

Bulletin de la Société Herpétologique de France

3^{ème} trimestre 2002

N°103



ISBN 0754-9962

Bull. Soc. Herp. Fr. (2002) 103

**BULLETIN DE LA SOCIETE HERPETOLOGIQUE
DE FRANCE**

3^{ème} trimestre 2002

N°103

SOMMAIRE

- **Intérêt des reptiles dans l'étude du déterminisme du sexe.**
Claude PIEAU & Mireille DORIZZI..... 5-20

- **Amphibiens et Reptiles non aviens: un matériel de choix en squelettochronologie.**
Jacques CASTANET..... 21-40

- **Présentation des actions de protection de la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) en Rhône-Alpes.**
Antoine CADI..... 41-52

- **Quelques observations sur la biologie des populations du Pélobate brun (*Pelobates fuscus*, Anoure).**
Christophe EGGERT & Robert GUYETANT..... 53-58

- **Dix ans de suivi des populations indigènes et introduites de grenouilles « vertes » (*Rana (Pelophylax) ssp.*, Anura, Ranidae) dans le bassin de la Lasne (Brabant wallon, Belgique).**
Christiane PERCSY & Nicolas PERCSY..... 59-72

- **Résumés de Diplômes et Thèses..... 74-77**

**BULLETIN DE LA SOCIETE HERPETOLOGIQUE
DE FRANCE**

3^{ème} trimestre 2002

N°103

CONTENTS

- **Interest of reptiles for studies on sex determination.**
Claude PIEAU & Mireille DORIZZI..... 5-20

- **Amphibians and non avian reptiles : a special material in skeletochronology.**
Jacques CASTANET..... 21-40

- **Presentation of the conservation plan of the European Pond Turtle (*Emys orbicularis*) in Rhône-Alpes, France.**
Antoine CADL..... 41-52

- **Some observations on population biology of the Spadefoot toad (*Pelobates fuscus*, Anoura).**
Christophe EGGERT & Robert GUYETANT..... 53-58

- **A 10-years study of native and introduced water frogs (*Pelophylax* ssp, Anura, Ranidae) in the “Lasne”river basin (Brabant wallon, Belgium).**
Christiane PERCSY & Nicolas PERCSY..... 59-72

- **Summaries of Diploma and PhD..... 74-77**

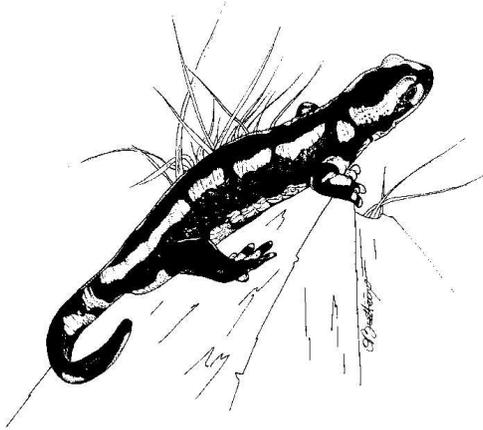


SOCIETE HERPETOLOGIQUE DE FRANCE



AVES

**Premier Colloque Franco-Belge
d'Herpétologie**



Virton (Lorraine belge), 6 – 8 juillet 2001

Organisé par Aves et la Société Herpétologique de France, avec le soutien du Fonds National de la Recherche Scientifique, de la Région Wallonne, de la Ville de Virton et l'aimable collaboration de la Province du Luxembourg. Dessins Education-Environnement.

Intérêt des reptiles dans l'étude du déterminisme du sexe

par

Claude PIEAU et Mireille DORIZZI

UMR 7592 CNRS et Universités Paris 6 et 7
Laboratoire de Biochimie du développement, Institut Jacques Monod,
2 place Jussieu, 75251 Paris cedex 05 (France)
pieau@ijm.jussieu.fr

Résumé - A la fin du XIXe siècle et au début du XXe siècle, la description du développement de l'appareil génital de plusieurs espèces de reptiles montre de remarquables similitudes avec les oiseaux et les mammifères. A partir de 1937, le traitement d'embryons de reptiles avec des stéroïdes sexuels de synthèse, aboutit à des résultats comparables à ceux qui sont obtenus chez les poissons, les amphibiens et les oiseaux, mais différents de ceux qui sont obtenus chez les mammifères, alimentant la controverse sur l'implication de ces hormones dans la différenciation sexuelle des gonades. Dans les années 60, la culture d'œufs de deux espèces vivipares (*Anguis fragilis*, *Lacerta vivipara*) permet diverses interventions sur l'embryon comme l'irradiation aux rayons X de la région hypophysaire ou la décapitation. Mais c'est surtout à partir de la fin des années 70, à la suite de la découverte de TSD (Temperature-dependent Sex Determination) que les recherches sur le déterminisme du sexe des reptiles vont se développer. Ce phénomène, démontré chez de nombreuses espèces de tortues et de crocodiles et quelques espèces de lézards, a été étudié dans ses aspects physiologiques, moléculaires, écologiques et évolutifs. Les recherches actuelles portent plus particulièrement sur les gènes impliqués dans la différenciation des gonades.

Mots-clés : Reptiles. Déterminisme du Sexe. Stéroïdes. Température. GSD. TSD.

Summary - Interest of reptiles for studies on sex determination. The development of the genital system was described in several reptilian species at the end of the 19th and the beginning of the 20th centuries. Remarkable similarities with birds and mammals were shown. As of 1937, reptilian embryos were treated with synthetic sex steroids. Results of these treatments were comparable to those obtained in fish, amphibians and birds, but different to those obtained in mammals, thus giving rise to much controversy on the implication of these hormones in gonadal sex differentiation. In the 60s, eggs of two viviparous species (*Anguis fragilis*, *Lacerta vivipara*) were cultured in vitro, thus allowing various experiments on the embryo such as X irradiation of the pituitary region or decapitation. As of the end of the 70s researches on sex determination were boosted by

the discovery of Temperature-dependent Sex Determination (TSD). Since then, TSD has been shown to occur in many species of turtles and crocodilians and some species of lizards. Physiological, molecular, ecological and evolutionary aspects of this phenomenon have been studied. To-day researches are mainly focused on homologues of mammalian genes that are involved in gonadal differentiation.

Key-words: Reptiles. Sex Determination. Steroids. Temperature. GSD. TSD.

I. INTRODUCTION

Malgré leur intérêt évolutif, les reptiles ont été longtemps considérés comme les « parents pauvres » de l'embryologie des vertébrés. Toutefois de remarquables descriptions du développement de l'appareil urogénital de plusieurs espèces, illustrées par des dessins précis de coupes dans les organes composant cet appareil, avaient été publiées, en majorité en allemand, quelques-unes en anglais, dans le dernier quart du XIX^{ème} siècle. Ces descriptions concernent les gonades, les reins embryonnaires, les conduits urogénitaux (canaux de Wolff, canaux de Müller, uretères), le cloaque, les organes copulateurs. Elles sont souvent incomplètes, les auteurs n'ayant pas à leur disposition des séries complètes d'embryons, mais en les recoupant elles ont constitué une base solide pour les études plus récentes. Il faut d'ailleurs noter que de nombreuses observations, en particulier sur la morphogenèse gonadique, sont aujourd'hui validées par des études mettant en œuvre des outils moléculaires. Parmi les auteurs ayant contribué à ces travaux, citons :

pour les gonades, Braun, Hoffmann, Mihalkovics, Wiedersheim et Wilson;

pour le cloaque et les organes copulateurs, Hoffmann, Leydig, Mitsukuri, Ostroumoff, von Perenyi, Strahl et Treadwell.

Les recherches descriptives, fondées sur l'observation de séries d'embryons plus complètes et illustrées, en plus des dessins, par des photographies de coupes, ont continué au XX^{ème} siècle ; les plus documentées sont celles de :

Allen, Risley et Pieau sur les gonades de tortues (*Chrysemys sp.*, *Sternotherus odoratus*, *Emys orbicularis*) ;

Forbes sur les gonades et les conduits génitaux d'*Alligator mississippiensis* et d'*Anolis carolinensis*;

Raynaud sur les gonades et les conduits génitaux d'*Anguis fragilis*, *Lacerta viridis* et *Natrix tessellata* ;

Dufaure sur les gonades, les conduits génitaux et les organes copulateurs de *Lacerta (Zootoca) vivipara*;

Fleischmann, Unterhössel et Hellmuth sur le cloaque des crocodyliens, des tortues, des lézards et des serpents ;

Raynaud et Pieau sur le développement des organes copulateurs de *Testudo graeca*, *Anguis fragilis*, *Lacerta viridis* et *Natrix tessellata*;

Beuchelt, Hubert, Dufaure et Collin sur les organes copulateurs de serpents (*Natrix natrix*, *Vipera berus*, *V. aspis*).

Le lecteur trouvera dans la synthèse de Raynaud & Pieau (1985) les références des articles publiés par ces auteurs.

Les premières recherches expérimentales sur la différenciation sexuelle des reptiles ont consisté à examiner les effets de stéroïdes sexuels de synthèse (androgènes et œstrogènes) et/ou d'hormone gonadotrope injectés dans des œufs, des nouveau-nés ou des juvéniles. Elles ont été effectuées en France et aux Etats-Unis. En France, Dantchakoff (1937, 1938, 1939) a injecté de la folliculine (hormone œstrogène) dans des œufs de lézard (espèce non précisée). Aux Etats-Unis, Forbes (1938a, 1938b, 1939) a traité des alligators (*A. mississippiensis*) immatures avec de l'œstrone (œstrogène) et de la testostérone (androgène) et des femelles nouveau-nées d'alligator avec de la testostérone; Risley (1937, 1940, 1941) a injecté de la testostérone dans des œufs de tortues (*Chrysemys marginata bellii*) au stade gastrula et des hormones sexuelles et de l'hormone gonadotrope à des tortues juvéniles (*Malaclemmys centrata*), alors qu'Hartley (1945) a injecté de la testostérone ou de l'œstradiol dans des œufs de serpent (*Thamnophis sirtalis*) à un stade avancé du développement embryonnaire.

Un peu plus tard, Vivien & Stéfán (1958), Vivien (1959) et Stéfán (1963) ont administré un œstrogène à des nouveau-nés de *Mauremys leprosa*. Dans ces expériences, les résultats étaient variables, car les stades de développement (embryonnaire, postnatal) étaient différents d'une expérience à l'autre, rendant leur interprétation difficile. Les recherches réalisées en France à partir de 1960, apportant des données nouvelles, ont permis de donner des explications cohérentes à ces différents résultats et ont suscité un regain d'intérêt pour le problème du déterminisme du sexe chez les vertébrés.

A cette époque, Raynaud, constatant la présence de nombreux orvets (*Anguis fragilis*) sur la colline de Sannois (Val d'Oise) où il vient d'installer son laboratoire, entreprend d'étudier la différenciation sexuelle chez cette espèce après avoir travaillé plusieurs années sur la différenciation sexuelle de la souris. L'orvet étant une espèce vivipare, il

lui apparaît nécessaire d'extraire les œufs des oviductes et de les cultiver in vitro pour d'une part, suivre régulièrement le développement embryonnaire et, d'autre part, réaliser des expériences sur l'embryon. Ayant mis au point une technique simple de culture, il injecte dans l'allantoïde des œstrogènes et des androgènes à des doses variables et à des stades différents du développement embryonnaire, effectue une irradiation localisée au moyen de rayons X de la région hypophysaire, examine le développement de l'appareil génital après décapitation, cultive la partie postérieure du corps comprenant les ébauches des hémipenes mais sans les gonades, etc. Dans la voie tracée par Raynaud, Dufaure met en culture les œufs de *Lacerta vivipara* et réalise des expériences similaires (revue de Raynaud & Pieau 1985).

En 1966, Charnier publie une note faisant état de sex ratios anormales chez des nouveau-nés d'*Agama agama* issus d'œufs incubés dans des conditions différentes de température et de substrat. Elle suggère que la différence de température, bien que très faible, pourrait expliquer ce biais (1 seul mâle sur 46 œufs mis à 26-27°C dans du sable humide, 81 % de mâles sur 58 œufs mis à 29°C sur du coton humide). Dans la nature, les différences de température entre le jour et la nuit (pouvant atteindre 15°C) permettraient d'assurer une sex ratio de 50 % de mâles. Pendant quelques années, cette note semble être ignorée des chercheurs s'intéressant au déterminisme du sexe. Cependant, en 1970, Pieau remarque que des témoins expérimentaux de *Testudo graeca* présentent tous un phénotype mâle : huit sont issus d'œufs incubés à 26-27°C, 6 d'œufs incubés à 30°C. Ces résultats, comme ceux de Charnier chez *A. agama*, laissent présager un effet de la température sur la sex ratio chez les tortues. De fait, des expériences complémentaires réalisées chez *T. graeca* et l'incubation d'œufs d'*Emys orbicularis* à différentes températures ont montré que chez ces deux espèces, la différenciation sexuelle des gonades est dépendante de la température d'incubation des œufs (Pieau 1971, 1972).

Intrigué par ces résultats, Yntema (1976) entreprend d'examiner l'appareil génital de la collection d'embryons et de nouveau-nés de *Chelydra serpentina* qu'il avait fixés pour d'autres études et qui étaient issus d'œufs incubés à différentes températures. Il constate aussi une influence de la température, mais alors que chez *T. graeca* et *E. orbicularis*, les températures basses donnaient 100 % de mâles et les températures élevées 100 % de femelles, chez *C. serpentina*, les températures basses et élevées donnent des femelles et les températures intermédiaires des mâles.

Dès lors, la communauté scientifique, jusqu'alors perplexe, comprend que les reptiles peuvent constituer des modèles intéressants pour l'étude du déterminisme du sexe. En 1979, Bull et Vogt confirment l'influence de la température d'incubation des œufs sur la sex ratio de plusieurs autres espèces de tortues et désignent le phénomène par « Temperature-dependent Sex Determination » ou TSD. Il s'ensuit de nombreux articles examinant les effets de la température sur le déterminisme du sexe de diverses espèces de tortues, de crocodiliens, de lézards et de serpents. Plusieurs travaux sont consacrés aux aspects écologiques et/ou évolutifs de TSD, d'autres aux aspects physiologiques, notamment l'implication des hormones sexuelles dans la différenciation des gonades. Plus récemment, des recherches sur les gènes impliqués dans cette différenciation ont été entreprises. Plusieurs revues ont été publiées sur le sujet, parmi lesquelles celles de Bull (1980, 1983), Janzen & Paukstis (1991), Pieau (1996a, b), Lance (1997), Pieau *et al.* (2001). Par ailleurs, un ouvrage sur TSD est en préparation. Aussi nous limitons-nous ici à énoncer les résultats les plus marquants des recherches réalisées jusqu'à présent sur le déterminisme du sexe des reptiles.

II. RESULTATS LES PLUS MARQUANTS

A. TSD, GSD (ou CSD)

Jusqu'à la découverte de TSD, il était admis que le déterminisme du sexe des reptiles était génétique, obéissant à un mécanisme XY/XX (hétérogamétie mâle) comme chez les mammifères, ou ZW/ZZ (hétérogamétie femelle) comme chez les oiseaux. Par comparaison avec TSD, le déterminisme génétique du sexe a été appelé GSD (pour Genotypic Sex Determination, Bull 1980, 1983) ou CSD (pour Chromosomal Sex Determination, Coriat *et al.* 1994). Les recherches effectuées jusqu'à présent montrent que (revue de Pieau 1996a) :

- tous les serpents présentent un mécanisme ZW/ZZ ;
- les lézards présentent l'un ou l'autre des trois mécanismes XY/XX, ZW/ZZ, TSD ;
- la majorité des tortues présentent TSD, les autres étant XY/XX ou ZW/ZZ ;
- tous les crocodiliens examinés (la moitié des espèces) présentent TSD.

Chez les espèces présentant GSD, les chromosomes sexuels peuvent être morphologiquement différenciés (Ex : Viperidae, Colubridae), ou peu, voire non, distinguables morphologiquement (Ex : Boïdae).

Chez les espèces présentant TSD, jusqu'à présent, on n'a pas montré l'existence de chromosomes sexuels (Bull 1980, 1983).

TSD a été mis en évidence chez des espèces ovipares, en mettant les œufs en incubation artificielle à différentes températures constantes, mais le maintien de femelles gestantes à des températures contrôlées a montré que TSD peut aussi exister chez certaines espèces vivipares (ex : le lézard *Eulamprus tympanum*, Robert & Thompson 2001).

Trois types de réponse à la température ont été mis en évidence (Ewert & Nelson 1991 ; revues de Pieau 1996a, b) :

Type Ia : températures basses masculinisantes , températures hautes féminisantes (observé chez de nombreuses tortues comme *Emys orbicularis*, *Trachemys scripta*, *Testudo graeca*, et toutes les tortues marines).

Type Ib : températures basses féminisantes, températures élevées masculinisantes (observé chez quelques lézards).

Type II : températures basses et élevées féminisantes, températures intermédiaires masculinisantes (observé chez des tortues, des lézards, les crocodyliens et possible chez *Sphenodon*).

Par définition, on appelle température pivot la température qui donne 50 % de mâles et 50 % de femelles (Mrosovsky & Pieau 1991). Il existe une seule température pivot dans les types Ia et Ib, deux températures pivots dans le type II. La période thermosensible est la période du développement embryonnaire pendant laquelle la différenciation sexuelle des gonades est influencée par la température. Elle est d'environ 12 jours chez *E. orbicularis* et correspond aux premières étapes de la différenciation sexuelle des gonades (Pieau & Dorizzi 1981). Dans les conditions naturelles, le sexe d'un individu dépend des proportions du développement embryonnaire exposées respectivement à des températures féminisantes et des températures masculinisantes pendant la période thermosensible (Pieau 1982 ; Georges *et al.* 1994) et de sa constitution génétique. En effet, il existe un composant génétique de la sensibilité à la température qui fait qu'à des conditions de température identiques (par exemple à la température pivot ou au voisinage de cette température) deux individus peuvent répondre différemment.

De nombreux auteurs (Bull 1980, 1983 ; Janzen & Paukstis 1991 ; Shine 1999 ; Girondot & Pieau 1999 ; etc) ont examiné les implications évolutives de TSD, s'interrogeant en particulier sur les avantages sélectifs de TSD par rapport à GSD, mais force est de constater qu'aucune réponse pleinement satisfaisante n'a été donnée à cette question.

B. Morphogenèse sexuelle

Une synthèse des données concernant la morphogenèse sexuelle des reptiles a été effectuée par Raynaud & Pieau (1985). Nous ne retenons ici que quelques observations sur la morphogenèse gonadique et phallique.

Gonades. Les gonades se forment sur le bord ventro-médian des mésonéphros (reins embryonnaires). L'épithélium coelomique de cette région s'épaissit et des cellules germinales d'origine extra-gonadique viennent s'intercaler entre les cellules constituant cet épithélium ; celui-ci a été désigné, à tort, « épithélium germinatif ». Cet épithélium prolifère et les cellules issues de cette prolifération pénètrent dans le stroma mésenchymateux, mésonéphrétique, sous-jacent où elles s'organisent en cordons. Dans la différenciation mâle, ces cordons s'élargissent ; les cellules germinales quittent l'épithélium superficiel qui s'amincit et viennent s'intercaler entre les cellules épithéliales des cordons qui se transforment en tubes testiculaires, futurs tubes séminifères. Les cellules épithéliales des tubes testiculaires sont donc les futures cellules de Sertoli et les cellules germinales les futures spermatogonies des tubes séminifères. Ces observations réalisées de longue date chez des tortues, l'alligator (*A. mississippiensis*) et des lézards ont été récemment confirmées chez les mammifères (souris) où des marqueurs moléculaires ont été utilisés pour déterminer l'origine et suivre la destinée des cellules.

Dans la différenciation femelle, les cordons épithéliaux ne se transforment pas en tubes testiculaires mais en lacunes à épithélium aplati, tandis que les cellules germinales restées dans l'épithélium germinatif se multiplient (ovogonies) et entrent en méiose (ovocytes) ; ainsi se constitue le cortex ovarien. Vers la fin de la vie embryonnaire, du côté interne du cortex, les ovocytes s'entourent des cellules épithéliales, formant des follicules primordiaux.

Ces différentes étapes de la morphogenèse gonadique ont été décrites plus en détail et illustrées dans Pieau *et al.* (2001).

Pénis et hemipenes. Alors que les crocodyliens et les tortues présentent un seul organe copulateur (pénis impair), les lézards et les serpents présentent deux organes copulateurs (hemipenes). L'étude comparée des premières étapes de la formation des organes copulateurs chez *Anguis fragilis*, *Lacerta viridis* et *Testudo graeca* a montré que le pénis impair de *T. graeca* est un organe plus complexe que celui qui aurait résulté de la simple fusion de deux hemipenes; il présente des analogies avec le pénis des mammifères. Par ailleurs, chez certaines espèces, comme *L. viridis*, *L. vivipara*, *Natrix tessellata*, *Vipera aspis*, les ébauches des hémipenes

présentent un important dimorphisme sexuel, régressant chez les femelles pendant la vie embryonnaire, alors que chez d'autres espèces, comme *A. fragilis* et *Mabuya megalura*, le développement des hemipenes ne présente pas ou présente peu de dimorphisme sexuel chez l'embryon. De même chez les tortues *T. graeca* et *Emys orbicularis*, à l'éclosion, les femelles présentent un clitoris peu différent du pénis des mâles (revue de Raynaud & Pieau 1985).

