
2024

RAPPORT FINAL

Mise à jour de la répartition des nouvelles espèces d'amphibiens et de reptiles présentes en France hexagonale

RÉDACTION :

AUDREY TROCHET (SHF)

VINCENT DUBUT (ADENEKO)

PIERRE-ANDRÉ CROCHET (CEFE MONTPELLIER)

CHRISTOPHE DUFRESNES (MNHN)



SOMMAIRE

- page 3.** Contexte
- page 4.** Axes de travail
- page 5.** Espèces cibles
- page 7.** Protocole de prélèvement
- page 8.** Mutualisation des données
- page 9.** Localisation des prélèvements
- page 16.** Analyses génétiques
- page 19.** Résultats
- page 32.** Discussion et perspectives
- page 33.** Bibliographie
- page 34.** Remerciements

AMÉLIORER NOS CONNAISSANCES

pour disposer des éléments nécessaires à de nombreuses stratégies de conservation et d'aménagement du territoire est un enjeu majeur. Les espèces d'amphibiens et de reptiles sont directement concernées puisque toutes sont protégées par la loi française (arrêté du 8 janvier 2021) et 16 sont actuellement considérées comme menacées d'après l'UICN (Liste Rouge de France métropolitaine, 2015).



Après de longues années de stabilité, la taxonomie des reptiles et amphibiens d'Europe est actuellement en proie à des changements rapides, grâce à l'amélioration des connaissances sur l'histoire évolutive de ces organismes qu'a permis la révolution de la génétique, puis de la phylogénie et la phylogénomique. Cette révolution n'épargne pas la France, où plusieurs espèces « nouvelles » ont récemment été révélées sur le territoire.

De plus, même lorsque la présence de nouvelles espèces sur notre territoire est avérée, nous en cernons souvent mal la distribution. Nous avons donc encore de nombreuses lacunes de connaissances, en particulier concernant la répartition précise des espèces récemment reconnues. Le comblement de ces lacunes aurait un impact important pour i) définir la responsabilité de la France et des régions concernées vis-à-vis de leur conservation et ii) évaluer leur statut dans le cadre de l'élaboration des Listes Rouges (nationale et régionales) et des rapportages nationaux et internationaux.

Ces « nouvelles » espèces sont des taxons à la morphologie très similaire aux espèces d'ores et déjà connues sur le territoire métropolitain. Même si des critères morphologiques ou acoustiques peuvent exister, l'approche génétique est le seul outil fiable pour les identifier. Cela nécessite donc de réaliser des analyses génétiques en prélevant l'ADN des individus afin d'identifier l'espèce à laquelle ils appartiennent. Cette méthode nécessite l'obtention d'un arrêté préfectoral pour la capture et la manipulation de ces espèces protégées.

CONTEXTE



Pierre-André Crochet, chercheur au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE) de Montpellier

Cette étude est menée de concert avec Pierre-André Crochet et Christophe Dufresnes.

Leurs travaux de recherche portent principalement sur la phylogéographie et la génétique des populations dans un but d'inventaire et de description de la biodiversité.



Christophe Dufresnes, chercheur au Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) de Paris

En particulier, leurs récentes recherches ont apporté un éclairage neuf sur la répartition ainsi que sur les révisions taxonomiques des espèces d'amphibiens et de reptiles en Europe.

AXES DE TRAVAIL

Quatre axes de travail définis



IDENTIFICATION DES DÉPARTEMENTS À PROSPECTER PRIORITAIREMENT

À partir des connaissances disponibles, et dans le but de combler les zones grises, des départements prioritaires pour l'échantillonnage génétique ont été identifiés et les structures locales sollicitées pour réaliser les prélèvements.



ACCOMPAGNEMENT DES STRUCTURES LOCALES POUR LES DEMANDES D'AUTORISATION DE CAPTURE ET DE MANIPULATION

Pour la bonne réalisation du projet, la SHF s'est tenue à la disposition des structures locales souhaitant réaliser des prélèvements pour les accompagner dans leur demande de dérogation de capture d'espèces protégées (auprès de la DREAL). La SHF s'est également chargée de fournir le matériel nécessaire à la collecte de prélèvements génétiques.



