif a été de participer aux recherches de Gaëlle Blanvillain, doctorante de l'Université de Virginia Tech, et d'écouvillonner un maximum de serpents partout sur le territoire franc-comtois, afin de tester leur positivité à l'agent infectieux et déterminer sa répartition. Cet échantillonnage a été réalisé lors des diverses prestations de la LPO BFC, permettant le contact de 130 serpents. Après les analyses par qPCR réalisées par Gaëlle, seulement deux sites ont une présence avérée du champignon pour un total de 7 animaux positifs. Ce stage a aussi été un moyen de contribuer à l'amélioration de la connaissance herpétologique régionale, et à la sensibilisation du grand public face aux enjeux de l'herpétofaune.

**Mots Clés** : *Herpétologie ; Reptiles ; Amphibiens ; Conservation ; Pathogène ; Ophidiomyces ophiodiicola ; Ophidiomycose ; Sensibilisation*

Ligue pour la Protection des Oiseaux de Bourgogne – Franche-Comté :  
7 rue Voirin, 25000 Besançon

**Tuteur entreprise** :  
Alix Michon  
Chargée de mission herpétologue

**Tuteur académique** :  
Francis Isselin