C. Implication des stéroïdes dans la différenciation sexuelle

Œstrogènes. Un faisceau d'expériences réalisées chez des espèces présentant GSD et, surtout, chez des espèces présentant TSD, démontre l'implication des hormones œstrogènes (œstrone, œstradiol) dans la différenciation ovarienne.

Parmi les espèces présentant GSD, les résultats les plus significatifs ont été obtenus chez *Lacerta viridis* (GSD de type ZZ/ZW). Du benzoate d'œstradiol injecté dans des œufs de *L. viridis* avant la période de différenciation sexuelle des gonades induit la différenciation d'ovaires chez les mâles : dans la medulla, la différenciation des tubes testiculaires est inhibée (les cordons épithéliaux restent minces ou deviennent des lacunes à épithélium aplati), un cortex de type ovarien se forme, son développement est stimulé par l'adjonction d'une hormone gonadotrope au traitement œstrogénique (revue de Raynaud & Pieau 1985).

Parmi les espèces présentant TSD, les résultats les plus complets ont été obtenus chez *Emys orbicularis* (TSD de type Ia). L'injection de benzoate d'œstradiol dans des œufs incubés à 25-26°C (température donnant 100 % de mâles), avant ou au début de la période thermosensible, féminise les gonades et comme chez *L. viridis*, le développement du cortex est stimulé par l'adjonction d'hormone gonadotrope (revue de Raynaud & Pieau 1985). Féminiser des gonades mâles avec des œstrogènes exogènes est une indication de l'implication de ces hormones, mais ne constitue pas une preuve irréfutable de cette implication. Cette preuve a été apportée par l'utilisation d'antiœstrogènes et d'inhibiteurs d'aromatase. Ces substances sont couramment utilisées dans les traitements de cancers œstrogéno-dépendants chez la femme. Les antiœstrogènes, en se fixant aux récepteurs des œstrogènes, entrent en compétition avec ces hormones et empêchent donc leur action. Les inhibiteurs d'aromatase inhibent l'activité de l'enzyme aromatase qui convertit les androgènes en œstrogènes et bloquent donc la synthèse des œstrogènes. En injectant du tamoxifène (antiœstrogène), du Fadrozole ou du Letrozole (inhibiteurs d'aromatase

non stéroïdiens) dans des œufs d'*E. orbicularis* incubés à 30°C (température donnant 100 % de femelles), avant et/ou pendant la période thermosensible, les gonades se sont différenciées en testicules ou en ovotestes. Dans les testicules des femelles inversées, l'activité aromatasase est voisine de celle de testicules témoins ; dans les ovotestes elle est légèrement supérieure mais beaucoup plus faible que dans les ovaires témoins. Ainsi, au cours de la différenciation ovarienne normale, les œstrogènes endogènes inhibent le développement des tubes testiculaires. Le traitement avec un antiœstrogène ou un inhibiteur d'aromatase lève cette inhibition. Les œstrogènes stimulent aussi le développement du cortex ovarien et le niveau provoquant cette stimulation est beaucoup plus faible que celui qui est requis pour l'inhibition du développement des tubes testiculaires, ce qui explique la formation d'ovotestes, c'est-à-dire de gonades composées à la fois de tubes testiculaires et de cortex ovarien (revue de Pieau *et al.* 2001). Chez *E. orbicularis*, des ovotestes peuvent être obtenus dans diverses conditions expérimentales et au voisinage de la température pivot. Le suivi après l'éclosion des intersexués possédant ce type de gonades a montré que les ovotestes évoluent généralement en testicules ; toutefois, quelques ovocytes peuvent persister à la surface des testicules, ainsi que cela a été décrit chez des tortues immatures et adultes (Pieau *et al.* 1998, 1999).

Les effets des œstrogènes et des inhibiteurs d'aromatase décrits chez *E. orbicularis* ont été aussi observés chez plusieurs autres espèces de reptiles présentant TSD, incluant des lézards, d'autres espèces de tortues et des crocodyliens, confirmant l'implication des œstrogènes dans la différenciation ovarienne chez ces espèces et soulignant ainsi le rôle clef joué par l'aromatase (Pieau 1996a, Pieau *et al.* 2001). Outre leur implication dans la différenciation gonadique elle-même, les œstrogènes synthétisés dans les gonades stimulent le développement des canaux de Müller et leur différenciation en oviductes. Par ailleurs, ces hormones provoquent la régression des hemipenes chez certaines espèces comme *Lacerta viridis* (voir ci-dessus). Reste à comprendre pourquoi chez d'autres espèces, les hemipenes (comme chez *Anguis fragilis*) ou le pénis impair (comme chez *Testudo graeca*) ne régressent pas sous l'action des œstrogènes (revue de Raynaud & Pieau 1985). Une étude comparée des récepteurs aux œstrogènes dans ces organes pourrait apporter des éléments de réponse à cette question.

Androgènes. Les effets des hormones androgènes ont aussi été étudiés chez les embryons de reptiles. L'étude effectuée chez *E. orbicularis*,

confirmée chez d'autres espèces, a montré que la testostérone exerce un effet féminisant, dit « paradoxal » sur les embryons mâles, avec notamment la différenciation d'ovotestes. L'explication la plus probable est qu'une partie de la testostérone est aromatisée en œstradiol. Les effets d'un androgène non aromatisable, la dihydrotestostérone (DHT), ont aussi été examinés. Il semble que cette hormone pourrait exercer un effet masculinisant sur les gonades, mais uniquement au voisinage de la température pivot (revue dans Pieau 1996a).

Les androgènes stimulent le développement des voies génitales mâles (épididymes à partir des mésonéphros, canaux déférents à partir des canaux de Wolff) ainsi que le développement du pénis ou des hemipenes chez les mâles, mais il n'est pas encore établi si l'une ou l'autre des deux hormones, testostérone ou DHT, ou si les deux hormones sont impliquées dans ces stimulations chez les reptiles. Les testicules secrètent aussi de l'hormone anti-Müllérienne (AMH, voir ci-dessous) qui est responsable de la régression des canaux de Müller chez les mâles ; la testostérone est probablement impliquée dans ce processus (revue de Raynaud & Pieau, 1985).

D. Non implication du cerveau dans la différenciation sexuelle des gonades

Les œstrogènes ne sont pas synthétisés uniquement dans les ovaires, mais aussi dans plusieurs autres organes, en particulier le cerveau et le tissu adipeux. Chez les reptiles présentant TSD, le cerveau présente une activité aromatase, quelquefois plus importante que dans les gonades, dès le début de la période thermosensible. Pour cette raison, plusieurs auteurs ont pensé et essayé de démontrer (malgré des résultats souvent contradictoires) que l'effet de la température sur la différenciation sexuelle des gonades est indirect : suivant la température, plus ou moins d'œstrogènes seraient synthétisés dans le cerveau, puis seraient véhiculés par la voie sanguine jusqu'aux gonades. Or, les expériences antérieures de Raynaud chez *Anguis fragilis* et de Dufaure chez *Lacerta vivipara* avaient montré que la décapitation des embryons à un stade précoce de leur développement n'empêchait pas la différenciation sexuelle normale des gonades en testicules ou en ovaires (revue de Raynaud & Pieau 1985).

Bien que réalisées chez deux espèces présentant GSD, les résultats de ces expériences rendaient peu probable une implication du cerveau dans TSD. Des expériences récentes réalisées chez l'embryon de tortue marine *Lepidochelys olivacea* ont clairement montré que l'action de la température

s'exerce sur les gonades elles-mêmes et non sur un quelconque autre organe synthétisant des œstrogènes. En effet, les gonades de cette espèce ont été mises en culture séparément à un stade précoce de leur développement et placées l'une à température féminisante, l'autre à température masculinisante. Elles se sont différenciées conformément à la température appliquée. De même des changements de température en cours de culture ont donné la même réponse que pour l'embryon entier *in vivo* (Moreno-Mendoza *et al.* 2001).

S'il est vraisemblable que la température agit, directement ou indirectement, sur la synthèse d'aromatase, via la transcription du gène codant pour cet enzyme, c'est donc au niveau des gonades elles-mêmes qu'il faut chercher à élucider son mécanisme d'action (revues de Pieau 1996a, Pieau *et al.* 2001).

E. Gènes impliqués dans la différenciation des gonades

Les recherches effectuées chez les mammifères ont permis de caractériser plusieurs gènes codant pour des facteurs impliqués dans la formation et/ou la différenciation des gonades. Ainsi *SF1* et *WT1* jouent un rôle dans ces deux processus ; *SRY*, *SOX9* et *DMRT1* sont impliqués dans la différenciation testiculaire alors que *DAX1* est impliqué dans la différenciation ovarienne. Le profil d'expression de ces gènes au cours du développement des gonades et diverses expériences de transgénèse ou d'inactivation de ces gènes, réalisées en particulier chez la souris, permettent de comprendre comment les différents facteurs codés par ces gènes interagissent.

A l'exception de *SRY*, gène de détermination testiculaire qui semble spécifique du chromosome Y de mammifère, des homologues de tous les autres gènes ont été trouvés chez les autres vertébrés, en particulier chez les oiseaux et les reptiles présentant TSD. Cependant, les profils d'expression de ces gènes dans les gonades diffèrent d'une classe à l'autre, voire d'une espèce à l'autre dans une même classe. Ainsi, il est clair que *SOX9* et *DMRT1* sont impliqués dans la différenciation des cellules de Sertoli, lesquelles sécrètent l'hormone anti-Müllerienne (AMH). Mais les stades auxquels ces facteurs commencent à intervenir n'apparaissent pas être les mêmes chez toutes les espèces. De même, le rôle de *DAX1* dans la différenciation ovarienne n'est pas clairement établi chez les oiseaux et les reptiles.

Une synthèse des travaux concernant *SF1*, *WT1*, *SOX9*, *DAX1* et le gène codant pour l'AMH, chez les reptiles présentant TSD, a été effectuée

dans Pieau *et al.* (2001). A ces travaux, il convient d'ajouter ceux de Kettlewell *et al.* (2001) sur *DMRT1* chez la tortue *Trachemys scripta* et de Choudhary *et al.* (2000) sur *SOX9* chez le lézard *Calotes versicolor*, une espèce présentant GSD.

Nous avons vu que l'aromatase joue un rôle clef dans la différenciation sexuelle des gonades des reptiles. Sachant que la régulation transcriptionnelle du gène codant pour cet enzyme est multifactorielle, on peut s'interroger sur l'implication des différents facteurs évoqués ci-dessus dans cette régulation. En effet, il a été montré que SF1 active la transcription du gène *aromatase* alors que l'AMH la réprime. Par ailleurs, le gène *AMH* serait aussi activé par SF1 ainsi que par *SOX9*. On sait de plus que *DAX1* est impliqué dans la stéroïdogenèse. Un schéma montrant les interactions possibles entre ces différents facteurs et le gène *aromatase* a été proposé dans la revue de Pieau *et al.* (2001).

III. CONCLUSIONS

Si de longue date, on savait qu'il était possible de modifier les sex ratios en élevant ou en abaissant la température d'élevage de larves d'amphibiens (revue dans la thèse de C. Eggert 2000), il est évident que la découverte de TSD chez les reptiles a suscité de nouvelles recherches chez les poissons et les amphibiens. Aujourd'hui il est clairement établi que les reptiles comme les poissons et les amphibiens présentent différents mécanismes de déterminisme du sexe : GSD (XY/XX ou ZW/ZZ) et TSD. On ne peut établir de frontières nettes entre ces différents mécanismes car d'une part dans TSD, l'effet de la température se superpose à un composant génétique plus ou moins « fort » selon les espèces et, d'autre part, le passage de l'hétérogamétie mâle à l'hétérogamétie femelle semble pouvoir se faire entre des populations différentes d'une même espèce. Comme les poissons et les amphibiens, les reptiles peuvent donc présenter de bons modèles pour l'étude de l'évolution des chromosomes sexuels.

Dans ces trois classes de vertébrés ainsi que chez les oiseaux, les œstrogènes sont impliqués dans la différenciation des ovaires, soulignant le rôle clef joué par l'aromatase, l'enzyme qui convertit les androgènes en œstrogènes. Rechercher comment la régulation transcriptionnelle du gène *aromatase* s'accomplit dans les différents systèmes de déterminisme du sexe nous paraît être une bonne piste de recherche. Chez les espèces présentant TSD, la température intervient probablement, directement ou

indirectement, dans cette régulation, mais la cible de la température reste à déterminer (revue de Pieau 1996a).

Jusqu'à présent, on a considéré que les hormones stéroïdes n'intervenaient pas dans la différenciation sexuelle des gonades chez les mammifères. Le rôle des œstrogènes ne doit cependant pas être écarté, car chez des souris femelles invalidées pour les récepteurs aux œstrogènes α et β , on observe à l'âge adulte une transdifférenciation des cellules folliculaires en cellules de Sertoli et, chez les marsupiaux, les gonades des nouveau-nés mâles sont féminisées par un traitement œstrogénique administré au moment de leur entrée dans la poche ventrale. Quoiqu'il en soit, il n'est pas exagéré de dire que la démonstration du rôle des œstrogènes dans la différenciation des gonades des reptiles présentant TSD a largement contribué à relancer des travaux dans les autres classes de vertébrés et à mettre en lumière le rôle clef de l'aromatase. On voit ainsi qu'à côté de recherches sur des modèles plus proches de l'homme (souris, rat et autres mammifères), il est indispensable de continuer à développer des recherches dans les autres classes de vertébrés. Nul doute que les recherches en cours sur les gènes impliqués dans la différenciation des gonades chez les poissons, les amphibiens et les reptiles aideront à comprendre les mécanismes évolutifs du déterminisme du sexe.

IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bull J.J. 1980 - Sex determination in reptiles. *Quart. Rev. Biol.*, 55: 3-21.
- Bull J.J. 1983 - Evolution of Sex Determining Mechanisms. Benjamin & Cummings, Menlo Park, CA.
- Bull J.J. & Vogt R.C. 1979 - Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science*, 206:1186-1188.
- Charnier M. 1966 - Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lacertilien). *C. R. Soc. Biol.*, 160: 620-622.
- Choudhary B., Ganesh S. & Raman R. 2000 - Evolutionary conservation of the gene *cvsox9* in the lizard, *Calotes versicolor*, and its expression during gonadal differentiation. *Dev. Genes Evol.*, 210: 250-257.
- Coriat A.M., Valleley E., Ferguson M.W.J. & Sharpe P.T. 1994 - Chromosomal and temperature-dependent sex determination : the search for a conserved mechanism. *J. Exp. Zool.*, 270: 112-116.
- Dantchakoff V. 1937 - Sur l'action de l'hormone sexuelle chez les reptiles. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 205: 424-427.

- Dantchakoff V. 1938 - Ueber chemische Werkzeuge bei der Realisation normal bestimmter embryonaler geschlechtlicher Histogenese bei Reptilien. *Arch. EntwMech. Org.*, 138: 465-521.
- Dantchakoff V. 1939 - Sur la déficience d'effets de l'hormone femelle dans l'histogenèse induite chez le lézard et sur les moyens d'y remédier. *C. R. Soc. Biol.*, 130: 248-249.
- Eggert C. 2000 - Le déclin du pelobate brun (*pelobates fuscus*, amphibien anoure) : Apport de la phylogéographie et de la dynamique de population à sa compréhension. Implications pour sa conversation. Thèse, Université de Savoie.
- Ewert M.A. & Nelson C.E. 1991 - Sex determination in turtles: Diverse patterns and some possible adaptive values. *Copeia*, 1991: 50-69.
- Forbes T.R. 1938a - Studies on the reproductive system of the alligator. II. The effects of prolonged injections of estrone in the immature alligator. *J. Exp. Zool.*, 78: 335-367.
- Forbes T.R. 1938b - Studies on the reproductive system of the alligator. III. The action of testosterone on the accessory sex structures of recently hatched female alligators. *Anat. Rec.*, 72: 87-95.
- Forbes T.R. 1939 - Studies on the reproductive system of the alligator. V. The effects of injections of testosterone propionate in immature alligators. *Anat. Rec.*, 75: 51-57.
- Georges A., Limpus C. & Stoutjesdijk R. 1994 - Hatchling sex in the marine turtle *Caretta caretta* is determined by proportion of development at a temperature, not daily duration of exposure. *J. Exp. Zool.*, 270: 432-444.
- Girondot M. & Pieau C. 1999 - A fifth hypothesis for the evolution of TSD in reptiles. *Tr. Ecol. Evol.*, 14: 359-360.
- Hartley R.T. 1945 - Effects of sex hormones on the development of the urogenital system in the garter snake. *J. Morphol.*, 76: 115-137.
- Janzen J.F. & Paukstis G.L. 1991 - Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution, and experimental design. *Quart. Rev. Biol.*, 66: 149-179.
- Kettlewell J.R., Raymond C.S. & Zarkower D. 2000 - Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis*, 26: 174-178.
- Lance V., A. 1997 - Sex determination in reptiles: An update. *Amer. Zool.*, 37: 504-513.
- Moreno-Mendoza N., Harley V. & Merchant-Larios H. 2001 - Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Dev. Biol.*, 229: 319-326.

- Mrosovsky N. & Pieau C. 1991 - Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia*, 12: 169-179.
- Pieau C. 1970 – Effets de l'œstradiol sur l'appareil génital de l'embryon de tortue mauresque (*Testudo graeca* L.). *Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp.*, 59: 295-318.
- Pieau C. 1971 – Sur la proportion sexuelle chez les embryons de deux Chéloniens (*Testudo graeca* L. et *Emys orbicularis* L.) issus d'œufs incubés artificiellement. *C. Acad. Sci. Paris*, 272 (D): 3071-3074.
- Pieau C. 1972 – Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux Chéloniens, *Emys orbicularis* L. et *Testudo graeca* L. *C. Acad. Sci. Paris*, 274 (D): 719-722.
- Pieau C. 1982 - Modalities of the action of temperature on sexual differentiation in field-developing embryos of the European pond turtle *Emys orbicularis* (*Emydidae*). *J. Exp. Zool.*, 220: 353-360.
- Pieau C. 1996a - Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays*, 18: 19-26.
- Pieau C. 1996b - Le point sur le déterminisme du sexe en fonction de la température chez les reptiles. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 77: 11-21.
- Pieau C., Belaïd B., Dorizzi M. & Richard-Mercier N. 1999 – Intersexuality in turtles with temperature-dependent sex determination. *In: Current Studies in Herpetology*. Miaud C. & Guyétant R. (Eds), Le Bourget du Lac (SEH) : 17-21.
- Pieau C. & Dorizzi M. 1981 - Determination of temperature sensitive stages for sexual differentiation of the gonads in embryos of the turtle, *Emys orbicularis*. *J. Morphol.*, 170: 373-382.
- Pieau C., Dorizzi M., Richard-Mercier N. & Desvages G. 1998 – Sexual differentiation of gonads as a function of temperature in the turtle *Emys orbicularis* : endocrine function, intersexuality and growth. *J. Exp. Zool.*, 281: 400-408.
- Pieau C., Dorizzi M. & Richard-Mercier N. 2001 - Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *In: Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*. Scherer G. & Schmid M. (eds), pp. 117-141. Birkhäuser, Basel.
- Raynaud A. & Pieau C. 1985 - Embryonic development of the genital system. *In: Biology of the Reptilia*. Gans C. & Billett F. (Eds), vol 15, Development B, pp. 149-300. Wiley J. & Sons, New York.
- Risley P.L. 1937 - A preliminary study of sex development in turtle embryos following administration of testosterone. *Anat. Rec.*, 70 (suppl): 103.

- Risley P.L. 1940 - Intersexual gonads of turtle embryos following injection of male sex hormone. *J. Morphol.*, 67: 439-453.
- Risley P.L. 1941 - A comparison of effects of gonadotropic and sex hormones on the urogenital systems of juvenile terrapins. *J. Exp. Zool.*, 87: 477-515.
- Robert K.A. & Thompson M.B. 2001 – Sex determination. Viviparous lizard selects sex of embryos. *Nature*, 41: 698-699.
- Shine R. 1999 - Why is sex determined by nest temperature in many reptiles? *Tr. Ecol. Evol.*, 14: 186-189.
- Stéfan Y. 1963 - Contribution à l'étude expérimentale de l'intersexualité chez un chélonien : *Emys leprosa*. *Bull. Biol. France et Belgique*, 97: 363-467.
- Vivien J.H. 1959 - Réactivité particulière du cortex gonadique et de l'épithélium du canal de Müller à l'action des hormones sexuelles chez le jeune mâle d'*Emys leprosa* S., traité après l'éclosion. *Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp.*, 48bis: 297-311.
- Vivien J.H. & Stéfan Y. 1958 - Féminisation des gonades de jeunes tortues d'eau *Emys leprosa* mâles, par action du diéthylstilbœstrol. *C. R. Soc. Biol.*, 152: 649-652.
- Yntema C.L. 1976 - Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydra serpentina*. *J. Morphol.*, 150: 453-462.