COORDINATION DE LA COLLECTE DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

La SHF a ensuite pris en charge la coordination de la collecte du matériel génétique.



ANALYSE GÉNÉTIQUE

Les prélèvements d'ADN récoltés ont ensuite pu être analysés afin de i) identifier à quelle espèce appartenait chaque individu échantillonné et ii) déterminer la distribution des espèces cibles. Cette tâche (hors analyses sur les alytes) a été confiée à Vincent Dubut de la société ADENEKO, coordonnée par les deux scientifiques référents du projet.

L'analyse des échantillons d'alytes a été réalisée par l'équipe de Johanna Ambu et Christophe Dufresnes (MNHN). Les méthodes utilisées ne sont pas détaillées dans le présent document, mais l'étude fera l'objet d'une publication scientifique très prochainement.

ESPÈCES CIBLES

L'ALYTE CATALAN (*ALYTES ALMOGAVARII*)



L'Alyte catalan, morphologiquement semblable à l'Alyte accoucheur (*Alytes obstetricans*) est présent à l'extrême est du massif pyrénéen. Longtemps considéré comme une sous-espèce d'*A. obstetricans*, les dernières études génétiques tendent à montrer qu'il s'agit d'une espèce valide. Il est d'ailleurs considéré comme tel dans la liste taxinomique européenne, publiée en 2020 dans la revue *Amphibia-Reptilia*.

ESPÈCES CIBLES ÉCHANTILLONNÉES

Alytes almogavarii
Alytes obstetricans 

LE CRAPAUD ÉPINEUX (*BUFO SPINOSUS*)

ESPÈCES CIBLES ÉCHANTILLONNÉES

 *Bufo spinosus*
Bufo bufo

La liste taxinomique des amphibiens et reptiles de France métropolitaine établit le Crapaud épineux au rang d'espèce. En effet, plusieurs publications ont montré qu'il existe deux lignées évolutives de *Bufo* en France et que la zone d'hybridation entre *Bufo bufo* et *Bufo spinosus* est étroite. Toutefois, les connaissances acquises restent insuffisantes pour affiner la répartition des deux espèces à proximité de la zone d'hybridation dans plusieurs secteurs.



LA RAINETTE IBÉRIQUE (*HYLA MOLLERI*)



La Rainette ibérique est présente dans le sud-ouest de la France. Les connaissances actuelles font état d'une présence en ex-Aquitaine, du massif landais aux Pyrénées-Atlantiques.

Toutefois, des lacunes de connaissance existent concernant la zone de contact et d'hybridation entre *Hyla molleri* et *Hyla arborea*, notamment dans le Massif central.

ESPÈCES CIBLES ÉCHANTILLONNÉES

Hyla molleri
Hyla arborea 

LA COULEUVRE ASTREPTOPHORE (*NATRIX ASTREPTOPHORA*)



Élevée au rang d'espèce dans la dernière liste taxinomique des amphibiens et reptiles de France métropolitaine, la Couleuvre astreptophore est présente dans les Pyrénées-Orientales, l'Aude, l'Ariège et peut-être les Pyrénées-Atlantiques.

De nouvelles recherches permettraient d'améliorer les connaissances sur sa répartition et son éventuelle zone d'hybridation avec *Natrix helvetica*, notamment dans les Pyrénées-Atlantiques et dans l'Hérault.

ESPÈCES CIBLES ÉCHANTILLONNÉES

Natrix astreptophora
Natrix helvetica



LA VIPÈRE ASPIC (*VIPERA ASPIS*)

SOUS-ESPÈCES CIBLES ÉCHANTILLONNÉES



V. aspis zinnikeri
V. aspis aspis

Deux sous-espèces, correspondant à deux lignées génétiques, sont actuellement reconnues en France, *Vipera aspis zinnikeri* dans le sud-ouest de la France et *Vipera aspis aspis* dans le reste du territoire.

Les limites géographiques entre ces sous-espèces ne sont pas bien connues. De plus, il sera intéressant de quantifier l'hybridation entre elles pour clarifier leur systématique, étant donné la supposée large zone d'intergradation au niveau morphologique, bien qu'une forte divergence génomique semble exister (Dufresnes et al. 2024).