Manuscrit accepté le 30 juin 2002

Amphibiens et Reptiles non aviens: un matériel de choix en squelettochronologie

Par

Jacques CASTANET

*Université P. & M. Curie-Paris 6
Equipe "Formations squelettiques", UMR CNRS 8570
Université Paris 6 - 4, Pl. Jussieu - case 70 77.
75251 Paris cedex 05 (France)
castanet@ccr.jussieu.fr*

Résumé - Reconnues depuis plus d'un demi siècle, les marques de croissance périodiques enregistrées dans les tissus squelettiques - et kératinisés - des Vertébrés s'imposent désormais comme un incontournable instrument de chronométrie biologique. Spécialement chez les amphibiens et chez les reptiles non aviens, cette empreinte du temps, souvent bien exprimée et relativement facile à décrypter, a permis des avancées notables dans la connaissance des traits comparés d'histoire de vie. Après une brève rétrospective sur l'émergence de la méthode squelettochronologique, j'insisterai sur sa mise en œuvre et ses performances dans les différents taxons d'amphibiens et de reptiles non aviens, actuels et disparus.

Mots-clés: Amphibiens, Reptiles non aviens, âge, squelettochronologie.

Summary – Amphibians and non avian reptiles : a special material in skeletochronology. Known since more than half a century, cyclical growth marks recorded in skeletal tissues - as in keratinised ones- of Vertebrates appear now as an unquestionable tool to assess time in biology. Especially in amphibians and non avian reptiles, this time marked, generally well expressed and easy to decipher, has given noticeable results for the knowledge of individual and populational life history traits. After a new insight on skeletochronology as a method, I will emphasize on its practical use and performances in extant and extinct amphibians and non avian reptiles.

Key-words: Amphibians, non avian reptiles, age, skeletochronology

I- RAPPEL HISTORIQUE ET PRINCIPE DE LA SQUELETTOCHRONOLOGIE

Intuitivement, l'idée d'utiliser les marques répétées présentes à la surface ou dans les tissus squelettiques des animaux, pour estimer leur âge individuel n'est pas récente. Cette pratique, analogue à celle qui consiste à connaître l'âge d'un arbre à partir des cernes observés sur une section de son tronc (dendrochronologie), a débuté vers la fin du 19^{ième} siècle avec l'utilisation des anneaux des écailles des "poissons" osseux (= scalimétrie e.g. Baudelot 1873).

Chez les amphibiens, Senning (1940) est le premier à utiliser les marques de croissance squelettiques (MCS) comme critère d'âge chez *Necturus maculosus* (Mudpuppy), urodèle protéida nord américain. Cet auteur décrit ces marques successives à la surface d'un os dermique de la voûte palatine, le parasphénoïde, dans un échantillon de 162 individus. Il propose une courbe de croissance.

Chez les reptiles non aviens des anneaux de croissance ont d'abord été observés à la surface des écailles cornées d'une tortue (genre *Malaclemys*), par Coker en 1906. Dans ce taxon, c'est Mattox (1935) qui le premier propose d'utiliser les marques de croissance présentes sur des sections transversales d'os longs de *Chrysemys marginata* pour estimer leur âge. Bryuzgin (1939) décrit pour la première fois de telles marques sur les os plats de différents serpents. Dès 1946 (puis en 1952 et 1965), notre regretté collègue Saint Girons, utilise ces marques comme critère d'âge dans ses recherches sur la biologie de *Vipera aspis*. En 1974, Smirina publie la première utilisation des marques de croissance pour estimer l'âge individuel au sein d'une population de lézards agiles (*Lacerta agilis*), à partir de coupes transversales d'os longs. Cependant, jusque dans les années 1970, l'utilisation des marques de croissance comme critère d'âge reste très empirique. Leur localisation, leur structure, leur périodicité et leur déterminisme sont pratiquement inconnus. Leur expression différentielle d'un taxon à l'autre, voire entre les os d'un même individu, reste mystérieuse, entre autres à cause de descriptions éronnées, telle celle de Griffiths (1962). A cette époque enfin, les conditions pratiques d'utilisation des MCS ne sont pas établies. Plusieurs auteurs contestent donc la fiabilité de ces structures répétées comme outil de chronométrie biologique. En 1961, Peabody, chercheur américain, publie la première description histomorphologique comparée des marques de croissance chez divers amphibiens et reptiles non aviens, actuels et fossiles. Poursuivant

l'analyse, son élève Warren soutient en 1963 un PhD non publié sur ce sujet. Le décès prématuré de Peabody et l'émigration de Warren en Australie, mettront curieusement fin pour une longue période (jusqu'au travail de Zug et Ruckdeschel en 1986 chez *Caretta caretta*), aux travaux américains pourtant bien engagés dans l'étude des marques de croissance chez les Vertébrés tétrapodes. Ainsi, en 1970 lorsque j'entrepris des recherches plus intégrées sur les marques de croissance squelettiques, tout d'abord chez les serpents, seule, E. Smirina poursuivait des travaux appliqués dans ce domaine chez les amphibiens. Assez rapidement, à la suite de données structurales comparées et de résultats expérimentaux, la signification et la périodicité des marques de croissance put être précisée. Il fut alors possible d'envisager avec rigueur leur utilisation pratique à l'échelle des populations et de tester les avantages mais aussi les difficultés et les limites de cette méthode que je proposai d'appeler "squelettochronologie" (Castanet *et al.* 1977). Chez les reptiles non aviens et chez les amphibiens, ou près de 350 références bibliographiques peuvent à ce jour être recensées (319 de 1906 à 2000, fig. 1), la squelettochronologie s'impose désormais comme un outil opérationnel et performant, indispensable à la connaissance de nombreux traits d'histoire de vie individuelle. Il en résulte un intérêt considérable pour les recherches en éco-démographie comparée des populations actuelles et fossiles.

II- SIGNIFICATION STRUCTURO-FONCTIONNELLE, DETERMINISME ET PERIODICITE DES MARQUES DE CROISSANCE SQUELETTIQUES.

Sans revenir sur la localisation, l'organisation et la composition détaillée des différentes catégories de marques de croissance périodiques décrites chez les tétrapodes (pour plus de détails, cf. Castanet *et al.* 1993), je rappellerai simplement que leur structure histologique est l'expression de vitesses différentielles d'ostéogénèse. Classiquement on distingue les **Zones**, couches relativement épaisses, formées d'une matrice osseuse peu organisée (= os à fibres enchevêtrées), liée à un dépôt osseux rapide. Lorsque la vitesse d'ostéogénèse diminue temporairement (quelques semaines à quelques mois), c'est un **annulus** qui se forme, couche relativement étroite d'os bien organisé (= os lamellaire), structurellement distincte de l'os irrégulier des zones. Un arrêt complet momentané de l'ostéogénèse (quelques semaines au moins) conduira à la mise en place d'une **ligne d'arrêt de croissance (LAC)**, "simple interface" marquant une

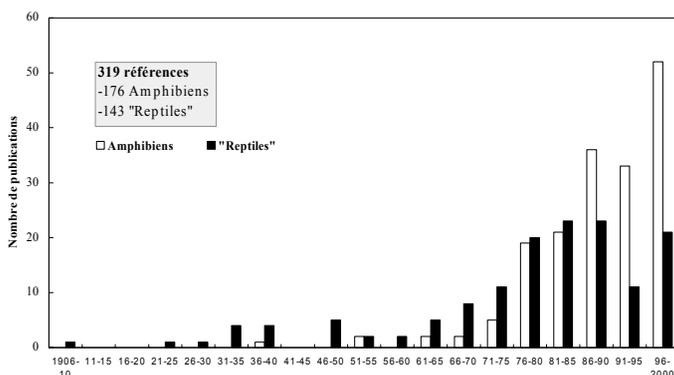


Figure 1 : Nombre de références bibliographiques relatives à la squeletochronologie chez les reptiles non aviens et chez les amphibiens de 1906 à 2000. A ce jour il faut ajouter au moins 20 travaux supplémentaires, la plupart chez les amphibiens.

Figure 1: References on skeletochronology in non avian reptiles and amphibians, from 1906 to 2000. Now, about 20 supplementary papers, mostly in amphibians, can be added.

discontinuité structurale de faible épaisseur (1 à 2 μ m) entre deux zones. Une LAC peut ou non être associée à un annulus. Ce sont les LACs qui, très chromophiles, seront préférentiellement prises en compte pour l'estimation de l'âge individuel. Par leur simple variation microstructurale, les Zones, les annuli et/ou les LACs, expriment une alternance répétée de vitesses d'ostéogénèse différentes, liées à un rythme défini de croissance.

La connaissance du déterminisme et de la périodicité des marques de croissance, sont les deux points clés à la base de leur utilisation comme instrument fiable de chronométrie. La présence des MCS chez des animaux vivants dans des conditions environnementales relativement constantes, naturelles (Castanet & Gasc 1986, Pantharatna *et al.* 2000, Kumbar & Pantharatna 2001) ou expérimentales (Castanet 1985), laisse penser que ces formations résultent d'un déterminisme endogène, c'est à dire interne à l'organisme, comme la plupart des rythmes biologiques connus. Cependant sous l'influence de variations climatiques bien contrastées, dues à l'altitude

et/ou à la latitude, les MCS apparaissent en général plus distinctement. A un même stade ontogénétique, une saisonnalité peu marquée induira seulement un ralentissement de l'ostéogenèse (annulus), tandis que des saisons contrastées se traduiront par des LACs c'est à dire des arrêts complets de la croissance osseuse en épaisseur (Esteban *et al.* 1996). En résumé, on admet actuellement que *les MCS sont l'expression de rythmes endogènes, synchronisés et amplifiés par le rythme des saisons* .

La périodicité des marques de croissance est mise en évidence par trois types d'approches. La plus intuitive consiste à étudier la correspondance entre le nombre de MCS et l'âge individuel, lorsque celui-ci est connu chez des animaux identifiés depuis leur naissance, dans la nature ou en captivité. Cependant cette méthode n'apporte qu'une réponse approximative. En effet, si les MCS ne s'enregistrent plus chez les individus âgés, la correspondance globale recherchée sera mauvaise, ce qui ne prouve rien quant à la périodicité de ces marques. Une variante plus rigoureuse de cette technique consiste à étudier l'augmentation du nombre de MCS sur les phalanges d'individus suivis par capture-marquage-recapture en conditions naturelles. Les résultats ainsi obtenus chez plusieurs espèces d'amphibiens (e.g. Hemelaar 1986), de lézards (Castanet *et al.* 1997, Duarte-Varela & Cabrera 2000) et de crocodiles (Hutton 1986 ; Tucker 1997), montrent en règle générale, qu'une zone et une LAC (ou un annulus) se forment effectivement chaque année. Des études expérimentales à l'aide de marqueurs fluorescents des tissus minéralisés, confirment également ce résultat chez la plupart des amphibiens et reptiles non aviens étudiés jusqu'ici. Cette technique a de plus permis de montrer que chez les espèces de climats tempérés, les LAC se forment pendant l'hiver, les zones se déposant en alternance pendant la période de vie active, vernale et estivale (Smirina 1972 ; Castanet 1985 ; Castanet *et al.* 1997).

En résumé, tant par leur signification structuro-fonctionnelle, que par leur déterminisme et leur périodicité, les MCS sont potentiellement des structures permettant une mesure fiable et directe du temps qui s'écoule. Elles autoriseront donc en principe la restitution *a posteriori* des traits d'histoire de vie ainsi enregistrés et sauvegardés dans les tissus durs des Vertébrés.

Envisageons maintenant les conditions générales d'utilisation pratique de la squelettochronologie.

III- SQUELETTOCHRONOLOGIE APPLIQUEE.

Simple dans son principe, validée en théorie, la squelettochronologie n'est cependant pas toujours aisée à mettre en oeuvre. Comme toute méthode biologique, elle présente des difficultés et limites variées qu'il importe de connaître pour (i) évaluer objectivement la précision et la valeur des résultats obtenus, (ii) ne pas rejeter en bloc la méthode simplement parce qu'on ne l'utiliserait pas correctement.

Il importe de comprendre que le signal périodique externe qui affecte l'organisme et son squelette est contraint et modifié par les caractéristiques spécifiques (morphogénétiques, ontogénétiques, physiologiques) de l'organe qui le reçoit, par les conditions de vie des individus et de leur populations, voire par leur histoire phylogénétique. Autrement dit, le message périodique enregistré dans le squelette en croissance est "brouillé" et il faut le décrypter pour en restituer une information précise et cohérente. Cette tâche n'est pas toujours facile. Cependant, chez les amphibiens et les reptiles non aviens, la plupart des difficultés et limites de la méthode sont à ce jour connues. Le plus souvent elles peuvent alors être contournées et l'erreur qu'elles engendrent, appréciée.

A. Mise en œuvre de la méthode.

D'une façon générale, c'est sur coupes transversales diaphysaires d'os longs que l'analyse squelettochronologique est la plus efficace. La raison principale en est que sur ces sections les marques de croissance présentent un modèle géométrique simple. Les LACs apparaissent en effet comme des lignes circulaires plus ou moins concentriques, régulières et fermées, permettant des mesures précises de leur taille. Une disposition semblable est réalisée par les anneaux de croissance des écailles cornées des tortues. Des marques de croissance très régulières existent aussi dans les ostéodermes de certaines espèces, tel ceux de *Megalania* (Varan géant du Pléistocène australien - Erickson 2001). En revanche sur ou dans les os et régions osseuses aplaties (os dermiques crâniens, zygapophyses, neurépinnes vertébrales, os de la sclérotique etc...), les LACs, ne sont pas fermées; elles présentent des dispositions variés plus ou moins complexes qui, selon l'os et l'espèce étudiée, se prêtent mal à l'analyse comparative et quantitative.

En pratique, chez les amphibiens, les lézards et les tortues, on utilisera des coupes osseuses d'environ 15 mm d'épaisseur (coupes à "congélation" ou à la "paraffine") colorées par une hématoxyline. L'analyse des marques

de croissance sera ensuite valablement effectuée selon les principes suivants:

- Pour toute espèce et population nouvellement étudiée, un examen préliminaire des marques de croissance sera réalisé sur plusieurs os longs du même individu et cela au moins pour 4 ou 5 d'entre eux. Le but sera de choisir l'os fournissant *a priori* les meilleurs résultats (marques les plus distinctes et les plus nombreuses, régulièrement disposées, résorption endostéale faible ou inexistante) et surtout de voir si les phalanges sont utilisables. Dans ces derniers éléments, les MCS sont un peu plus difficiles à analyser que sur les autres os longs des membres, mais l'avantage est évidemment de ne pas avoir à sacrifier les animaux pour estimer leur âge. La simple amputation d'un doigt, généralement sans conséquence pour la survie, suffira. L'échantillonnage inclura des adultes et des juvéniles, ces derniers étant indispensables pour effectuer un éventuel rétrocalcul (cf ci-dessous, "Remaniement endostéal")

- L'analyse sera réalisée en aveugle, c'est à dire sans connaître la taille, le poids, le sexe, ni aucun autre paramètre sur la biologie ou l'écologie des animaux.

- La "lectures" des MCS sera effectuée par deux personnes ayant sensiblement le même expérience de la méthode ou, à défaut, deux fois par la même personne après un certain délai. Dans les deux cas les résultats seront confrontés en vue d'une estimation consensuelle. Les individus pour lesquels l'estimation du nombre de LAC dépassera ± 1 seront rejetés de l'estimation de l'âge (comme s'ils n'avaient pas été capturés), mais pris en compte pour apprécier l'erreur globale commise dans l'analyse.

B. Principales difficultés, interprétation.

- *Expression histologique des MCS.*

Evoquée ci-dessus cette expression dépend (i) de l'importance des variations climatiques modulant la durée et l'intensité de la croissance de l'organisme et de son squelette au cours du cycle annuel; (ii) du type histologique osseux dans lequel les MCS se mettent en place. Généralement chez les amphibiens et les lézards, les corticales diaphysaires des os longs correspondent à de l'os sous périoste primaire, peu ou pas vascularisé. Les MCS ne risquent donc pas d'être détruites par remaniement secondaire intracortical. En revanche chez les crocodiles et les tortues, principalement les espèces marines de grande taille, les corticales sont vascularisées et la formation d'ostéones secondaires

(remaniement haversien) pourra détruire tout ou partie des marques de croissance.

- *Distribution des LACs.*

La séquence spatiale des MCS, résulte en partie de la dynamique de croissance osseuse, elle même reflétant la trajectoire de croissance individuelle au cours de l'ontogenèse. Chez les jeunes, les MCS sont relativement espacées. Après, l'acquisition de la maturité sexuelle et le ralentissement de croissance qui en résulte, elles se resserreront définitivement. Loin d'être une difficulté, cette transition est au contraire informative de l'âge de première maturation sexuelle. Par ailleurs chez des espèces variées mais surtout chez des populations soumises à des conditions de vie différentes, les MCS n'auront pas la même séquence spatiale (notion de "squelettogramme" *sensu* Augert 1992). Chaque type de squelettogramme devient alors informatif des conditions environnementales de croissance des individus et de la population étudiées.

- *Remaniement endostéal.*

Au cours de la croissance, en liaison avec la dynamique de l'ostéogenèse, la région interne du tube diaphysaire qui borde la cavité médullaire, peut être partiellement ou totalement détruite (= résorption endostéale). Les MCS qui pouvaient s'y trouver seront donc éliminées. Secondairement sur cette surface osseuse résorbée un nouveau dépôt osseux peut avoir lieu. C'est l'os endostéal généralement bien séparé de l'os périostique primaire par une ligne de résorption très chromophile et distincte des LAC périodiques par son contour irrégulier. Cet os pourra aussi contenir des LACs qui seront chronologiquement analogues à celles mises en place dans l'os périostique (image en miroir, notion de chiralité). Il est clair que les LACs endostéales ne devront pas être prises en compte dans le calcul de l'âge sous peine de sur-estimer ce dernier. Si des LACs périostiques sont entièrement détruites par résorption endostéale, le risque est au contraire de sous-estimer l'âge individuel. La comparaison de la taille des premières LACs présentes chez des individus d'un an ou deux - dont l'âge est alors sans ambiguïté indiqué par la taille- avec les LACs les plus internes chez des individus âgés, permet en général de retrouver avec une bonne précision le nombre de LACs détruites par résorption endostéale (technique de rétrocalcul proposée par Leclair et Castanet 1987, fig. 2).

- Arrêt définitif de l'ostéogenèse.

Il est facile de comprendre que l'enregistrement des MCS s'arrête avec la fin de la croissance osseuse en épaisseur. Traditionnellement les amphibiens et les reptiles non aviens sont considérés comme des animaux

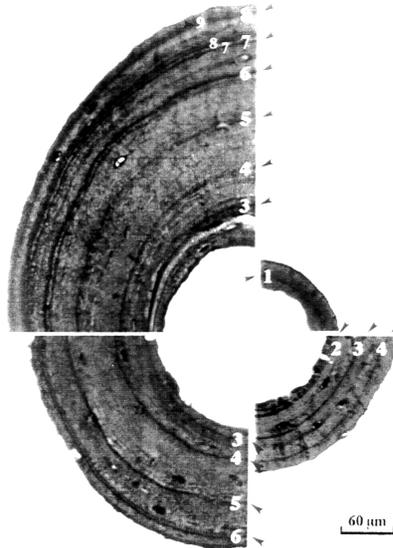


Figure 2 : Stades de croissance en épaisseur de fémurs au niveau diaphysaire. A partir de 4 individus âgés de 1 à 8-9 ans, chez *Desmognathus monticola* (Amphibien urodèle des Appalaches - Castanet *et al.* 1996 ; Bruce *et al.* 2002). Ce photomontage illustre deux des difficultés pouvant se présenter dans une analyse squelettechronologique. 1- Au cours de l'ontogenèse la résorption endostéale détruit les premières LACs déposées (2 dans ce cas chez les individus de 6 et 8-9 ans). L'estimation de l'âge réel est alors obtenue par rétrocalcul. 2- La LAC 6 et surtout la 7 tendent à se dédoubler. Doit-on compter cette dernière pour un an (il s'agirait alors d'un annulus) ou pour 2 ans, impliquant alors une ostéogénèse très faible pendant la saison active comprise entre la LAC 8-7. ?

Figure 2: Stages of growth in diaphysis cross-sections of femurs. With photographs of 4 individuals aged from 1 to 8-9 years (*Desmognathus monticola*, Amphibian, Urodela from the Appalachian Mountains - Castanet *et al.* 1996 ; Bruce *et al.* 2002), two difficulties which could be seen using the skeletochronological method are described: 1 - During ontogenesis, endosteal resorption destroys the inner LAGs (2

in individuals of 6 and 8-9 years old). Thus, exact age is estimated with retrocalculation. 2 - LAG n°6, and especially n°7 strive to divide in two lines. Does this LAGs count for one year (and is called in this case an annulus) or for two years i.e. indicating a very low bone growth during the active season separating LAGs 8-7.?

à croissance indéfinie. De fait il serait plus exact de dire que chez eux la croissance corporelle se poursuit assez longtemps après la maturité sexuelle, mais tend de façon asymptotique vers un plateau (arrêt total) qui ne serait atteint que chez les individus très âgés. Selon les espèces la croissance osseuse en épaisseur s'arrête souvent avant la fin de la croissance corporelle et de plus, tous les os d'un même individu ne finissent pas leur croissance au même âge. Cela traduit un phénomène d'allochronie de développement explicité par Castanet *et al.* (1996). En conséquence l'âge déduit du nombre de LAC risque d'être minoré mais de façon différentielle selon l'os étudié. Chez le Sphénodon par exemple, des données expérimentales ont montré que la longévité *in natura* pouvait atteindre au moins 80 ans. Hors chez des individus très grands et probablement très âgés, le nombre de LACs, dont la qualité est pourtant excellente, ne dépasse pas 38 dans le fémur et 25 dans les phalanges (Castanet *et al.* 1988). A partir de ces derniers éléments osseux, l'âge estimé a été considéré comme exact jusqu'à 20-22 ans mais comme un âge minimal pour les individus présentant plus de 22 LACs. Autrement dit, à partir des phalanges, la squelettochronologie ne permet guère chez cette espèce, d'estimer l'âge individuel réel au delà de 20-22 ans. Il y a là une limite incontournable de la méthode. En pratique cette limite est cependant variable et pas nécessairement gênante. En effet chez certains taxons, les amphibiens par exemple, il semble que l'ostéogénèse, donc l'enregistrement des LACs, se prolonge effectivement jusqu'au décès, même chez les plus vieux individus. Par ailleurs, dans les populations naturelles les individus très âgés sont rares et, sauf cas particuliers (sphénodon), le risque de sous estimer l'âge, ne portera donc que sur un nombre restreint d'animaux (quelques uns parmi les plus grands), ce qui ne modifiera pas sensiblement la structure d'âge de la population étudiée.

- LACs supplémentaires; LAC de naissance (d'éclosion); LAC de métamorphose; os embryonnaire.

La séquence spatiale des LACs n'est pas toujours régulière. Parfois, de façon aléatoire selon les os ou les individus, une LAC plus faiblement

exprimée et plus ou moins complète semble s'inscrire de manière discordante dans la séquence par ailleurs régulière des autres LACs. L'identification de telles lignes « apériodiques » (appelées pour cela LACs « supplémentaires », « surnuméraires », « additionnelles », « fausses LACs », selon les auteurs) est toujours difficile et arbitraire. Leur déterminisme sans doute multiple, conjoncturel et conjectural, reste mal connu. Cette difficulté d'identification et d'interprétation des lignes supplémentaires augmente d'ailleurs vers la périphérie des corticales osseuse alors que les LACs se resserrent beaucoup et s'inscrivent dans un os devenant de plus en plus lamellaire. C'est souvent l'hésitation sur le statut d'une ou deux LAC qui conduit à proposer une estimation de leur nombre total à ± 1 près. Heureusement, chez de nombreuses espèces d'amphibiens et dans une moindre mesure chez les lézards et les tortues terrestres, les LACS supplémentaires ne semblent présentes que chez un petit nombre d'individus, ce qui limitera d'autant l'erreur commise à l'échelle de la population. Parfois, quelques LAC apparaissent plus ou moins dédoublées entraînant là aussi une hésitation pour leur dénombrement (Fig. 2). Cependant la présence de LACs systématiquement dédoublées chez la plupart des individus d'une même population peut avoir un caractère très informatif, comme cela a été montré chez les tritons marbrés (*Triturus marmoratus*) d'altitude du Nord du Portugal. Une double période d'activité et de ralentissement annuel a été proposée pour ces tritons, ce qui a ensuite été vérifié sur le terrain (Caetano & Castanet 1985). Enfin, certaines LACs supplémentaires ont un déterminisme facile à identifier. Elles deviennent alors de précieux repères chronologiques. Il s'agit en particulier de la ligne d'éclosion et de la ligne de métamorphose.

La LAC d'éclosion, surtout observée chez les lézards (Saint Girons *et al.* 1989), est interprétée comme telle dans les os des juvéniles n'ayant pas encore hiberné. Elle est en général précédée d'une mince couronne d'os embryonnaire. Ce dernier est facilement reconnaissable à son aspect (os à fibres enchevêtrées, très chromophile, ostéocytes globuleux), y compris chez les individus adultes. Chez eux la LAC d'éclosion est immédiatement suivie de la LAC de premier hiver. Ensemble elles forment un couple central de lignes rapprochées mais distant de la LAC de second hiver. La présence, même locale, de la LAC d'éclosion chez des animaux âgés, signifie que toutes les marques de croissance sont conservées depuis la naissance. L'âge peut donc être estimé directement sans avoir recours à un rétrocalcul.

La LAC de métamorphose est décrite chez les amphibiens anoures. Sa mise en évidence nécessite l'examen des os d'individus sacrifiés quelques temps après la métamorphose mais avant la première hibernation. Comme pour la LAC d'éclosion, sa présence prévient de l'absence de destruction des premières LAC formées. En toute rigueur l'âge sera évalué à partir de la métamorphose et non depuis l'éclosion. Remarquons que chez les urodèles les phénomènes de métamorphose sont moins accentués que chez les anoures et, sauf exception (Jakob *et al.* 2002), ils ne conduisent pas à la mise en place d'une LAC particulière. En revanche des LACs se mettent en place chez les larves d'urodèles permettant ainsi de connaître la durée de l'état larvaire chez l'espèce étudiée (Castanet *et al.* 1996 ; Miaud *et al.* 2001). Cette possibilité, quoique encore non démontrée (Khonsue & Matsui 2001), existe aussi chez les espèces d'anoures dont les larves, une fois munies de membres postérieurs, peuvent subir un ou plusieurs hivers avant métamorphose (cas d'*Alytes obstetricans*).

En définitive, il est clair que les différents points évoqués doivent être pris en compte pour toute analyse squelettochronologique objective et sérieuse, ce qui correspond à un minimum de pré-requis en histologie osseuse.

IV- PERFORMANCES ET PRINCIPAUX RESULTATS DE LA SQUELETTOCHRONOLOGIE CHEZ LES AMPHIBIENS ET REPTILES NON AVIENS.

Si l'on en juge par les études déjà réalisées, c'est parmi les amphibiens que la squelettochronologie offre ses meilleurs résultats. Cela tient au fait que leurs os longs ont une structure particulièrement simple et homogène (os à fibres parallèles), qu'ils sont généralement avasculaires, que les LACs sont souvent bien contrastées et que la plupart des difficultés évoquées ci-dessus (e.g. marques supplémentaires, résorption endostéale) n'existent pas ou sont faciles à décrypter. Dans quelques taxons cependant l'analyse des marques de croissance peut s'avérer délicate. C'est le cas des urodèles pléthodontidés (Castanet *et al.* 1996 ; Bruce *et al.* 2002) chez qui l'organisation pseudo-lamellaire de l'os périostique rend les LACs difficiles à identifier. Les salamandridés en revanche offrent le plus souvent des marques de croissance parmi les plus belles rencontrées chez les tétrapodes. C'est le cas par exemple chez *Euproctus asper* (Montori 1990) ou chez *Ambystoma maculatum* (Flageole & Leclair 1992). Chez les anoures l'analyse squelettochronologique ne pose pas de problèmes

majeurs (Smirina 1994). Chez les apodes une seule étude a été publiée à ce jour (Measey 1998) mais l'absence d'os longs dans ce taxon n'est guère favorable à la méthode.

De nombreux lézards, pour les mêmes raisons que les anoures ou les urodèles, offrent également des marques de croissance assez faciles à analyser, aboutissant à des résultats dignes de confiance. La vascularisation osseuse est peu dense lorsqu'elle existe (Varanidés, Teiidés) et permet en général une bonne lecture des LACs.

Le cas du sphénodon est exceptionnel par la qualité de ses marques de croissance, bien contrastées, pratiquement concentriques et très régulières dans leur distribution spatiale (Castanet *et al.* 1988).

Chez les tortues et les crocodiles, les os sont plus ou moins abondamment vascularisés. Le remaniement haversien qui peut en résulter, ainsi que la résorption endostéale chez les individus adultes, constituent des handicaps en squelettochronologie. Chez les tortues terrestres ou d'eau douce cependant, surtout chez les espèces de taille petite ou moyenne, les LAC osseuses sont souvent de bonne qualité. Leur dénombrement peut s'effectuer sans difficulté au moins jusqu'à l'âge de la maturité sexuelle, voire plusieurs années après. Chez les formes terrestres les marques de croissance des écailles cornées peuvent être utilisées avec succès (e.g. Galbraith 1987). Elles sont généralement trop rapidement usées chez les espèces d'eau douce. Chez les tortues marines les marques de croissance existent bien dans l'os primaire, mais la vascularisation dense des corticales osseuses, le remaniement haversien et la présence d'os spongieux remanié à l'emplacement de la cavité médullaire (tendance adaptative chez les tétrapodes aquatiques), ne permettent pas dans la majorité des cas d'aboutir à des résultats précis (e. g. Zug & Glor 1998).

Une mention particulière sera faite pour les formes fossiles. Les microstructures osseuses, donc les marques de croissance, sont souvent parfaitement conservées dans les os même après des millions d'années. De fait, la squelettochronologie est tout à fait possible chez les animaux disparus. L'analyse sera dans ce cas réalisée sur des sections d'os non déminéralisé (lames minces de 80 μ m d'épaisseur environ). La principale difficulté demeure la disponibilité du matériel. Peu de travaux ont encore été réalisés chez les fossiles mais la méthode demande à être développée dans la mesure où, de façon encore plus exclusive que chez les formes actuelles, elle constitue presque le seul moyen d'accéder aux traits et conditions d'histoire de vie de ces animaux disparus (intérêt en paléo-écodémographie). Quelques résultats notables ont déjà été obtenus chez les

amphibiens (Esteban 1990, 1998), les lézards (Sander 1990 ; Castanet *et al.* 1988) mais aussi chez les dinosaures ou de nombreuses espèces présentent des marques de croissance (Reid 1990 ; Sander 1999 ; Horner *et al.* 1999, 2000).

Quels sont les attendus de la squelettochronologie ?

L'estimation de l'âge individuel est intuitivement et historiquement la première information offerte par l'analyse des marques de croissances squelettiques chez les amphibiens et chez les reptiles non aviens. Au delà de cette donnée basique, la squelettochronologie constitue, nous l'avons vu, un moyen efficace et opérationnel d'appréhender rapidement, certains aspects de la structure temporelle de l'organisme (âge, âge à maturité sexuelle, vitesse de croissance, longévité). Pour autant les performances de la squelettochronologie se révèlent pleinement lorsque elle est envisagée de façon comparative entre populations intraspécifiques, tant actuelles que fossiles, dans des perspectives adaptatives, voire évolutionnistes. C'est le cas pour ce qui concerne l'étude des stratégies de croissance et de reproduction des populations, de leur démographie (Miaud *et al.* 1999, 2000), de la plasticité phénotypique en liaison avec les conditions de vie (Augert & Joly 1993 ; Alcobendas & Castanet 2000 ; Miaud *et al.* 2001 ; Bruce *et al.* 2002), des phénomènes d'allo- et d'hétérochronies de développement (Caetano & Castanet 1993; Denoël & Joly 2000) ou encore des phénomènes de colonisation (Joly & Grolet 1996) ou de migration entre sites de reproduction (Miaud *et al.* 1993). L'analyse squelettochronologique peut également servir de critère en systématique. Par exemple la séquence spatio-temporelle des marques de croissance peut indiquer, si dans un même gisement fossilifère des os homologues proviennent d'individus de la même espèce mais de taille et d'âge différents ou au contraire appartiennent à deux espèces différentes (Castanet & Baez 1991).

Plus généralement l'estimation des traits d'histoire de vie, donc l'usage de la squelettochronologie, apparaît de première nécessité en biologie de la conservation des populations naturelles. Un exemple récent est fourni par les travaux de Buffrénil *et al.*, (1994, 1999, 2000) sur l'état des populations de varans du nil (*Varanus niloticus*) exploitées dans différents pays africains. La squelettochronologie a permis de révéler que les individus du Mali, plus petits en moyenne que ceux du Tchad, ont également une longévité plus courte et une maturité sexuelle plus précoce. Ceci laisse

supposer une pression de prédation plus forte, donc un danger plus grand pour les populations maliennes.

En conclusion on remarque que, après un longue période d'hésitation sur l'intérêt et les performances de la squelettochronologie, cette méthode présente aujourd'hui un intérêt incontestable en biologie, en particulier pour les recherches en écodémographie des populations d'amphibiens et de reptiles non aviens. Depuis ces 25 dernières années, la montée en puissance de travaux utilisant avec succès les marques de croissance dans ces taxons en est le témoignage le plus net. On peut donc considérer que dans la pratique, cette méthode a maintenant atteint sa « vitesse de croisière », même si des problèmes fondamentaux restent encore à résoudre (fonctionnement cyclique des cellules responsables de l'ostéogenèse, déterminisme de certaines LACs supplémentaires). Pour autant, l'analyse des marques de croissance ne doit pas être considérée comme une technique de simple routine. Ces structures, largement dépendantes de facteurs externes pour leur expression, font partie intégrante d'un système biologique - l'os - présentant une diversité structurale variée et multidéterminée. Des connaissances en histo-morphologie osseuse fonctionnelle, couplées et confrontées à des données précises sur la biologie et l'écologie des populations étudiées, seront donc indispensables pour obtenir des résultats dignes de confiance.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alcobendas M. & Castanet J. 2000 - Bone growth plasticity among populations of *Salamandra salamandra*: Interactions between internal and external factors. *Herpetologica*, 56: 14-26.

Augert D. 1992 - Squelettogrammes et maturations chez la grenouille rousse (*Rana temporaria* L.) dans la région de la Bresse jurassique. Dans : Tissus durs et âge individuel des vertébrés. Collection Colloques et Séminaires. Baglinière J. L., Castanet J., Conand F., & Meunier F. J. (Eds) : 385-394.

Augert D. & Joly P. - 1993 - Plasticity of age at maturity between two neighbouring populations of the common frog (*Rana temporaria* L.). *Can. J. Zool.* 71: 26-33.

Baudelot E. 1873 - Recherches sur la structure et le développement des écailles des poissons osseux. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 2: 87-244 & 429-480.

Bruce R.C., Castanet J., & Francillon-Vieillot H. 2002 - Skeletochronological analysis of variation in age structure, body size, and life history in three species of desmognathine salamanders. *Herpetologica*, in press.

- Bryuzgin V. L. 1939 - A procedure for investigating age and growth in Reptilia. *Comptes rendus (Doklady) de l'Academie des Sciences de l'URSS*, 23: 403-405.
- Buffrénil V. de, Chabanet C. & Castanet J. 1994 - Données préliminaires sur la taille, la croissance et la longévité du varan du Nil *Varanus niloticus* dans la région du lac Tchad. *Can. J. Zool.*, 72: 262-273.
- Buffrénil V. de., Castanet J. & Rimblot F. 1999 - Maturation génitale des varans du nil mâles (*Varanus niloticus*) dans trois populations du Sahel. *Can. J. Zool.*, 77: 222-232.
- Buffrénil V. de. & Castanet J. 2000 - Age estimation by skeletochronology in the Nile Monitor (*Varanus niloticus*), a highly exploited species. *J. Herpetol.*, 34: 414-424.
- Caetano M. H., Castanet J. & Francillon H. 1985 - Détermination de l'âge de *Triturus marmoratus* (Latreille 1800) du Parc National de Peneda Geres (Portugal), par squeletochronologie. *Amphibia-Reptilia*, 6: 117-132.
- Caetano M. H. & Castanet J. 1993 - Variability and microevolutionary patterns in *Triturus marmoratus* from Portugal: age, size, longevity and individual growth. *Amphibia-Reptilia*, 14: 117-129.
- Castanet J., Meunier F. & Ricqlès A. de. 1977 - L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les vertébrés poïkilothermes: données comparatives et essai de synthèse. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 111: 183-202.
- Castanet J. 1985 - La squeletochronologie chez les Reptiles. I- Résultats expérimentaux sur la signification des marques de croissance squelettiques utilisées comme critère d'âge chez les lézards et les tortues. *Ann. Sc. Nat. Zool. Paris*, 7: 23-40.
- Castanet J. & Gasc J. P. 1986 - Age individuel, longévité et cycle d'activité chez *Leposoma guianense*, microteiidé de litière de l'écosystème forestier guyanais. *Mem. Mus. Nat. Hist. Nat.*, 132: 97-107.
- Castanet J., Newman D. G. & Saint-Girons H. 1988 - Skeletochronological data on the growth, age and population structure of the tuatara, *Sphenodon punctatus*, on Stephens and Lady Alice Islands, New Zealand. *Herpetologica*, 44: 25-37.
- Castanet J. & Baez M. 1988 - Data on age and longevity in *Gallotia Galloti* (Sauria, Lacertidae) assessed by skeletochronology. *Herpetol. J.*, 1: 218-222.
- Castanet J. & Baez M. 1991 - Identificación de dos especies de lagartos de un yacimiento sub-fosil de la isla de hierro (isla Canarias) con histología osea. *Rev. Esp. Herp.*, 5: 43-49.

- Castanet J., Francillon-Vieillot H., Meunier F. J. & Ricqlès A. de. 1993 - Bone and individual aging. *In: Bone*. Vol. Bone Growth, B. K. Hall (Ed.). Boca Raton Ann Arbor Boston London, CRC Press: 245-283.
- Castanet J., Francillon-Vieillot H. & Bruce R. C. 1996 - Age estimation in Desmognathine salamanders assessed by skeletochronology. *Herpetologica*, 52: 160-171.
- Castanet J., Grandin A., Abourachid A. & Ricqlès A. de. 1996 - Expression de la dynamique de croissance dans la structure de l'os périostique chez *Anas platyrhynchos*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sci. de la vie*, 319: 301-308.
- Castanet J., Vernet R., Baez M. 1997 - Reliability of skeletochronology in lizards: experimental data for three *Gallotia* species. Third World Congress of Herpetology 2-10 August 1997 - Prague. Abstract p. 37.
- Coker R. E. 1906 - The cultivation of the diamond-back terrapin. *N. C. Geol. Surv. Bull.* 14: 1-69.
- Denoël M. & Joly P. 2000. Neotony and progenesis as two heterochronic processes involved in paedomorphosis in *Triturus alpestris* (Amphibia: Caudata). *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 267: 1481-1485.
- Duarte -Varela C. F. & Cabrera M. R. 2000 - Testing skeletochronology in black Tegú Lizards (*Tupinambis merianae*) of known Ages. *Herpetological Review*, 31: 224-226.
- Erickson G. 2001 - Assessment of longevity and growth rates of *Megalania prisca* using growth line counts. Sixty-first annual meeting , Society Vertebrate Paleontology, Bozeman, Montana. October 3-6, 2001. *J. Vert. Paleontol.*, 21: 48A.
- Esteban M. 1990 - Environmental influences on the skeletochronological record among recent and fossil frogs. *Ann. Sc. Nat. Zool. Paris*, 11: 201-204.
- Esteban M., Garcia-Paris M. & Castanet J. 1996 - Bone histology and age estimation of frogs (*Rana perezi*) from a warm temperate climate area. *Can. J. Zool.*, 74: 1914-1921.
- Esteban M., Castanet J. & Sanchiz B. 1998 - Inferring age and growth from remains of fossil and predated recent anurans: a test case using skeletochronology. *Can. J. Zool.*, 76: 1689-1695.
- Flageole S. et Leclair R. 1992 - Etude démographique d'une population de salamandres (*Ambystoma maculatum*) à l'aide de la méthode squeletochronologique. *Can. J. Zool.*, 70: 740-749.
- Galbraith D. A. & Brook S R. J. 1987 - Addition of annual growth lines in adult snapping turtles *Chelydra serpentina*. *J. Herp.*, 21: 359-363.

- Griffiths I. 1962 - Skeletal lamellae as an index of age in heterothermous tetrapods. *Ann. Mag. Nat. Hist. Ser.*, 13: 449-465.
- Hemelaar A. 1986 - Demographic study on *Bufo bufo* L. (Anura, Amphibia) from different climates, by means of skeletochronology. PhD Thesis, University of Nijmegen, (NL). 135 p.
- Horner J. R., Ricqlès A. de. et Padian K. 1999 - Variation in dinosaur skeletochronology indicators: implications for age assessment and physiology. *Paleobiology*, 25: 295-304.
- Horner J. R., Ricqlès A. de. et Padian K. 2000 - Long bone histology of the Hadrosaurid dinosaur *Maiasaura peeblesorum*: growth dynamics and physiology based on an ontogenetic series of skeletal elements. *J. Vert. Paleont.*, 20: 115-120.
- Hutton J. M. 1986. Age determination of living Nile crocodiles from the cortical stratification of bone. *Copeia*, 2: 332-334.
- Jakob C., Miaud C., Crivelli A.J. & Veith M. 2002 - Impacts of Mediterranean climate on age, growth and survival of the marbled newt (*Triturus marmoratus*). *Amphibia-Reptilia*. (in press).
- Joly P. & Grolet O. 1996 - Colonization dynamics of new ponds, and the age structure of colonizing Apline newts, *Triturus alpestris*. *Acta-Oecol.*, 17: 599-608.
- Khonsue W. & Matsui M. 2001 - Absence of lines of arrested Growth in Overwintered tadpoles of the american Bullfrog, *Rana catesbeiana* (Amphibia, Anura). *Current Herpetology*, 20: 33-37.
- Kumbar S. M. & Pancharatna K. 2001 - occurrence of growth marks in the cross section of phalanges and long bones of limbs in Tropical anurans. *Herp. Review*, 32: 165-167.
- Leclair R. & Castanet J. 1987 - A skeletochronological assesement of age and growth in the frog *Rana pipiens* Schreber (Amphibia, Anura) from southwestern Quebec. *Copeia*, 2: 361-369.
- Mattox N. T. 1935 - Annular rings in the long bones of turtles and their correlation with size. *Trans. Ill. St. Acad. Sci. USA*, 28: 255-256.
- Measey G. J. & Wilkinson M. 1998 - Lines of arrested growth in the caecilian, *Typhlonectes natans* (Amphibia: Gymnophiona). *Amphibia-Reptilia*, 19: 91-95.
- Miaud C., Joly P. & Castanet J. 1993 - Variation of age structures in a subdivided population of *Triturus cristatus*. *Can. J. Zool.*, 71: 1874-1879.