LA SALAMANDRE TACHETÉE (*SALAMANDRA SALAMANDRA*)



De récentes études ont montré que la sous-espèce *Salamandra salamandra fastuosa*, présente dans le sud-ouest de la France serait fortement divergente de la sous-espèce *Salamandra salamandra terrestris*, qui remettrait en cause son statut intraspécifique.

SOUS-ESPÈCES CIBLES ÉCHANTILLONNÉES

S. salamandra fastuosa
S. salamandra terrestris



PROTOCOLE DE PRÉLÈVEMENTS

Chaque animal a été manipulé en prenant plusieurs précautions.

- Pour les amphibiens :
 - capture manuelle ou à l'aide d'une épauissette ;
 - manipulation avec gants à usage unique humidifiés au préalable ;
 - photographie de l'animal (une vue médio-dorsale et une vue ventrale) qui permettra de connaître le morphotype de l'animal, voire de prévenir des erreurs d'identification ;
 - prélèvement d'ADN réalisé à l'aide d'un écouvillon buccal inséré délicatement dans la bouche des animaux, et frotté à l'intérieur de la cavité buccale pendant une dizaine de secondes (en prenant soin de ne pas blesser l'animal et en maintenant une contention légère)
 - durée de la manipulation inférieure à 5 min par animal ;
 - relâché de l'animal échantillonné immédiatement après prélèvement et exactement à l'endroit où il a été capturé ;
 - désinfection du matériel au ©Virkon en suivant le protocole proposé par la SHF : http://lashf.org/wp-content/uploads/2022/08/SHF_protocole-Virkon_08.2022_VF2.pdf
- Pour les reptiles :
 - manipulation avec gants à usage unique ou après désinfection des mains à partir d'une solution désinfectante ;
 - photographie de l'animal (une vue médio-dorsale et une vue ventrale) qui permettra de connaître le morphotype de l'animal, voire de prévenir des erreurs d'identification ;
 - prélèvement d'ADN réalisé à l'aide d'un écouvillon buccal inséré délicatement dans la bouche des animaux, et frotté à l'intérieur de la cavité buccale pendant une dizaine de secondes (en prenant soin de ne pas blesser l'animal et en maintenant une contention légère) ;
 - durée de la manipulation inférieure à 5 min par animal ;
 - relâché de l'animal échantillonné immédiatement après prélèvement et exactement à l'endroit où il a été capturé.



Cas particulier des cadavres d'amphibiens et de reptiles

Des cadavres des espèces cibles pouvant également être trouvés, le prélèvement d'un morceau de tissu sur individus morts a également été réalisé lorsque la situation se présentait (tant qu'ils étaient trouvés rapidement après leur mort, en évitant tout prélèvement de tissu sur des cadavres en décomposition).



MUTUALISATION DES DONNÉES

Un effort important de mutualisation de données a été réalisé dans le cadre de ce projet. En premier lieu, des échantillons d'ADN des espèces cibles conservées au CEFE de Montpellier ont été compilés aux prélèvements de 2023.

Tableau 1. Nombre de prélèvements mutualisés par espèce en provenance de la collection BEV du CEFE de Montpellier.

Couples d'espèces cibles	Nombre de prélèvements mutualisés en provenance de la collection BEV
Alyte catalan/Alyte accoucheur	N = 7
Crapaud épineux/Crapaud commun	N = 24
Rainette ibérique/Rainette verte	N = 13
Couleuvre astreptophore/Couleuvre helvétique	N = 23
Vipère aspic <i>zinnikeri/aspis</i>	N = 91
Salamandre tachetée <i>fastuosa/terrestris</i>	N = 9
Total	N = 167

Par ailleurs, les résultats de plusieurs études scientifiques publiées (ou en cours de publication) ont été mutualisés avec les résultats de la présente étude afin de compiler l'ensemble des connaissances actuellement disponibles sur les espèces cibles.

Tableau 2. Liste des publications avec lesquelles les données de la présente étude ont été mutualisées.

Couples d'espèces cibles	Sources des données complémentaires ayant été mutualisées
Alyte catalan/Alyte accoucheur	Gonçalves et al. 2015 ; Lucati et al. 2022 ; Vliegenthart et al. 2023
Crapaud épineux/Crapaud commun	Arntzen et al. 2020 ; Dufresnes et al. 2020a
Rainette ibérique/Rainette verte	Stöck et al. 2012 ; Dufresnes et al. 2013, 2020b ; Drillon et al. 2019 ; Sanchez-Montez et al. 2019
Couleuvre astreptophore/Couleuvre helvétique	Asztalos et al. 2020 (et sources citées)
Vipère aspic <i>zinnikeri/aspis</i>	Martínez-Freiría et al. 2021 ; données non publiées de Ursenbacher S.
Salamandre tachetée <i>fastuosa/terrestris</i>	Burgon et al. 2021

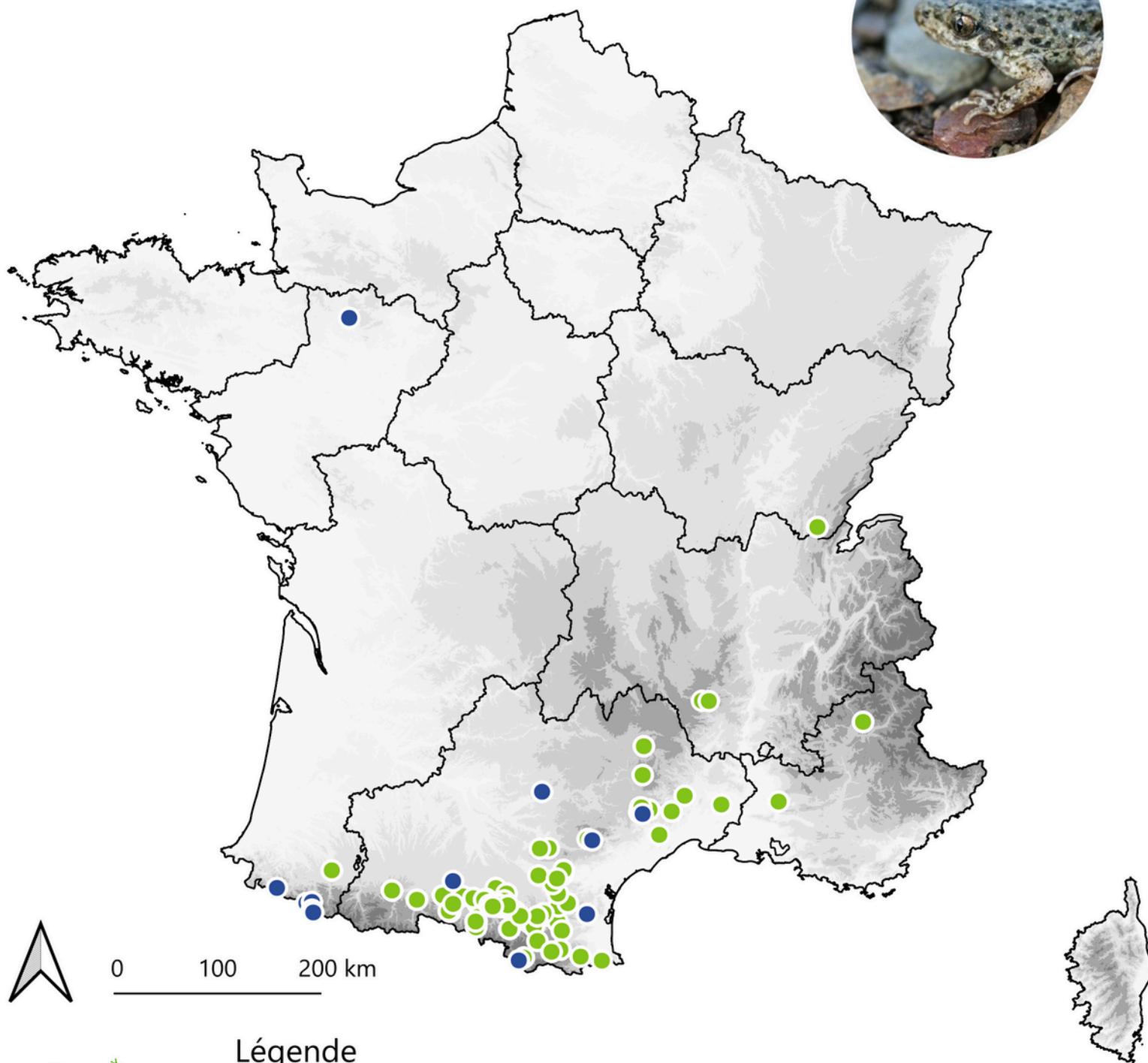
LOCALISATION DES PRÉLÈVEMENTS

Tableau 3. Nombre de prélèvements réalisés par couple d'espèces/sous-espèces cibles en 2023 sur le territoire de France métropolitaine.

Couples d'espèces cibles	Nombre de prélèvements en 2023	Préleveurs participants (par ordre alphabétique)
Alyte catalan/Alyte accoucheur	N = 213	Ambu Johanna, Berroneau Matthieu, Buisson Olivier, Cochard Pierre-Olivier, Delmas Claudine, Dufresnes Christophe, Fuento Nicolas, Hadj-Bachir Oscar
Crapaud épineux/Crapaud commun	N = 193	Ameline Michel, Barrioz Mickaël, Bassot Christophe, Beaudoin Cédric, Besson Mélaïne, Beurville Killian, Bodin Elie, Brecin Benjamin, Chauvet Clément, Chrapecki Marine, Collet Mathilde, Combrun Julia, Delacour Maxime, Dufay Lucie, Dugault Théophile, Dumont Gauthier-Alaric, Dutertre André, Elder Jean-François, François Nicolas, Fuento