- Miaud C., Guyétant R. & Elmberg J. 1999 - Variation in life history traits in the common frog *Rana temporaria* (Amphibia: Anura) a literature review and new data from the French Alps. *J. Zool. Lond.*, 249: 61-73.
- Miaud C., Guyétant R. & Faber H. 2000 - Age, size and growth of the alpine newt, *Triturus alpestris* (Urodela, Salamandridae), at high altitude and a review of life-history trait variation throughout its range. *Herpetologica*, 56: 135-144.
- Miaud C., Andreone F., Riberon A., Michelis S. de, Climat V., Castanet J., Francillon-Vieillot H & Guyétant R. 2001 - Variations in age, size at maturity and gestation duration among two neighbouring populations of the Alpine salamander *Salamandra lanzai*. *J. Zool. Lond.*, 254: 251-260.
- Montori A. 1990 - Skeletochronological results in the pyrenean newt *Euproctus asper* (Duges, 1852) from one pre pyrenean population. *Ann. Sc. Nat. Zool. Paris*, 11: 209-211.
- Pancharatna K., Chandran S. & Kumbar S. 2000 - Phalangeal growth marks related to testis development in the frog *Rana cyanophlyctis*. *Amphibia-Reptilia*, 21: 371-379.
- Peabody F. E. 1961 - Annual growth zones in living fossil vertebrates. *J. Morph.* 108: 11-62.
- Reid R. E. H. 1990 - Zonal "Growth rings" in Dinosaurs. *Mod. Geol.*, 15: 19-48.
- Saint-Girons H. 1946 - Croissance cycle annuel et mues chez *Vipera aspis*. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 71: 198-203.
- Saint-Girons H. 1952 - Ecologie et éthologie des vipères de France. *Ann. Sc. Nat. Zool. Paris*, 14: 263-343.
- Saint-Girons H. 1965 - Les critères d'âge chez les reptiles et leurs applications à l'étude de la structure des populations sauvages. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 112: 342-358.
- Saint-Girons H., Castanet J., Bradshaw S. D. & Baron J. P. 1989 - Démographie comparée de deux populations françaises de *Lacerta viridis* (Laurenti, 1768). *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 44: 361-386.
- Sanders P. M. 1990. Skeletochronology in the small Triassic reptile *Neusticosaurus*. *Ann. Sci. Nat. Zool., Paris*, 11: 213-217.
- Sander P. M. 1999 - Life history of Tendaguru sauropods as inferred from long bone histology. *Mitt. Mus. nat. kd. Berl., Geowiss. Reihe.*, 2: 103-112.
- Senning W. C. 1940 - A study of age determination and growth of *Necturus maculosus*, based on the parasphenoid bone. *Am. J. Anat.*, 66: 483-494.

Smirina E. M. 1972 - Annual layers in bones of *Rana temporaria*. *Zool. Zh.*, 51: 1529-1534.

Smirina E. M. 1974 - Prospects of age determination by bone layers in Reptilia. *Zool. Zh.*, 53: 111-117 (en russe).

Smirina E. 1994 - Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology*. 40: 133-146.

Tucker A. D. 1997. Validation of skeletochronology to determine age of freshwater crocodiles (*Crocodylus johnstoni*). *Mar. Freshwater Res.*, 48: 343-351.

Warren J. W. 1963 - Growth zones in the skeleton of recent and fossil vertebrates. *Thèse (non publ.) Univ. of Calif., Los Angeles, USA*, 136 p.

Zug G. R., H. W. A. & Ruckdeschel C. 1986 - Age determination of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, by incremental growth marks in the skeleton. *Smithsonian Contributions Zoology*, 427: 34 p.

Zug G. R. & Glor R. E. 1998 - Estimates of age and growth in a population of green turtles (*Chelonia mydas*) from the Indian river lagoon system, Florida: a skeletochronological analysis. *Can. J. Zool.*, 76: 1497-1506.

Manuscrit accepté le 27 juin 2002

Présentation des actions de protection de la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) en Rhône-Alpes

par

Antoine CADI^{1,2}

¹ UMR CNRS 5023, Ecologie des Hydrosystèmes fluviaux, Université Claude Bernard
Lyon1, 69622 Villeurbanne Cedex (France), cadi@pop.univ-lyon1.fr

² Conservatoire Rhône-Alpes des Espaces Naturels, 2 rue des Vallières,
69390 Vourles (France)

Résumé - La tortue cistude (*Emys orbicularis*) incarne la rusticité de la faune des marécages et la bonne qualité de cet environnement. Elle fait partie des espèces remarquables qui symbolisent le patrimoine vivant des marais. Sa protection permet la préservation des habitats et des autres espèces moins spectaculaires de l'écosystème. Actuellement, il est conseillé de mettre en place une approche intégrée de la conservation associant des mesures *in situ* (dans la nature) et *ex situ* (en conditions artificielles) pour mieux comprendre le fonctionnement et assurer la pérennité des espèces menacées. C'est dans ce but que le projet de conservation de la cistude en région Rhône-Alpes associe diverses études depuis 1995.

Mots-clefs : Conservation, Rhône-Alpes (France), *Emys orbicularis*, réintroduction, compétition avec *Trachemys scripta elegans*

Summary - Presentation of the conservation plan of the European Pond Turtle (*Emys orbicularis*) in Rhône-Alpes, France. The European Pond Turtle (*Emys orbicularis*) embody the resistance of the wildlife of the swamp and the good quality of this habitat. It is part of the remarkable species that symbolize the living heritage of the marshes and of which the protection allows the preservation of habitats and other types less spectacular of this ecosystem. Currently, it is advised to set up an integrated approach of the conservation associating measures *in situ* (in the wild) and *ex situ* (in artificial conditions) for better to assure the life of the threatened species. With this aim, the project of European Pond Turtle conservation in Rhône-Alpes region associates various studies since 1995.

Key-words: Conservation, Rhône-Alpes (France), *Emys orbicularis*, reintroduction, competition with *Trachemys scripta elegans*

I. INTRODUCTION

La biologie de la conservation correspond à une approche scientifique multidisciplinaire de l'impact des activités humaines sur les écosystèmes destinée à contrer l'appauvrissement actuel de la biodiversité (Soulé 1985). Elle cherche tout d'abord à comprendre les effets de l'activité humaine sur les espèces et leurs habitats, puis de développer des solutions pratiques pour prévenir l'extinction de ces espèces. Les plans de conservation sont souvent ciblés sur des espèces populaires. Ces espèces ombrelles (Simberloff 1993) permettent ainsi la protection des habitats et des autres espèces moins spectaculaires de l'écosystème. Une approche intégrée de la conservation associant des mesures *in situ* (dans la nature) et *ex situ* (en conditions artificielles) est actuellement conseillée pour mieux comprendre le fonctionnement et assurer la pérennité des espèces menacées (Craig, 1994). Cependant, de nombreuses contraintes génétiques, comportementales ou logistiques pèsent souvent sur de telles opérations.

La cistude (*Emys orbicularis*) est une tortue aquatique d'eau douce. On la trouve dans les milieux humides à fond vaseux comme les cours d'eau lents, les étangs, les marais, les mares, les fossés, les canaux d'irrigation et les annexes fluviales à végétation aquatique abondante (Lebbononi & Chelazzi 1991 ; Servan 1988 ; Duguy & Baron 1998). Les causes de sa régression sont multiples. Il est difficile de quantifier la part de chaque facteur, qu'il soit naturel ou anthropique. Les adultes n'ont pas de prédateurs contrairement aux jeunes et aux œufs, qui sont largement affectés par les corvidés et les petits carnivores (Rollinat 1934). Mais ces prélèvements naturels (ayant toujours existés) ne semblent pas capables d'expliquer la raréfaction actuellement observée dans certaines régions.

Cette raréfaction serait un phénomène en partie historique : l'évolution du climat vers une augmentation de la pluviosité et des températures, entraînant un accroissement des surfaces boisées, pourrait être à l'origine du repli régulier de l'espèce vers le Sud depuis la fin du Würm. En effet, en France, on observe une forte régression de la Cistude dans le nord de son aire de répartition (Cheylan 1981). Cependant, il semble que la raréfaction se soit accélérée depuis le XIX^{ième} siècle, y compris dans des secteurs relativement humides. Cette accélération peut être reliée à un faisceau de facteurs d'origines anthropiques : le drainage des zones humides, l'endiguement des cours d'eau, la fragmentation du milieu, l'urbanisation, les pollutions ponctuelles ou diffuses ou le labourage des sites de ponte y contribuent probablement. Les travaux d'assainissements et d'assèchements

dans les zones humides pour l'urbanisation ou la récupération de terres agricoles entraînent une perte d'habitat conséquente. Les sites de pontes sont également détruits par certaines pratiques agricoles. Les femelles allant pondre sont écrasées sur les routes. L'usage intensif ou mal contrôlé de pesticides peut entraîner une perturbation de la chaîne trophique. Certains individus sont victimes de ramassages (pêche, promeneurs,...). Enfin, la présence de la tortue à tempes rouges pourrait être un facteur aggravant (Arvy & Servan 1998).

Inscrite à l'annexe II de la Convention de "la vie sauvage et du milieu naturel" de l'Europe (Berne 1979), à l'annexe II (espèce d'intérêt communautaire dont la conservation nécessite la désignation de zones spéciales de conservation) et IV (espèce d'intérêt communautaire qui nécessite une protection stricte) de la directive Habitat du 21/05/1992, la cistude est aujourd'hui une espèce patrimoniale reconnue.

En France, elle est totalement protégée depuis 1979 (arrêté du 24/04/1979). L'arrêté du 27/07/1993 stipule que sont interdits sur tout le territoire métropolitain : la destruction ou l'enlèvement des œufs et des nids, la destruction, la mutilation, la capture ou l'enlèvement, la naturalisation des individus et le transport, le colportage, l'utilisation, la mise en vente, la vente ou l'achat des individus, qu'ils soient vivants ou morts. L'espèce est considérée comme vulnérable, c'est à dire "en forte régression du fait de facteurs extérieurs défavorables". Son avenir est lié à l'évolution de ces facteurs défavorables.

Fort d'un capital sympathie permanent auprès du grand public et de sa place dans plusieurs conventions internationales de protection des espèces, la cistude joue aujourd'hui de plus en plus un rôle d'espèce ombrelle. Sa protection nécessite celle des zones humides qu'elle habite et des prairies sèches dans lesquelles elle pond, de leur connexion et de l'ensemble de la biodiversité qui y est rattachée. Pour ces raisons, sa présence est recherchée.

En Rhône-Alpes, les dernières observations de tortue cistude ont été réalisées en Isle Crémieu. Les efforts de plusieurs structures d'abord isolés se sont rapidement rapprochés et réunis au sein d'un réseau informel favorisant les échanges d'expériences.

Le présent article a pour objectif de présenter la complémentarité des différents travaux et l'efficacité d'un travail transversal regroupant de nombreuses structures spécialisées dans les différentes étapes de protection

de la nature. Les résultats de ces travaux seront présentés dans des publications ultérieures.

II. REPARTITION ET STATUT DE LA CISTUDE D'EUROPE EN RHONE-ALPES

Avant toute réflexion sur la conservation d'une espèce, il est nécessaire de disposer d'une carte dite de présence/absence suffisamment récente. Si cette dernière est avancée pour l'Isère (Quesada 1998), il n'en est pas de même pour les autres départements (fig. 1). En revanche, il est flagrant que la répartition de la cistude sur l'ensemble de Rhône-Alpes a diminué du XIX^{ème} au XX^{ème} siècle (Fournet 1853 ; Atlas National de la Société Herpétologique de France 1989).

Un travail de détermination et de localisation des différents génotypes présents dans le bassin RMC est en cours (collaboration CREN, Université Claude Bernard Lyon 1, EPHE Montpellier, Station Biologique de la Tour du Valat et Université de Hamburg, Pr U. Joger Allemagne). Son but est la réalisation d'une cartographie précise des deux génotypes connus dans le bassin Rhône-Méditerranée-Corse, *E. orbicularis orbicularis* et *E. orbicularis galloitalica*. Préalable à toute réflexion de conservation, cette carte est incontournable. En ce qui concerne les départements de la région Rhône-Alpes, tous les prélèvements analysés jusqu'à présent indiquent l'exclusivité de *E. orbicularis orbicularis*. En revanche, il convient de rester prudent en l'absence d'information sur les éventuelles populations de la Drôme et de l'Ardèche. De récentes analyses ont montré la présence de deux génotypes en Camargue.

III. HISTORIQUE ET MISE EN PLACE D'UN « RESEAU CISTUDE »

Depuis quelques années, plusieurs actions de conservation ont été entreprises en Région Rhône-Alpes. En 1995, le Conservatoire du Patrimoine Naturel de la Savoie propose un vaste projet de réintroduction de la cistude dans l'extrémité Sud du Lac du Bourget. A partir de 1996 et

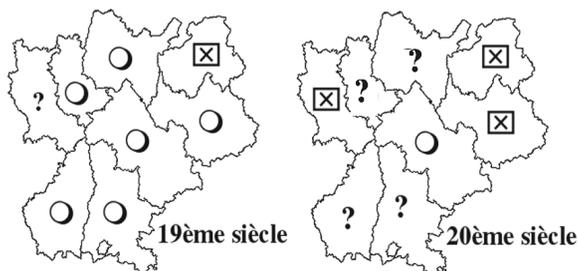


Figure 1 : Répartition de la cistude d'Europe aux 19^{ème} et 20^{ème} siècles en Rhône-Alpes (O présence, X absence, ? situation inconnue).

Figure 1: Distribution of *E. orbicularis* in the XIX and XX centuries in Rhône-Alpes Région (South-east of France) (O presence, X absence, ? unknown situation).

surtout en 1997 et 1998, les associations naturalistes Lo Parvi et Nature et Vie Sociale (représentant le Centre Ornithologique Rhône-Alpes) lancent, à la demande du Conseil Général de l'Isère, une vaste opération de prospection ayant pour objectif d'établir la répartition géographique de la cistude en Isère. En 1997, l'équipe Fonctionnement et Conservation des Populations de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (P.Joly) entreprend l'étude expérimentale des interactions entre la cistude et la tortue de Floride à la Fondation Pierre Vérots (Dombes).

Sous l'impulsion de la Direction Régionale de l'Environnement, un "Réseau Cistude" est créé en 1997. Animé par l'association « Lo Parvi », puis par le Conservatoire Rhône-Alpes des Espaces Naturels (CREN), il a pour but d'assurer la synergie des différents intervenants scientifiques (Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Pratique des Hautes Etudes de Montpellier, Station Biologique de la Tour du Valat), locaux (Conservatoires des Espaces Naturels, Réserves, FRAPNA, CORA, CSP, Fédérations de Chasseurs et de Pêcheurs, ...), administratifs et financiers (Conseils Régional et Généraux, DIREN, Agence de Bassin).

Le Réseau Cistude a deux objectifs principaux : (1) Assurer un rôle d'animation, de mise en réseau et de traduction de l'information scientifique vis-à-vis de l'ensemble des porteurs de projet concernant la cistude. (2) Animer et garantir une démarche scientifique concernant les

espèces aquatiques prioritaires de la Directive Habitat (cistude en particulier) à l'interface entre la recherche et la mise en place d'actions de gestion des habitats et de préservation des espèces. Les connaissances acquises doivent faciliter par la suite la réussite d'opérations de réintroduction et la gestion des milieux favorables à cette espèce.

Le Réseau Cistude souhaite fédérer plusieurs programmes à des stades plus ou moins avancés de réalisation.

IV. PRINCIPALES ETUDES EN COURS

A. Etudes et suivi des populations de cistudes en Isère (38)

L'étude effectuée par les associations Lo Parvi et Nature et Vie Sociale (Quesada 1998) montre que les derniers foyers connus de cistudes dans la Région Rhône-Alpes se trouvent en Nord-Isère. C'est donc sur quelques étangs sélectionnés dans ce secteur pour la concentration des observations que nous accentuons nos travaux (communes d'Arrandon et d'Optevoz).

Nous cherchons tout d'abord à connaître précisément les caractéristiques des sites d'étude (cartographie SIG des habitats à partir de la classification Corine Biotop), la structure des populations étudiées (effectifs, classes d'âge, sex ratio) et la valeur de leurs principaux paramètres démographiques (taux de mortalité, de reproduction et de dispersion). Pour cette raison, les cistudes sont capturées à l'aide de pièges spécialisés et marquées à l'aide de transpondeurs (mémoire électronique miniaturisée) et d'encoches sur la carapace (double marquage). Cette technique apporte une grande fiabilité par l'unicité et la permanence du code porté par la marque et la rapidité de sa mise en œuvre tant au moment de l'implantation de la marque qu'au moment de sa lecture. La marque est injectée dans la cavité générale et ne procure aucune gêne à l'animal.

Nous nous intéressons également à l'utilisation de l'espace et aux capacités de dispersion des tortues. Deux suivis en milieu naturel (par radio-télémetrie) sont mis en place afin de développer notre connaissance de l'utilisation de l'espace par les cistudes. Vingt individus sont suivis dans un étang isolé (10 mâles et 10 femelles) et vingt-deux dans un étang entouré d'autres zones humides (10 mâles et 12 femelles). Les suivis ont débuté en Avril 2000 et se poursuivent encore aujourd'hui au rythme d'une

localisation par jour de début Avril à fin Septembre et d'une fois par semaine de début Octobre à fin Mars.

Notre objectif, à la veille de nombreux programmes de réintroduction, est de mieux cerner l'échelle à laquelle il est nécessaire de travailler (étang, bassin versant, région). Ces travaux contribuent au perfectionnement des méthodes de gestion des milieux et à la mise au point de la méthode de suivi des individus réintroduits. Ils permettront enfin de mettre en place des protocoles de détection et d'observation standardisés.

B. Programme de Réintroduction de la cistude au Lac du Bourget

La réintroduction de la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) dans le Lac du Bourget répond à sa disparition au début du 20^{ème} siècle. Selon les directives de l'UICN (1998), ce programme s'organise en quatre étapes. Une étude de faisabilité doit permettre d'estimer les chances du projet, notamment par l'identification et l'élimination des causes d'extinction. Ensuite, une phase préparatoire est nécessaire pour constituer le stock d'individus à lâcher ou qui produiront en captivité les individus lâchés. Elle est également l'occasion de mettre en place toutes les mesures de protection assurant le maintien de la population réintroduite. L'information auprès des populations humaines locales joue lors de cette étape un rôle primordial. Puis vient la phase d'introduction proprement dite qui doit tenir compte du plus grand nombre de paramètres biologiques permettant une rentabilité maximale des lâchers en termes de rapidité et d'efficacité de la fixation, et de limitation des probabilités d'extinction de la population réintroduite. Enfin, une fois ces lâchers effectués, une phase de suivi doit être assurée afin de tirer le maximum d'informations de cette expérience à grande échelle.

Parce qu'elles ont a priori un impact direct sur le succès des futurs lâchers, les trois premières phases (faisabilité, préparation, introduction) sont souvent bien développées. Kleiman *et al.* (1994) soulignent l'importance d'une approche scientifique de la phase de préparation. Celle-ci doit comporter quatre éléments principaux : une connaissance de l'espèce candidate (démographie, comportement), une évaluation des caractéristiques d'habitat de cette espèce, une estimation des conséquences génétiques du mode de fondation envisagé, un évitement des risques de pathologie issus du passage en captivité.

Au lac du Bourget, c'est l'arrêté de protection du sud du lac qui constitue le lieu de la réintroduction : étang de 8 hectares, roselière de 5

hectares, fossés et canaux envasés, roselière lacustre littorale attendent la cistude en un réseau diversifié. Des aménagements spécifiques ont été réalisés : des “dunes de ponte”, issues de la création de l’étang dont les déblais ont été modelés en maximalisant les versants sud sur lesquels une végétation rase est entretenue, et des solariums, sur lesquels nous espérons suivre les cistudes en “bain de soleil”. Le site est par ailleurs en réserve nationale de chasse et de pêche, et le public y est strictement cantonné à deux observatoires camouflés. Sur le reste du domaine lacustre, le risque de pêche est supprimé sur les berges végétalisées où devraient se concentrer les tortues.

Une collaboration étroite entre le Conservatoire du Patrimoine Naturel de la Savoie, le Conservatoire Rhône-Alpes des Espaces Naturels et l’Université Claude Bernard Lyon 1 permet aujourd’hui d’envisager dans les meilleures conditions une étude qui n’a, à notre connaissance, jamais été menée à grande échelle pour la cistude d’Europe. Ce programme a reçu l’aval du Ministère de l’Aménagement du Territoire et de l’Environnement en 1995 sur la base d’un document répondant aux questions juridiques, biologiques, génétiques et déontologiques.