Nicolas, Gabet Ludivine, Gagnier Samuel, Galloo Thierry, Garcia Éva, Garcia Paul, Hurel Alexandre, Jourdain Marius, Landier Bruno, Lelièvre Hervé, Lesouef Quentin, Marchalot Aurélie, Metais Rémi, Métégnier Gabriel, Muller Solenne, Muratet Jean, Parrain Nicolas, Peyronel Olivier, Robert Anthony, Rocher Loïs, Rolin Michael, Sansault Eric, Skrzyniarz Mégane, Stauth Séverine, Tinchant A., Travert Marie-Léa, Van Loc Tran, Veen Rob
Rainette ibérique/Rainette verte	N = 105	Auboin Naïs, Beau Frédéric, Besson Mélaïne, Combet Simon, Dugault Théophile, Gilhodes Elodie, Morel Régis, Rault Pierre-Alexis, Rocher Loïs, Rolin Michael, Roux Alexandre, Veen Rob, Véricel Emmanuel
Couleuvre astreptophore/Couleuvre helvétique	N = 31	Berroneau Matthieu, Bonnaud Julien, Buisson Olivier, Delmas Claudine, Hadj-Bachir Oscar, Muratet Jean, Pottier Gilles
Vipère aspic <i>zinnikeri/aspis</i>	N = 41	Auboin Naïs, Berroneau Matthieu, Besson Mélaïne, Buisson Olivier, Cochard Pierre-Olivier, Delmas Claudine, Desvaux Jean-Philippe, Duffey Laurent, Hadj-Bachir Oscar, Muratet Jean, Rivoire Jean, Rocher Loïs, Trigaud Bilal
Salamandre tachetée <i>fastuosa/terrestris</i>	N = 91	Berroneau Matthieu, Buisson Olivier, Brustel Hervé, Catil Jean-Michel, Delmas Claudine, Grezes Geoffrey, Loos Fabrice, Maillé Sophie, Pottier Gilles, Souchet Jérémie
Total	N = 674	

LOCALISATION DES PRÉLÈVEMENTS

ESPÈCES DU GENRE *ALYTES*



Légende

- Sites d'échantillonnage 2023 (incluant les échantillons du BEV)
- Sites d'échantillonnage de la littérature