Face au problème de la définition de la “population fondatrice”, deux alternatives ont été développées : un élevage local et des captures d’adultes en nature. Les reproducteurs fondateurs de l’élevage sont issus de la dernière population rhônalpine sauvage (Isle Crémieu dans le Nord-Isère). Ces individus proviennent de pêches de sauvegarde ou ont été trouvés par des particuliers. Les animaux prélevés dans la nature sont des adultes sauvages provenant de Brenne (10 individus par an capturés 1999 à 2001). Ces dernières sont acclimatées pendant une année avant le lâcher. Parallèlement, plusieurs centres d’élevage en conditions semi-naturelles ont été mis en place afin de permettre la croissance surveillée de jeunes cistudes issues de pontes prélevées en Brenne. L’incubation s’est déroulée à l’Institut Jacques Monod (Paris) en collaboration avec C. Pieau. Le succès à l’éclosion dépasse les 95%. Cents jeunes sont ainsi hébergés par la Ferme aux Crocodiles (Pierrelatte) et cents autres sur le site même de réintroduction par le Conservatoire du Patrimoine Naturel de la Savoie dans les conditions de sécurité et de suivis sanitaires et éthologiques optimales. Le retour de 20% des jeunes ainsi obtenus sur le lieu de prélèvement limite l’impact de prélèvements effectués sur ces populations sources de façon répétée compte tenu de la forte prédation affectant les pontes dans le milieu naturel.

Depuis Mai 2000, 27 individus ont déjà été relâchés. Le suivi par radiopistage est quotidien d'Avril à Septembre et hebdomadaire les 6 autres mois. Les informations recueillies (dispersion par rapport au point de lâcher, utilisation des aménagements) sont précieuses pour la restauration des populations de cistudes dans le secteur Haut-Rhône Lavours Bourget (Miquet & Cadi, 2002) et la réalisation d'une chartre de réintroduction. Un travail de longue haleine, dont la réussite ne se mesurera que dans quelques décennies avec le succès reproducteur des individus relâchés.

C. Etude de la compétition entre la tortue à tempes rouges (*T. scripta elegans*) et la cistude

L'introduction massive de la tortue à tempes rouges, dite tortue de Floride (*Trachemys scripta*) pose le problème de la compétition avec la cistude d'Europe (*Emys orbicularis*). En effet, l'observation depuis plusieurs années de tortues à tempes rouges dans la quasi-totalité des départements métropolitains et les quelques cas de reproduction réussie montrent que cette espèce s'est acclimatée et que la naturalisation est possible. De récentes revues ou études préliminaires (Arvy & Servan 1998 ; Luiselli *et al.* 1997 ; Martinez-Silvestre *et al.* 1997) annoncent la compétition entre cet envahisseur et la tortue autochtone. La comparaison des paramètres biologiques apparaît en faveur de la tortue à tempes rouges.

Un important travail expérimental est entrepris depuis 1998 par l'Université Claude Bernard Lyon 1 en collaboration avec la Fondation Pierre Vérots (Ain). Ce travail vise à confirmer ou infirmer l'hypothèse largement répandue selon laquelle les lâchers intempestifs et diffus de tortues à tempes rouges en Europe Occidentale et particulièrement en France mettraient en péril les populations de cistude d'Europe. Il permet d'appuyer sur des arguments fondés notre réflexion sur le problème posé par l'introduction de la tortue à tempes rouges (Cadi & Joly, données non publiées). Selon leurs conclusions, ils pourront aboutir à la rédaction d'un plan d'éradication de cette espèce exotique.

Par précaution, les tortues à tempes rouges capturées sont recueillies en collaboration avec La Ferme Aux Crocodiles (Pierrelatte). Un centre de récupération est inauguré cette année sur le site de Banc Rouge (association ECATE, Ardèche). Il assure le maintien en captivité des tortues exotiques capturées dans la nature ou confiées par des particuliers.

D. Communications et sensibilisation

Parallèlement aux travaux scientifiques, de très nombreuses actions d'information et de communication sont réalisées chaque année (presse écrite ou télévisuelle, animations scolaires, conférences...) en complément des études scientifiques. Des formations (brigade verte, pompiers, gardes ONC) sont également dispensées par le CREN, les associations ECATE et Lo Parvi. Enfin, une exposition de 9 panneaux sur la biologie et de la cistude et sa conservation en Rhône-Alpes (financée par le programme « Life » Lac du Bourget et réalisée en collaboration par le CREN et le CPNS) est largement présentée.

V. INTERET DE CETTE COORDINATION

Toutes les connaissances accumulées permettront de préciser les besoins de l'espèce. Parallèlement à l'étude du fonctionnement des populations, il est aujourd'hui nécessaire d'identifier et de quantifier plus précisément les phénomènes qui l'influencent. Cette première synthèse fera notamment ressortir l'importance de la complexité du milieu (présence simultanée de sites de ponte, d'hivernation, de croissance des jeunes, de foraging et de connexions entre tous) (Cadi *et al.* in prep). Ces connaissances ne prendront un intérêt réel que lorsqu'elles seront transférées auprès des gestionnaires des différents sites et qu'elles se traduiront par la mise en place de mesures de gestion concrètes. Si des propositions peuvent être d'ors et déjà formulées, un certain nombre de pistes doivent encore être approfondies (sites de pontes artificiels, connexion entre les habitats).

La mise en place d'une stratégie globale à l'échelle de la région et le rassemblement d'approches complémentaires entre les différents partenaires du réseau doit permettre une progression rapide des connaissances nécessaires à une protection efficace de l'espèce.

Les enjeux de la protection de l'environnement, de sa gestion en interaction avec les différents acteurs du monde rural sont réels. La mise en place de connaissances précises sur les espèces sensibles des milieux concernés permet d'envisager une concertation et de la concrétiser par des mesures de gestion efficaces et comprises par tous (fermeture de berges à la pêche, changement de pratique agricole sur certains secteurs déterminants). L'espèce patrimoniale peut alors jouer pleinement son rôle : la sensibilisation de tous les acteurs devient alors une réalité.

La cistude, de part sa biologie, fait partie de ces espèces emblématiques de la cause des espèces menacées. La forte prédation naturelle à laquelle elle est soumise, sa maturité sexuelle tardive et la diversité des biotopes indispensable à sa survie en font une parfaite indicatrice de l'état de santé de nombreux écosystèmes et de la gestion des ressources naturelles. Le capital sympathie très important dont jouit cette espèce auprès du public permet en outre de fédérer un maximum d'efforts.

Remerciements - Je tiens à remercier P. Joly (Université Claude Bernard Lyon 1) pour sa collaboration, R. Quesada (association Lo Parvi), A. Miquet (Conservatoire du Patrimoine Naturel de la Savoie), M. Cheylan (EPHE Montpellier), H. Coquillart (Conservatoire Rhône-Alpes des Espaces Naturels) pour leur soutien et leurs conseils avisés. Je remercie également les membres du " Réseau Cistude " pour la confiance qu'ils m'accordent.

VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Arvy C. & Servan J. 1998 - Imminent competition between *Trachemys scripta* and *Emys orbicularis* in France. *Proceedings of The Emys Symposium, Dresden 96. Mertensiella* : 33-40.

Cheylan M. 1981 - Biologie et écologie de la tortue d'Hermann (*Testudo hermannii* Gmelin, 1789). Contribution de l'espèce à la connaissance des climats quaternaires en France. Thèse EPHE, Montpellier, 404 p.

Craig J.L. 1994 - Metapopulations, is management as flexible as nature ? *Dans* : Creative Conservation, Interactive Management of Wild and Captive Animals. Olney P.T.S., Mace G.M. & Feistner A.T.C. (Eds), Chapman et Hall, London : 50-66.

Duguy R. & Baron J.P. 1998 - La cistude d'Europe, *Emys orbicularis*, dans le Marais de Brouage (Char.-Mar.) : Cycle d'activité, thermorégulation, déplacements, reproduction et croissance. *Ann. Soc. Scie. Nat. de la Charente-Maritime*, 8 (7) : 781-803

Fournet, S. 1853 - Recherches sur la distribution et sur les modifications des caractères de quelques animaux aquatiques du bassin du Rhône. *Ann. Soc. Agric. de Lyon*, 2 : 5.

Hutchison V.H. 1979 - Thermoregulation. *In*: Turtles Perspectives and Research. Harless M. and Morlock H. (Eds) Wiley-Interscience Publication, New York: 207-243.

IUCN 1998 -IUCN guidelines for Re-introductions. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group, 20 p.

- Kleiman D.G., Stanley-Brice M.R. & Beck B.B. 1994 - Criterias for reintroductions. *In: Creative Conservation, Interactive Management of Wild and Captive Animals*. Olney P.T.S., Mace G.M. & Feistner A.T.C. (Eds), Chapman et Hall, London: 288-303.
- Lebbononi M. & Chelazzi G. 1991 - Activity patterns of *Emys orbicularis* L. (*Chelonia Emydidae*) in central Italy. *Ethol. Ecol. Evol.*, 3 : 257-268.
- Luiselli L., Capula M., Capizzi D., Filippi E., Trujillo Jesus V. & Anibaldi C., 1997 - Problems for conservation of pond turtles (*Emys orbicularis*) in Central Italy : is the introduced red-eared turtle (*Trachemys scripta*) a serious threat? *Chelonian Conserv. Biol.*, 2 (3) : 417-419.
- Martinez-Silvestre A., Soler J., Sole R., Gonzalez F.X. & Sampere X. 1997 -Nota sobre la reproduccion en condiciones naturales de la tortuga de Florida (*Trachemys scripta elegans*) en Masquefa (Cataluna, Espana). *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.*, 8 : 40-43.
- Miquet A. & Cadi A. 2002 – Réintroduction de la Cistude d'Europe en Savoie. Premier bilan (2000/2001). *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 104 : sous presse.
- Quesada R. 1998 - Plan de sauvegarde de la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) dans le département de l'Isère. *Nature et Vie Sociale & Lo Parvi*. 30 p.
- Rollinat R. 1934 - La vie des reptiles de la France centrale. Delagrave (Ed.), Paris, 337 p.
- Servan J. 1988 - La cistude d'Europe, *Emys orbicularis*, dans les étangs de Brenne, France. *Mésogée*, 48 : 91-95.
- Simberloff D. 1993 - Small and declining populations. *In: Sutherland W.J., Conservation science and action* (1993). Blackwell Science Ltd.
- Société Herpétologique de France 1989. Atlas de répartition des amphibiens et reptiles de France. SHF & Secrétariat d'État chargé de l'Environnement, Direction de la Protection de la Nature, 191 p.
- Soulé M.E. 1985 - What is conservation biology ? *Bioscience*, 35 : 325-362.

Manuscrit accepté le 20 juin 2002

Quelques observations sur la biologie des populations du Pélobate brun (*Pelobates fuscus*, Anoure).

Par

Christophe EGGERT et Robert GUYETANT

Université de Savoie,
UMR CNRS 5553 Laboratoire de Biologie des Populations d'Altitude,
73376 Le Bourget du Lac (France) eggert@univ-savoie.fr

Mots-clés : Biologie de la conservation, Anoure, *Pelobates fuscus*, Comportement, dynamique de population, dispersion, phylogéographie, ADN mitochondrial, déclin

Key-words: Conservation biology, Anura, *Pelobates fuscus*, comportement, population dynamics, dispersal, phylogeography, DNAm, decline

I. INTRODUCTION

Parmi toutes les espèces d'amphibiens de France, il a été signalé que le Pélobate brun (*Pelobates fuscus*) est probablement l'espèce la plus menacée (Dubois 1998), sa sauvegarde devant être une priorité (Lescure 1984). En effet sa disparition récente et rapide dans de nombreuses régions de France (Lescure 1984 ; Parent 1985) et son actuel déclin dans la zone ouest de son aire européenne de répartition (Eggert 2000, 2002a) sont autant de signaux alarmant concernant le statut à venir de cette espèce en France. Si des causes classiques de déclin des populations d'amphibiens ont été évoquées pour cette espèce -dégradation de l'habitat, introduction de poissons prédateurs etc. (Nöllert 1997 ; Kuzmin 1999), elles restent encore insuffisantes pour expliquer le déclin plus prononcé à l'ouest, et ce quelque fois malgré des efforts de gestion conservatoire de populations.

Dans le cadre d'un travail de thèse de doctorat, nous avons réalisé quatre années de suivi d'une des dernières populations de Lorraine, afin d'apporter des éléments supplémentaires à la connaissance du fonctionnement des populations de cette si discrète espèce. Nous

présentons ici un résumé de quelques résultats obtenus et présentés au dernier congrès Franco-Belge d'herpétologie.

II. LIEU DE L'ETUDE.

Une station fortement isolée par des infrastructures industrielles et routières abrite un complexe de 3 mares et un fossé dans lesquelles des Pélobates bruns se reproduisent. Ces mares ont plus d'une vingtaine d'années et sont le reliquat d'un réseau plus vaste, détruit progressivement par l'industrialisation de la commune de Saint-Avold. Elles sont temporaires mais ne s'assèchent pas les années les plus humides. Au niveau maximum de remplissage, la plus petite (le fossé) fait environ 20m² pour 40 cm de profondeur et la plus grande 5000m² pour 150 cm de colonne d'eau (mare 1). En 1996, la mare 1 était essentiellement colonisée par des graminées et des héliophytes (*Molinia coerulea*, *Alisma plantago*, *Juncus effusus*, *Polygonum amphibium*, etc.) sur lesquelles les Pélobates fixent leurs pontes. La mare 3 était couverte sur la moitié de sa surface par des roseaux (*Phragmites australis*), l'autre moitié étant faiblement colonisée par des héliophytes (*Polygonum amphibium*, *Alisma plantago*, etc.). Des masettes (*Typha latifolia*) couvraient quasiment toute la mare 4, alors que le fossé (mare 2), toujours trop vite asséché, montrait une végétation plus rivulaire et peu dense (*Juncus conglomeratus*, *Luzula multiflora*, etc.). Le milieu environnant proche est relativement ouvert (type lande à graminées et bruyères, avec mosaïques essentiellement de mousses, genêts, fougères, bouleaux et saules) du fait de coupes d'entretien régulières liées à la présence d'un faisceau de lignes électriques aériennes. Enfin, quelques zones plus forestières (bouleaux, hêtres, pins sylvestres) délimitent en partie le site à quelques centaines de mètres au nord et au sud des mares.

III. ETUDE DE L'UTILISATION DE L'HABITAT TERRESTRE.

Etant fousseurs, les Pélobates sont des espèces très spécialisées en terme d'habitat. Les modalités des déplacements du Pélobate brun ont été étudiées en fonction des types structuraux de végétation présents dans les espaces fréquentés. Nous avons combiné deux techniques différentes et complémentaires - le radiotracking et les poudres fluorescentes - pour mettre en évidence d'éventuelles préférences de milieux (Eggert *et al.* 1999). Des émetteurs implantables ont permis un suivi individuel sur

plusieurs semaines et les pigments fluorescents ont permis une identification très fine des trajets effectués (Eggert 2002b ; Eggert & Guyétant, *sous presse*). Il s'avère que les individus étudiés ont montré une très nette préférence pour les zones les plus ouvertes (type sable nu ou couvert de mousses) et ont évité les zones à végétation arbustive dense (type saulais). Une zone ouverte expérimentale (végétation décapée mécaniquement) s'est montrée attractive. Il apparaît néanmoins que les animaux s'éloignent que rarement des bordures végétalisées, dans les zones de sable nu. A l'échelle locale, des changements de structure de paysages peuvent donc avoir des conséquences fortes sur la dynamique des populations. Des mesures de gestions ont été prises par l'Office Nationale des Forêts afin d'éviter une fermeture trop importante du milieu, mais aussi afin de favoriser la dispersion d'individus vers de nouveaux sites de reproduction.

IV. ETUDE DES CAPACITES DE COLONISATION ET DE DISPERSION

Les dynamiques de populations d'amphibiens du paléartique montrent diverses modalités de fonctionnement : certaines espèces sont connues pour être fortement phylopatrique à leur site de naissance ou à leur précédent site de reproduction (ex. *Bufo bufo*, Reading *et al.* 1991) alors que d'autres montrent de bonne capacité à coloniser de nouvelles mares et à en changer (ex. *Bufo calamita*, Sinsch 1992). Les phénomènes d'échanges d'individus entre (sous-) populations peuvent être une partie intégrante du fonctionnement du système et avoir une importance capital pour la survie de la métapopulation (par ex. Sjogren-Gulve 1994). L'altération d'un tel fonctionnement fragilise la survie de celle ci (par ex. Hels 1999). Nous avons observé les capacités de colonisation et les patterns de dispersion en capturant dans des pièges les individus entrant sur les sites de reproduction durant deux saisons. Les « colons » se rendant dans les nouvelles mares sont distingués des « sédentaires » allant dans leur mare de naissance. Chacun est alors marqué à l'aide de transpondeurs qui permettent une identification individuelle. Les âges ont été estimés par squelettechronologie (Eggert & Guyétant 1999). Nous avons observé une dispersion qui était ni sexe-biaisée, ni âge-biaisée. Une forte proportion des adultes ne sont pas phylopatriques : en 1998 par exemple, 28.7% des mâles et 30% des femelles se sont rendu dans les nouvelles mares, c'est à dire

dans des sites nouvellement créés. Ces colons ont des tailles estimées à deux ans et à la métamorphose plus faible que les sédentaires (estimation par méthode des rétrocalculs à partir des lignes d'arrêts de croissance osseuse et également par ajustement de courbes de croissance à partir des relations âges-tailles des différents lots). Nous avons observé dans la nature que la taille à la métamorphose est fortement influencée par les densités larvaires. Nous pouvons donc supposer que les individus issus de mares à fortes densités larvaires, c'est à dire des sites où la compétition interindividuelle par interférence est forte, sont moins phylopatriques. Cette dispersion condition corporelle-dépendante et cette faible phylopatrie en général pourraient être une adaptation à l'instabilité temporelle et spatiale du succès reproducteur entre sites de reproduction. Un tel phénomène pourrait en partie expliquer les très fortes variations locales d'effectifs de populations généralement observées chez les Pélobates (par ex. Jehle *et al.* 1995 ; König & Diemer 1995).

V. ETUDE DE LA STRUCTURATION GENETIQUE DES POPULATIONS A L'ECHELLE EUROPEENNE ET DONNEES CHOROLOGIQUES.

Des séquençages d'ADN mitochondriaux (702 bases du cytochrome *b*) de 53 Pélobates issus de différents pays (France, Allemagne, Pays-Bas, Suède, Autriche, Hongrie, Serbie, Roumanie) ont permis de mettre en évidence 21 haplotypes fortement structurés géographiquement. Seul 2 haplotypes très semblables (0,14% de divergence) sont trouvés dans toute la zone ouest (France, Allemagne, Pays-Bas, Suède), c'est à dire la zone de très net déclin de l'espèce, alors que 19 autres sont trouvés plus à l'est et au sud. Les populations se sont révélées très peu polymorphes (2,4% de bases variables seulement). La réunion d'informations génétiques, paléontologiques, paléoenvironnementales et comportementales permet de supposer que les populations actuelles de la zone ouest se sont mises en place au cours de la période froide et sèche du Dryas (12 900 à 11 500 d'années), dans un environnement de type steppique et sur sols loessiques. L'évolution des paysages, sous l'influence des grands changements climatiques, semble donc avoir été un facteur majeur de la dynamique d'expansion cette espèce.

Remerciements - Cette étude a été financée par l'Office Nationale des Forêts et par Electricité de France.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dubois A. 1998 - Mapping European amphibians and reptiles: collective inquiry and scientific methodology. *Alytes*, 15 (4): 176-204.

Eggert C. 2000 - Le déclin du Pelobate brun (*Pelobates fuscus*, Amphibien Anoure) : Apport de la phylogéographie et de la dynamique de population à sa compréhension. Implications pour sa conservation. Thèse de l'Université de Savoie, 186 p.

Eggert C. 2002a - Le déclin du Pélobate brun (*Pelobates fuscus*, amphibien anoure) : De la biologie des populations à la structuration génétique. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 127(3) : sous presse.

Eggert C. 2002b - Use of fluorescent pigments and implantable transmitters to track a fossorial toad. *Herp. J.*, 12 : 69-74.

Eggert C. & Guyétant R. 1999 - Age structure of a Spadefoot Toad *Pelobates fuscus* (Pelobatidae) population. *Copeia*, 1999(4) : 1131-1134.

Eggert C. & Guyétant R. *sous presse* - Safeguard of a spadefoot toad (*Pelobates fuscus*) population: A French experience. In : Atti del Terzo Convegno Salvaguardia Anfibi. Lugano, 23-24 giugno 2000; Edizioni Cogeestre, Penne.

Eggert C., Peyret P.H.P. & Guyétant R. 1999 - Two complementary methods to study the terrestrial movements of the Spadefoot toad (*Pelobates fuscus* Laur.). In: Current Study in Herpetology (SHE), Miaud C. & Guyétant R. (Eds), Le Bourget du Lac, France : 95-97.

Hels T. 1999 - Effects of roads on amphibian populations.; Ph.D. Thesis, National Environmental Research Institute, Denmark

Jehle R., Hodl W. & Thonke A. 1995 - Structure and dynamics of central European amphibian populations: A comparison between *Triturus dobrogicus* (Amphibia, Urodela) and *Pelobates fuscus* (Amphibia, Anura). *Aust. J. Ecol.*, 20 : 362-366.

Konig H. & Diemer M. 1992 - Erfassung von Knoblauchkröten (*Pelobates fuscus*) während der Frühjahrswanderung (1987-1994) an einem Amphibienschutzzaun (Amphibia: Pelobatidae). *Fauna Flora Rheinland-Pfalz*. 7: 919-933.

Kuzmin S.L. 1999 - The amphibians of the former soviet union. Pensoft (ed.), Sofia, Moscou, 538 p.

Lescure J. 1984 - La répartition passée et actuelle des Pélobates (Amphibiens Anoures) en France. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 29 : 45-59.

Nöllert A. 1997 - *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768). In: Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe., pp. 110-111. Societas Europaea Herpetologica and Muséum National d'Histoire Naturelle (IEGB/SPN). Paris.

Parent G. 1985 - Précisions sur la répartition du Pelobate brun, *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768), en France. *Alytes*, 4 (2) : 52-60.

Reading C. J., Loman J. & Madsen T. 1991 - Breeding pond fidelity in the common toad, *Bufo bufo*. *J. Zool., Lond.*, 225 : 201-211.

Sinsch U. 1992 - Sex-biased site fidelity and orientation behaviour in reproductive natterjack toads (*B. calamita*). *Ethol. Ecol. & Evol.*, 4 : 15-32.

Sjogren-Gulve P.G. 1994 - Distribution and extinction patterns within a northern metapopulation case of the pool frog, *Rana lessonae*. *Ecology*, 75: 1357-1367.

Manuscrit accepté le 20 juin 2002

**Dix ans de suivi des populations indigènes et
introduites de grenouilles « vertes »
(*Rana (Pelophylax) ssp.*, Anura, Ranidae)
dans le bassin de la Lasne (Brabant wallon, Belgique)**

par

Christiane PERCSY⁽¹⁾ et Nicolas PERCSY⁽²⁾

⁽¹⁾12, Chemin du Bon Air, 1380 Ohain (Belgique)

⁽²⁾Institut Supérieur d'Architecture, 88 rue d'Havré, 7000 Mons (Belgique)
npercsy@hotmail.com

Résumé – Le lâcher dans la nature de grenouilles « vertes » originaires d'Europe centrale ou méridionale, voire même de l'Est du bassin méditerranéen, a pris des proportions inattendues au cours de la dernière décennie, en Brabant wallon. La survie de plusieurs de ces populations introduites ne fait aujourd'hui plus de doute. Le présent article fait un bilan précis du suivi des populations de grenouilles vertes indigènes et introduites dans le bassin de la Lasne, de 1989 à 2001. Il prouve l'implantation et l'extension rapide des grenouilles introduites dans cette région, mais aussi le maintien actuel des grenouilles vertes indigènes (*Rana kl. esculenta* et *R. lessonae*). Il jette les bases d'une étude plus approfondie des espèces présentes et de l'évolution de leurs populations, notamment grâce à l'analyse des chants par oscillogrammes.

Mots-clés : grenouilles vertes, *Rana (Pelophylax)*, analyse de chants, introduction d'espèces exotiques, suivi de populations, jardins aquatiques.

Summary – A 10-years study of native and introduced water frogs (*Pelophylax ssp.*, Anura, Ranidae) in the "Lasne" river basin (Brabant wallon, Belgium). The release in the wild of non-native water frogs, coming from central and southern Europe or even from the eastern of the Mediterranean region, has grown to an unexpected size over the past decade in Brabant wallon (Belgium). Today, there is no doubt that some of these introduced populations will survive. The present paper gives a precise account of the evolution from 1989 up to 2001 of native and introduced water frog populations in the drainage-basin of the Lasne river. The work shows the establishment and quick expansion of introduced frogs in that region and also current persistence of the native species (*Rana kl. esculenta* and *R. lessonae*). The data are basic for a further more accurate study of all present water frogs species and of the evolution of their populations, e. a. using call analysis by sonographs.

Key-words : water frogs, green frogs, *Rana (Pelophylax)*, call analysis by sonographs, introduction of alien species, population watching, aquatic gardens.

I. INTRODUCTION

L'existence de populations de grenouilles « vertes » introduites (grenouilles rieuses surtout) dans diverses régions d'Europe n'est pas un fait nouveau. Jusqu'il y a peu, les foyers d'introduction connus étaient liés à l'importation de grenouilles vivantes destinées à la consommation et parfois à l'expérimentation en laboratoire (voir par exemple, Dubois 1983 ; Neveu 1989 ; Parent 1983 ; Pagano *et al.* 1997 ; Pagano *et al.* 2001). Mais récemment, ces introductions se sont multipliées et ont pris des proportions inattendues en Brabant wallon et à Bruxelles (Percsy 1993, 1995, 1998, 2000 ; Percsy & Percsy 2000, 2001). Ce phénomène est lié à la « mode » des mares de jardins, lancée dans la région, dans les années 80, par une entreprise de jardins aquatiques à vocation internationale. Ainsi, depuis les années 90, de plus en plus de particuliers réalisent des pièces d'eau artificielles dans leur jardin et y introduisent des grenouilles de provenances diverses, le plus souvent vendues ou données par des pépiniéristes de plantes aquatiques. Ces animaux se répandent ainsi dans la nature, où ils se naturalisent. Une chronologie générale de ce phénomène est donnée par le tableau I.

Le présent article détaille plus de dix années de suivi (de 1989 à 2001) des populations de grenouilles « vertes » (au sens large : *Rana (Pelophylax) ssp.*) dans la vallée de la Lasne (Brabant wallon) et jette les bases d'une étude à plus long terme sur l'incidence qu'auront les espèces introduites sur la batrachofaune indigène de cette zone.

Précisons que les seules espèces de grenouilles vertes indigènes en Belgique sont *Rana kl. esculenta* et *R. lessonae* (Parent 1983 ; Graf *et al.* 1989).

II. ZONE CONCERNEE PAR L'ETUDE

La zone qui fait l'objet de la présente étude couvre 105 km² : il s'agit du bassin de la Lasne, limité en aval (vers l'est) à l'autoroute Bruxelles-Namur. Dans la zone étudiée, la Lasne parcourt 17 km et reçoit deux affluents principaux : le Smohain (5 km) et l'Argentine (9 km), cette dernière recevant la Maserine (8 km). L'ensemble de la zone comporte

donc plusieurs vallées, dont l'altitude varie de 46 m à 128 m, séparées par des crêtes qui atteignent 120 m à 160 m. Le paysage est typique du Brabant sablo-limoneux. Le bas-plateau limoneux est entaillé par des vallées, dont les versants mettent souvent à jour les sables de l'éocène sous-jacents.

Tableau I : Chronologie de la naturalisation des grenouilles vertes non indigènes à Bruxelles et en Brabant wallon (Belgique)

Table I: Chronology of non-native green frogs implantation in Brussels and "Brabant wallon (Belgium)

Région de Bruxelles-Capitale (160 Km²)	
1992	- Premier foyer de grenouilles rieuses naturalisées (Jette) (Percsy 2000)
1992-1997	- Augmentation des effectifs de la population ci-dessus et extension à deux sites voisins (Jette) (Percsy 2000) - Nouvelles mentions de grenouilles vertes non indigènes sur trois autres sites (Percsy 2000)
1998-2001	- Cinq nouveaux sites d'observations (Weiserbs et al. 2001)
Brabant wallon (1090 Km²)	
Début des années 80	- Premier foyer d'introduction de grenouilles vertes non indigènes, avec l'installation d'une pépinière de plantes aquatiques (« Jiffy Plant » à Limal). Des animaux se naturalisent aux alentours, mais la diffusion vers d'autres sites semble faible à cette époque, quoiqu'aucun suivi systématique n'ait eu lieu.
Fin des années 80	- D'autres pépinières aquatiques ouvrent leurs portes et les premiers lâchers dans les jardins sont constatés (détails dans le présent article)
1999-2001	- Des grenouilles vertes non indigènes sont signalées sur près de 50 sites du Brabant wallon, dans le cadre de l'élaboration de l'Atlas herpétologique wallon. Ces observations ne correspondent pas nécessairement à des populations établies (Percsy et Percsy 2000)

Les fonds de vallée sont occupés par des peupleraies et par des prairies de pâture où subsistent quelques mares. Plusieurs étangs de pisciculture ou de pêche ont été aménagés (quelques dizaines d'ares à quelques hectares) ; certains sont aujourd'hui abandonnés. Ici et là subsistent des zones humides semi-naturelles, caractérisées par des associations végétales de type aulnaie, cariçaie, roselières à phragmites, scirpes ou baldingères, ...

Les versants sont généralement boisés, tandis que le bas-plateau limoneux qui les domine est livré aux cultures.

La zone est également fortement soumise à l'urbanisation. Outre les centres villageois, des lotissements se sont insinués dans le paysage. Dans plusieurs jardins ont été créées des mares d'agrément.

Trente-cinq sites ont fait l'objet d'investigations dans cette zone, pendant la période 1989-2001. Ils sont figurés par les numéros 1 à 35 sur

les figures 1 et 2 et sont décrits dans le tableau II. Certains atteignent plusieurs hectares. Dans ce cas, le site est un complexe de mares et étangs distincts, reliés directement entre eux par des milieux favorables (zones marécageuses), sans dépasser une longueur totale de 2 km : on peut considérer, a priori, que les grenouilles vertes qui s'y trouvent forment une même population. D'autres sites, pourtant distants entre eux de moins de 2 km, n'ont pas été regroupés : soit parce que les milieux les séparant sont moins favorables aux déplacements des amphibiens, soit que leurs typologies diffèrent fortement. A ce stade de l'étude, il nous paraît intéressant de les distinguer afin de mieux suivre le maintien, l'apparition ou la disparition des diverses espèces de grenouilles vertes. La mise en évidence de populations pourra se faire ultérieurement.

Tableau II : Description des sites étudiés. Le nom attribué est celui du village ou lieu-dit le plus proche figurant sur les cartes IGN au

Table II: Description of studied sites. Names correspond to closer village or place appointed on IGN. 1/25.000 maps.

Vallée de l'Argentine

1	Gaillemarde -Jolimont	Marais et deux étangs
2	Montagne aux Néfliers	Mare forestière
3	Decellier – Gris Moulin	Complexe marécageux d'une vingtaine d'hectares avec trois étangs abandonnés, jouxtant trois étangs aménagés dans le Parc Solvay
4	Pont Cassé	Petites mares en milieu humide boisé
5	Grand Etang	Etang de pêche et bassin d'agrément voisin
6	Lac de Genval	Étang récréatif

Vallée de la Maserine

7	Ransbèche	Mares aménagées dans un golf
8	Gros Tienne	Mare de jardin
9	Trois Colonnes	Anciens bassins d'horticulture aquatique, aujourd'hui disparus

Vallée du Smohain

10	La Marache	Deux mares creusées en 1995 dans une réserve naturelle didactique
11	Aquinot	Deux étangs de pisciculture extensive peu aménagés
12	Solarium	Deux étangs aménagés et une mare
13	Champ des Vignes	Complexe de bassins d'agrément
14	Chaubrière	Mares aménagées en fond de vallée

Vallée de la Lasne

15	Plancenot	Mare de jardin
16	Plancenot	Chapelet de cinq étangs partiellement abandonnés
17	Payot	Complexe d'anciennes cressonnières et de cinq étangs, dont l'un aménagé en étang de pêche
18	Petit Maransart	Complexe de six étangs peu aménagés et d'un marais avec points d'eau récents
19	Beaumont	Deux mares de jardin
20	Couture-Saint-Germain	Etang abandonné en milieu boisé
21	Lasne	Complexe d'étangs de pisciculture intensive et de pêche
22	Le Culot	Deux mares d'agrément
23	Bois de Chapelle	Mare en clairière forestière
24	Renipont	Trois étangs aménagés et un marais avec points d'eau
25	Champ d'Al Vau	Deux mares de jardin
26	Ri Margo	Etang peu aménagé
27	Le Bêloi	Prairie marécageuse avec mares temporaires, jouxtant deux étangs de pêche et une mare de jardin
28	Bois du Héron	Deux étangs aménagés dans un parc
29	Pont de Rixensart	Etangs de pêche
30	Confluent de la Lasne et de l'Argentine	Marais avec un étang abandonné
31	Plania	Deux mares en milieu forestier
32	Grand Cortil	Complexe marécageux d'une vingtaine d'hectares, avec points d'eau et trois étangs abandonnés
33	Château de Rixensart	Trois étangs peu aménagés
34	Angoussart	Etangs forestiers partiellement aménagés
35	Rosières	Mare de prairie

A l'exception de deux propriétés privées inaccessibles à La Hulpe (dont le Domaine royal d'Argenteuil), tous les milieux semi-naturels humides de la zone ont été investigués. S'y sont ajoutés divers points d'eau artificiels (mare de jardin le plus souvent) dans lesquels des grenouilles vertes ont été entendues au hasard des prospections ou signalées par des habitants.

III. METHODE

A. Suivi général de la zone

Les 35 sites mentionnés au tableau II ont été visités plusieurs fois pendant la période 1989-2001.

Les visites ont été effectuées en mai-juin et début juillet, par conditions météorologiques favorables, en après-midi ou soirée, afin de déceler la présence ou non de grenouilles vertes (au sens large) et de tenter de

distinguer les grenouilles vertes indigènes (*Rana kl. esculenta* et *R. lessonae*) de celles qui ne le sont pas. Parfois, la repasse du chant, enregistré sur bande magnétique, a été faite pour provoquer la réponse de grenouilles éventuellement présentes. Le chant a été écouté attentivement et comparé sur place aux enregistrements de Roché (1997) et/ou Carrière & Lessure (1999). Les individus ont, si possible, été observés aux jumelles et certains capturés. Lorsque nous avons pu rencontrer le propriétaire des lieux, nous l'avons interrogé sur l'origine des grenouilles présentes. Les informations recueillies ont été consignées sur des fiches par site, reprenant :

- la morphologie des individus observés, suivant les critères classiquement avancés pour le groupe *R. ridibunda-esculenta-lessonae* (Berger 1966) : taille de l'animal et pattern, proportions des pattes, taille du tubercule métatarsien, couleur des sacs vocaux. Toutefois, il n'y a pas eu de mesures morphométriques précises ;

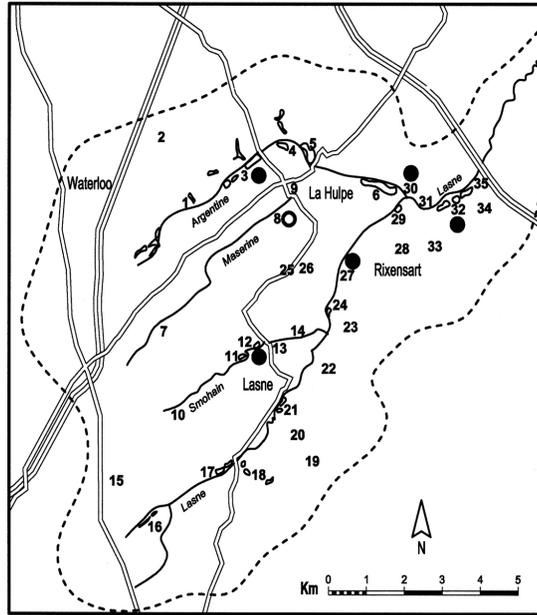


Figure 1 : Zone d'étude (bassin de la Lasne) et des 35 sites prospectés numérotés. Données de la période 1989-1991 (C. et N. Percsy). Pointillés : lignes de crête

délimitant le bassin hydrographique de la Lasne ; Grenouilles vertes indigènes (*Rana kl. esculenta* et *R. lessonae*) ; ◦ Grenouilles vertes introduites.

Figure 1: Studied area (bassin de Lasne) and prospected sites (number 1 to 35). Data from 1989 to 1991 (C. et N. Percsy). Dotted line : limits of hydrogeographic basin of the Lasne river; Native water frogs (*Rana kl. esculenta* et *R. lessonae*) ; ◦ introduced water frogs.

- une description des caractéristiques du chant (durée, nombre de notes, rythme) en comparaison avec les enregistrements de Roché (1997) et de Carrière & Lescure (1999) ;
- les informations recueillies auprès du propriétaire.

Suivi approfondi de certains sites

Sur 5 des 35 sites, outre les relevés mentionnés en A, nous avons collecté les données suivantes :

- nombre de mâles chanteurs à l'occasion de plusieurs visites dans la saison. Ceci a été effectué dès 1992 sur quelques sites ;
- en 2001, prise de photos rapprochées et enregistrement numérique de chants à l'aide d'un micro directionnel.

Dans la mesure du possible, la photo et le chant du même individu ont été pris. Les enregistrements de chants font l'objet d'une analyse, notamment par oscillogramme, grâce au logiciel Praat 4.0.2, de Boersma & Weenink (2001) ; ils sont confrontés aux résultats de Carrière & Lescure (1999), Carrière (1999) ainsi qu'à d'autres enregistrements disponibles.

IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS

A. Provenance des espèces

Nos enquêtes auprès des habitants ou propriétaires des sites occupés par des grenouilles exotiques (dans la zone étudiée ici et ailleurs dans le Brabant wallon) montrent la difficulté d'identifier l'origine des animaux introduits. Outre des importations directes, provenant généralement d'Europe centrale ou orientale, des adultes, têtards ou oeufs voyagent parfois avec des livraisons de plantes aquatiques ou de poissons d'agrément ... quand ils ne sont pas ramenés comme « souvenir » de vacances par les particuliers ! Des provenances possibles du sud de la France et d'Espagne nous ont été citées.

Dans la zone considérée ici, la provenance des grenouilles a pu être plus ou moins cernée pour quatre sites.

Sur le site n° 9 – Trois Colonnes, des pontes de grenouilles auraient été ramenées du « Midi », sans plus de précision.

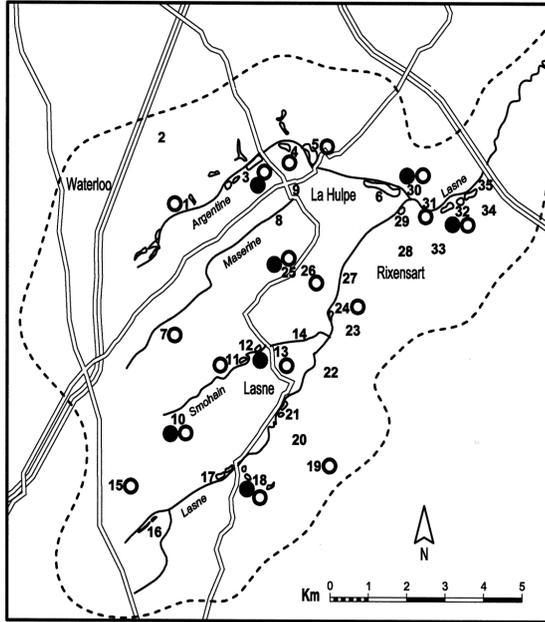


Figure 2 : Zone d'étude (bassin de la Lasne) et des 35 sites prospectés numérotés. Données de la période 1999-2001 (C. et N. Percsy). Pointillés : lignes de crête délimitant le bassin hydrographique de la Lasne ; Grenouilles vertes indigènes (*Rana kl. esculenta* et *R. lessonae*) ; ◦ Grenouilles vertes introduites.

Figure 2: Studied area (bassin de Lasne) and prospected sites (number 1 to 35). Data from 1999 to 2001 (C. et N. Percsy). Dotted line : limits of hydrogeographic basin of the Lasne river; Native water frogs (*Rana kl. esculenta* et *R. lessonae*) ; ◦ introduced water frogs.

Sur le site n° 13 – Champ des Vignes et sur l'une des mares du site n° 19 - Beaumont, les animaux proviennent d'une pépinière de plantes

aquatiques qui succède à la société « Jiffy Plant » : il s'agit d'une population « descendant » de grenouilles vertes introduites vers 1980 (voir tableau I). Une origine citée pour celles-ci est la région du Danube ; mais d'autres amphibiens (têtards de grenouilles taureau, rainettes, sonneurs et alytes) y auraient aussi été introduits à l'époque, ce qui indiquerait des filiales d'approvisionnement spécialisées.

Les grenouilles de la seconde mare du site n° 19 – Beaumont proviennent d'une animalerie. Une grenouille oxhyrine (*R. arvalis*) introduite survit aussi dans ce bassin de jardin !

Enfin, les animaux lâchés sur le site n° 26 – Ri Margo proviennent d'un laboratoire de l'Université Catholique de Louvain. Ils ont été importés, en octobre 1997, du Centre d'Elevage d'Animaux de Laboratoire à Ardenay (France). Ce centre s'approvisionne auprès d'un éleveur de Charente. Lorsque celui-ci n'a pas assez de grenouilles dans ses étangs, il en fait venir d'Europe de l'Est !

B. Détermination des espèces

La détermination des espèces de grenouilles vertes sur le terrain est délicate (Pagano & Joly 1999 ; Lodé & Pagano 2000), certains diront impossible. Néanmoins, dans le cas présent, les observations effectuées sur base conjointe du chant et de la morphologie (comme décrit plus haut) nous permettent de distinguer les espèces indigènes des espèces introduites. Cette conviction repose d'une part, sur l'expérience de terrain des auteurs qui ont observé, en Belgique, le groupe *Rana* kl. *esculenta* et *R. lessonae* avant l'apparition d'animaux introduits, d'autre part, sur le fait que la morphologie et le chant des grenouilles exotiques diffèrent notablement de ceux des deux espèces indigènes.

De plus, l'analyse par oscillogramme des chants enregistrés en 2001 renforce la validité des identifications faites. A titre d'exemple, l'oscillogramme de la figure 3.A, provenant du chant d'un individu identifié sur le terrain comme *R. kl. esculenta*, correspond bien à celui que Carrière (1999) attribue à cette espèce. Les grenouilles exotiques rencontrées dans la zone ont le plus souvent un chant dit de type 2 dans Carrière et Lescure (1999) et Carrière (1999) : voir figure 3.B. Un tel chant est attribué par Roché (1997) à *R. grafi*, mais ceci reste à confirmer. Notons que des chants de type « *ridibunda* » (type 1 dans Carrière & Lescure 1999) et de type « *bedriagae* » ont été enregistrés par les auteurs à une dizaine de kilomètres en dehors de la zone étudiée. L'apparition de *R.*

bedriagae serait consécutive à la mise en vente de grenouilles en provenance d’Egypte, dans des animaleries (Kok *et al.* 2001).

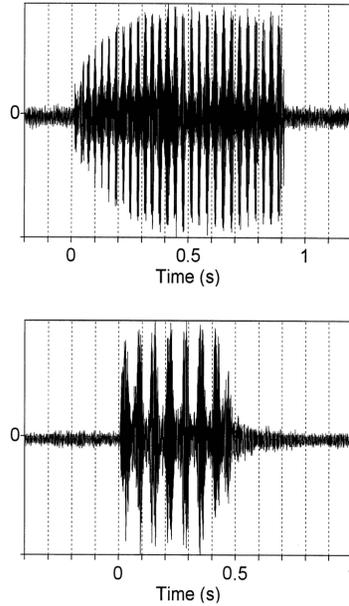


Figure 3 : Oscillogrammes obtenus à l’aide du logiciel Praat 4.0.2 (Boersma & Weenink 2001) à partir de chants enregistrés en numérique sur DAT. **A. en haut** : site 30, le 20/06/2001 à 18 h, température 20 à 24 °C ; chant dit de type 4 et attribué à *R. kl. esculenta* dans Carrière (1999). **B. en bas** : site 10, le 26/06/2001 à 21h, température 20 à 24 °C ; chant dit de type 2 et attribué sans certitude à *R. grafi* dans Carrière 1999.

Figure 3: Oscillograms obtained with Praat 4.0.2 software (Boersma & Weenink 2001) from DAT call recordings. A above: site 30, 06-20-2002, temperature 20-24 C°, type 4 call ascribed to *R. kl. esculenta* in Carrière (1999). B below: site 10, site 30, 06-26-2002, temperature 20-24 C°, type 2 call ascribed to *R. grafi* in Carrière (1999).

Aujourd’hui, 18 sites sont occupés par des grenouilles vertes, dont 7 par *R. kl. esculenta* et *R. lessonae*, 17 par des grenouilles exotiques, les deux groupes coexistant sur 6 sites (figure 2). Les grenouilles indigènes se

reproduisent de manière certaine dans 4 sites et les espèces exotiques dans 10 !

C. Comparaison des distributions pendant les périodes 1989-1991 et 1999-2001

En 1988, nous avons entendu les premières grenouilles vertes exotiques (probablement *R. ridibunda*) dans une mare de jardin (site 25). Elles ont disparu dès l'été suivant.

De 1989 à 1991, nous avons alors prospecté l'ensemble des 35 sites mentionnés sur la carte A. Une seule grenouille verte non indigène a été trouvée durant cette période (site 8, en 1989). Des exemplaires isolés de *R. kl. esculenta* et *R. lessonae* ont été observés sur les sites 12 et 27, tandis que des populations de faible effectif existaient en 3, 30 et 32. Notons qu'il nous a été rapporté que des grenouilles vertes (sans doute indigènes) existaient en 1982 sur le site 18. La situation 1989-1991 est résumée par la figure 1.

En 1992 est découvert le premier foyer important de grenouilles vertes non indigènes dans les bassins d'une horticulture aquatique (site 9). Ce foyer est à l'origine de la colonisation de plusieurs lieux dans la zone étudiée (Percsy 1995). Les bassins ont été détruits quelques années plus tard.

La période 1999-2001 nous a permis de mettre en évidence 18 sites occupés par des grenouilles vertes, dont 17 renferment des espèces introduites. Des grenouilles indigènes subsistent sur les sites 3, 12, 30, 32 où elles étaient déjà observées en 1989-1991 ; elles ont disparu du site 27. Par contre, elles sont apparues sur deux points d'eau récemment creusés (sites 10 et 18) et un individu erratique a séjourné en 25. Cette situation est résumée par la figure 2.

L'extension prise par les grenouilles introduites est donc évident. Pour le moment, elles ne portent pas un préjudice visible aux populations indigènes existantes.

D. Evolution des populations sur quelques sites

Site n° 10 – La Marache

Deux mares ont été creusées dans cette petite zone humide en 1995. En 1997 et 1998, un chanteur de grenouille exotique est repéré. En 2000, nous comptons 5 grenouilles exotiques et une grenouille attribuée à l'espèce *R. kl. esculenta* (morphologie et chant). En 2001, 18 grenouilles vertes sont

présentes, dont au moins 2 chanteurs *esculenta* et plusieurs exotiques (cf. fig 3.B).

Site n° 26 – Ri Margo

Ce site ne renfermait pas de grenouilles vertes. En mai 1998, quelques dizaines de grenouilles vertes indéterminées sont lâchées, provenant d'un laboratoire de l'Université Catholique de Louvain (voir point A plus haut). La population du Ri Margo semble avoir décliné en 2001.

Site n° 30 – Le Confluent

Des comptages répétés de mâles chanteurs indiquent une population stable de *R. kl. esculenta* de 1992 à 1995 (3 ou 4 chanteurs simultanés).

En 1995 est repéré un premier chanteur exotique.

En 2001, 8 grenouilles de type *R. kl. esculenta* (cf. fig. 1.A) et plus de 4 exotiques (dont le type présenté à la fig. 3.B) sont dénombrés.

V. CONCLUSIONS

Le travail effectué ci-dessus démontre clairement que la naturalisation de grenouilles vertes non indigènes est effective dans la zone et que les populations s'étendent.

Pour prendre toute sa valeur, ce travail devrait être complété par une détermination précise des espèces présentes par analyse du polymorphisme des protéines ou de l'ADN.

A l'avenir, un suivi global des populations de la zone sera fait, mais, surtout, une étude plus poussée aura lieu dans des sites où *Rana kl. esculenta* et *R. lessonae* cohabitent avec des espèces exotiques. Sur un des sites, on peut également espérer constater l'impact des introductions sur d'autres espèces d'amphibiens (*Rana temporaria*, *Triturus alpestris* et *T. vulgaris*).

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Berger L. 1966. Biometrical studies on the population of green frogs from the environs of Poznan. *Zoologica Poloniae*, 23 : 303-323.

Boersma P. & Weenink D. 2001 – Praat 4.0.2, a system for doing phonetics by computer. www.praat.org. Logiciel.

Carrière M. 1999 – Contribution à l'étude des Grenouilles vertes de Poitou-Charente et Vendée. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 92 : 29-44.

Carrière M. & Lescure J. 1999 – Contribution à l'étude des grenouilles vertes par leurs chants. Guide sonore (document de travail). A.I.R.E. et S.H.F. Taillebourg et Paris. CD audio, 22 min.

Dubois A. 1983 - A propos des cuisses de grenouilles. *Alytes*, 2 (3) : 69-111.

Graf J.-D., & Polls-Pelaz M. 1989. Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. In: *Evolution and ecology of unisexual vertebrates* (Dawley R.M., Bogart J.P., eds). New York State Museum Publications, Albany, 289-302.

Kok P., Jooris R., Lenglet G. & Percsy C. 2001 – Danger pour la faune indigène de l'introduction d'espèces animales à des fins ornementales : *Rana bedriagae* (*Amphibia ;Ranidae*), un cas d'école. Poster pour le Symposium « Faune belge : état des lieux et tendances observées, avec une attention particulière pour les espèces exotiques. » Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelles, 14 décembre 2001.

Lodé T., & Pagano A. 2000. Variations in courtship call and morphology in male water frogs : taxonomic and evolutionary implications. *CR Biologies*, 323 : 995-1001.

Neveu A. 1989 - *Rana esculenta* – *Rana lessonae*. Dans : Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles de France. Castanet J. & Guyétant R., p. 87. Société herpétologique de France. Paris. 192 p.

Pagano A., Crochet P.-A., Graf J.-D., Joly P., & Lodé T. 2001. Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Global Ecol. and Biogeogr.*, 10 : 433-442.

Pagano A., Joly P. 1999. Limits of the morphometric method for field identification of water frogs. *Alytes*, 16 : 130-138.

Pagano A., Joly P., & Hotz H. 1997. Taxonomic composition and genetic variation of water frogs in the mid-Rhône flood plaine. *CR Biologies*, 320 : 759-766.

Parent G. H. 1983 - Animaux menacés de Wallonie : protégeons nos batraciens et reptiles. Duculot et Région wallonne, Jambes. 172 p.

Percsy C. 1993 - Grenouilles vertes, introductions et troubles de voisinage. *Feuille de contact Aves*, 4/93 : 157.

Percsy C. 1995 - La protection de l'herpétofaune en Belgique francophone : deux exemples concrets. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 73/74 : 52-55.

Percsy C. 1998 - Amphibiens et reptiles en Région de Bruxelles-Capitale : bilan de six années de suivi. Dans : Qualité de l'Environnement et Biodiversité en Région de Bruxelles-Capitale. Document de travail de l'Institut des Sciences Naturelles de Belgique 93, pp. 101-106. Bruxelles. 185 p.

Percy C. 2000 - Etude et protection de l'herpétofaune d'une grande ville : l'exemple de Bruxelles. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 93 : 21-26.

Percy C. et Percy N. 2000 - Les grenouilles « vertes » en Brabant wallon : évolution des populations indigènes et introduites. Poster présenté au Colloque « Inventaire et suivi de la biodiversité en Région wallonne. Suivi de l'état de l'environnement wallon par bioindicateurs. » D.G.R.N.E. (Ministère de la Région wallonne), Wépion – Namur, 24-25 mars 2000.

Percy C. et Percy N. 2001 - Evolution des populations indigènes et introduites de grenouilles « vertes » en Brabant wallon. Exposé au Symposium « Faune belge : état des lieux et tendances observées, avec une attention particulière pour les espèces exotiques. » Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelles, 14 décembre 2001.

Roché J. C. 1997 – Au Pays des grenouilles. Guide sonore. Sitelle. Le Verdier. CD audio, 73 min.

Weiserbs A. et Jacob J.-P. 2001 – Résultats provisoires de l'Atlas de Bruxelles (Belgique). Poster présenté au Colloque franco-belge d'Herpétologie, 30^{ème} Colloque de la S.H.F. Virton, 6-8 juillet 2001.

Manuscrit accepté le 2 octobre 2002

Résumés de Diplômes et Thèses

Ce travail de thèse est une contribution à la biologie évolutive des salamandres terrestres d'Europe. L'analyse d'une large portion du gène mitochondrial du cytochrome *b* a permis d'obtenir une phylogénie robuste des espèces du genre *Salamandra* mettant en évidence 2 clades : l'un regroupant *Salamandra lanzai*, *S. atra* et *S. corsica* dont le statut taxonomique était jusqu'à présent incertain ; l'autre clade est formé par les différentes sous-espèces continentales de *S. salamandra*. La diversification du genre s'est déroulée en 2 temps : mise en place des 4 principales espèces il y a environ 10 millions d'années puis des subséciations liées aux événements climatiques du pléistocène. La phylogéographie comparée de *S. atra* (22 individus provenant de 13 populations) et *S. lanzai* (44 individus provenant de 12 populations) a également été réalisée à partir de l'analyse de séquences du cytochrome *b*. Aucune variation n'a pu être détectée chez *S. lanzai*, ce qui suggère que cette espèce a subi de forts goulets d'étranglement dans un récent passé. Par contre, *S. atra* présente une nette structuration surtout au niveau des populations en marge de son aire de répartition. L'étude de la dispersion chez l'espèce *S. lanzai* par des méthodes directes (suivi de 554 salamandres par capture-marquage-recapture et 13 par radiotélémétrie) n'a pas permis de mettre en évidence un flux de gènes contemporain entre les populations. En outre, les déplacements des individus au sein des populations sont très réduits (10 m) et les mâles comme les femelles montrent une forte fidélité inter et intra-annuelle à un site donné. L'emploi de marqueurs moléculaires AFLP indique chez *S. lanzai* une absence de diversité génétique au sein des populations et une faible variabilité génétique entre les populations (0,5 %) alors que chez *S. atra* la variabilité génétique intra-population est d'environ 2 % et dépasse 11 % entre les populations. La faible variabilité génétique est à opposer à la forte plasticité de certains traits d'histoire de vie, observée au sein de *S. lanzai*. Ainsi, une forte plasticité phénotypique pourrait pallier la faiblesse de la diversité génétique et donc participer grandement au maintien de l'espèce.

Diplôme de Doctorat de l'Université de Savoie, UMR CNRS 5553 Laboratoire de Biologie des Populations d'Altitude, 73 376 Le Bourget du Lac, France, directeurs : C. Miaud & R. Guyétant, 110 p.

Résumé communiqué par l'auteur

DENOËL Mathieu, 2001 - Avantages sélectifs d'un phénotype hétérochronique. Eco-éthologie des populations pédomorphiques du Triton alpestre, *Triturus alpestris* (Amphibia, Caudata).

L'hétérochronie concerne les changements de chronologie ou de vitesse relative d'apparition de processus développementaux entre un ancêtre et son descendant. La modification de la structure des espèces peut être marquée sans pour autant entraîner de larges changements au niveau génétique. L'hétérochronie est ainsi considérée comme importante dans les processus macro-évolutifs. Une voie de validation de cette hypothèse est de rendre compte du caractère adaptatif de l'hétérochronie au niveau micro-évolutif. L'étude relève ainsi de la plasticité phénotypique au sein d'une même espèce.

De nombreuses espèces d'amphibiens urodèles présentent un cycle de vie complexe, incluant une vie aquatique et terrestre séparée par une métamorphose. Cependant, certaines espèces ou individus ont opté pour une vie aquatique sans se transformer complètement. Il s'agit d'un processus hétérochronique dénommé pédomorphose (néoténie, au sens descriptif du terme). Les larves deviennent ainsi adultes tout en gardant des attributs larvaires comme les fentes branchiales.

Le triton alpestre (*Triturus alpestris*) est une espèce d'urodèle répandue sur presque toute l'Europe et occupant des milieux diversifiés. Certaines de ces populations contiennent les deux phénotypes adultes : les pédomorphes aux attributs larvaires et les métamorphes. La pédomorphose est alors dénommée facultative. Ces populations constituent des modèles de choix pour l'étude de la signification adaptative de la pédomorphose. En effet, les comparaisons de succès entre les deux formes peuvent ainsi se faire sur des animaux au passé évolutif identique et confrontés, d'une manière globale, à un même environnement.

Les différents aspects de l'écologie et de l'éthologie des tritons alpestres provenant de telles populations mixtes ont ainsi été étudiés afin de mettre en évidence l'étendue des coûts et bénéfices des phénotypes alternatifs. La thèse repose sur l'analyse de cinq thèmes principaux : le suivi des populations et les caractéristiques de leur habitat et de leur localisation géographique, l'utilisation des ressources trophiques et spatiales ainsi que les performances prédatrices, les structures d'âge et de taille ainsi que le suivi longitudinal d'animaux marqués, les interactions sexuelles en présence et en absence de compétiteurs et l'influence de différentes variables environnementales : l'assèchement, la disponibilité en nourriture et la densité. Ce travail repose sur des observations et prélèvements de terrain, des analyses de laboratoire et des expériences en environnement contrôlé. La pédomorphose étant un processus complexe dépendant de facteurs génétiques et environnementaux, plusieurs populations situées en France, en Italie et en Grèce ont été suivies.

Les avantages pouvant favoriser la pédomorphose dans les populations naturelles du triton alpestre sont multiples mais pas toujours identiques d'un habitat à l'autre. Ils peuvent ainsi expliquer la présence de pédomorphes dans une grande gamme de points d'eau allant de la petite mare temporaire de moyenne altitude au grand lac alpin. Cependant l'ensemble des populations pédomorphiques sont cantonnées au sud de l'Europe, laissant suggérer qu'une base génétique est nécessaire à l'expression de la pédomorphose. Dans des milieux aquatiques profonds, pédomorphes et métamorphes se partagent les ressources spatiales et alimentaires. Leurs caractéristiques morpho-fonctionnelles leur procurent des

performances variées dépendant du type de proie. Les deux formes sont avantagées, chacune étant spécialisée sur des ressources particulières. Dans des milieux de taille réduite, les pédomorphes peuvent acquérir la maturité sexuelle une à plusieurs années avant les métamorphes. Un tel processus progénétique peut rapidement augmenter la taille des populations. Dans d'autres sites, les deux formes ont des structures d'âge similaires (processus néoténique). Quoique présentant un aspect larvaire, les pédomorphes sont aptes à la reproduction et autant sélectionnés que les métamorphes lors de rencontres hétérotypiques. Enfin, les pédomorphes peuvent réagir à des modifications de leur environnement en changeant d'habitat, moyennant éventuellement une métamorphose.

Diplôme de Doctorat de l'Université de Liège, Laboratoire d'Ethologie des Poissons et Amphibiens, Département des Sciences de la Vie, 22 Quai Van Beneden, 4020 Liège (Belgique), 214 p.

Résumé communiqué par l'auteur

Frédéric LAGARDE, 2001 - Divergences sexuelles dans les stratégies d'histoire de vie de la tortue des steppes (*Testudo horsfieldi*).

Les divergences sexuelles dans les stratégies d'histoire de vie ont été étudiées chez la Tortue d'horsfield, *Testudo horsfieldi*. La population étudiée, localisée dans le "Djeiron Eocenter", en Ouzbékistan, comprend 863 individus marqués.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux phénomènes de croissance, de maturation et au dimorphisme sexuel de taille et de structure. Les femelles adultes sont plus grandes que les mâles (14 cm vs 11 cm). Ce dimorphisme sexuel de taille en faveur des femelles s'explique par une croissance juvénile plus longue entraînant une maturation plus tardive des femelles (12 ans) par rapport aux mâles (10 ans). De fortes variations inter-individuelles dans les patterns de croissance et de maturation apparaissent au sein de chaque sexe. Les individus présentant les vitesses de croissance juvénile les plus rapides atteignent la maturité plus précocement et à une taille corporelle plus faible que les individus présentant une croissance juvénile lente. Ces derniers sont susceptibles de compenser les pertes en opportunités de reproduction grâce aux bénéfices associés à une plus grande taille corporelle. Le dimorphisme sexuel de structure observé chez *Testudo horsfieldi* résulte de contextes sélectifs différents entre mâles et femelles. Sous l'effet de la sélection sexuelle, les mâles développent de façon privilégiée les structures intervenant dans les fonctions de parade, de combat ou de prospection du territoire. Les femelles, sous l'effet de la sélection pour la fécondité, développent les structures contribuant à l'augmentation du volume abdominal et donc de la place disponible pour les oeufs. Ces hypothèses simples proposées pour la première fois comme cadre explicatif au dimorphisme de structure chez les Chéloniens, est vérifié sur d'autres espèces de tortues, terrestres et dulçaquicoles (*Testudo hermanni*, *Emys orbicularis*, *Chelodina longicollis*).

Nous avons ensuite étudié l'organisation temporelle des comportements, l'écologie alimentaire, l'utilisation de l'espace, la fécondité, et l'écophysiologie de cette espèce à l'aide de techniques diversifiées (captures-marquages-recaptures, études comportementales, radio-téléométrie, radiographie des femelles, dosages plasmatiques). Nos résultats fournissent la première description précise du cycle d'activité de *Testudo*

horsfieldi et des divergences écologiques des mâles et des femelles. Les mâles et les femelles sont capables de réaliser l'ensemble de leur cycle d'activité en 3 mois seulement (mars à juin), période correspondant à la phase végétative des plantes annuelles base de leur alimentation. Au cours de la saison des appariements (de mars à mi avril) et de la saison des pontes (de mi avril à mi juin), l'organisation chronologique des divers comportements et le mode d'occupation de l'espace est spécifique à chaque sexe.

Le cadre théorique de l'écologie évolutive nous a permis d'interpréter les stratégies d'acquisition et d'allocation des ressources des mâles et des femelles de cette espèce ectotherme herbivore limitée par le temps.

Diplôme de Doctorat de l'Université de La Rochelle, sous la direction de Guy Naulleau,
Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS
79360 Villiers en Bois

Résumé communiqué par l'auteur