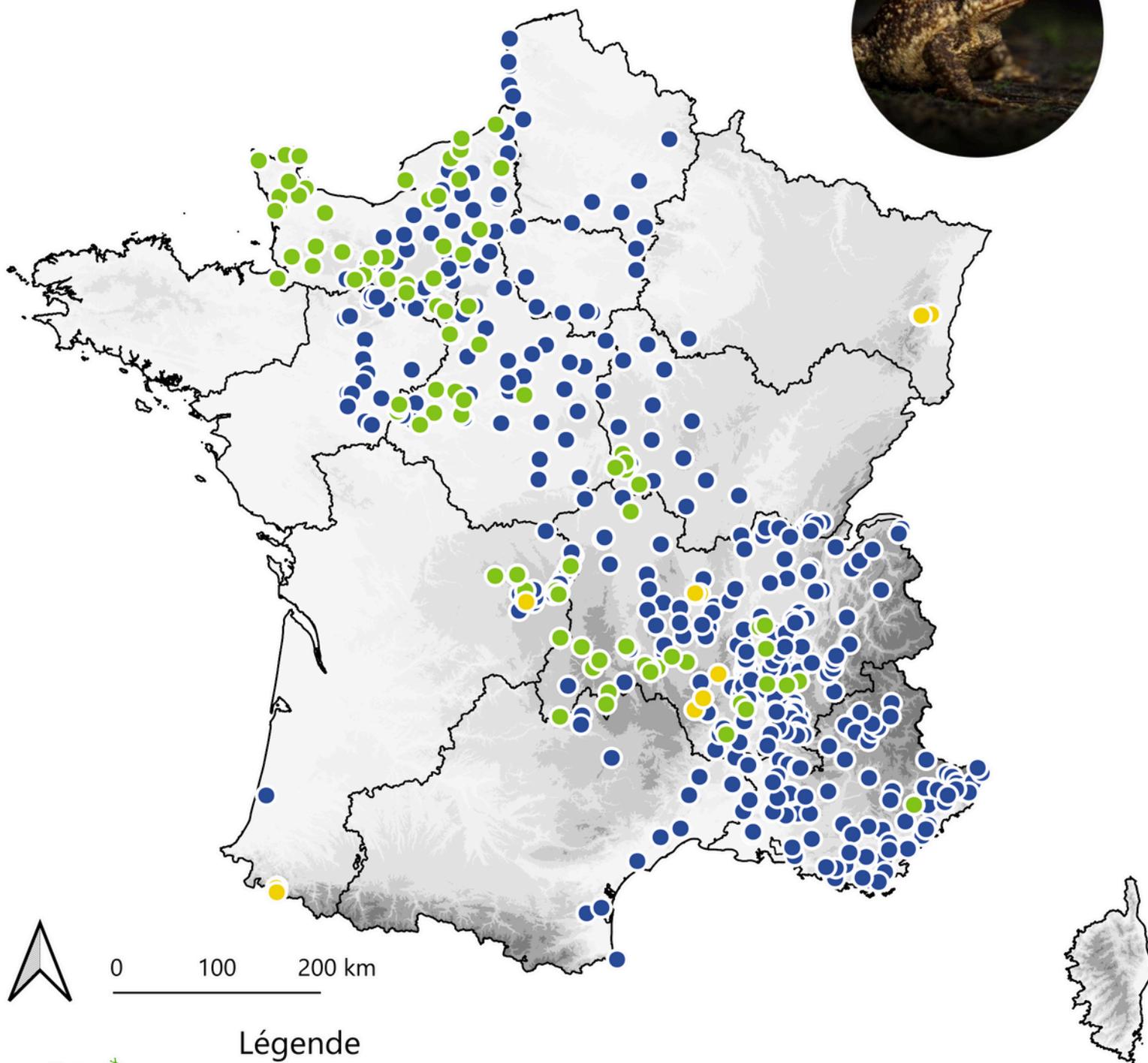
Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
15 décembre 2023 ;

Sources : SHF, Goncalves et al. 2015 ; Lucati et al. 2022 ; Vliegenthart et al. 2023

Figure 1. Localisation des prélèvements réalisés pour le couple d'espèces du genre *Alytes* sur le territoire de France métropolitaine.

LOCALISATION DES PRÉLÈVEMENTS

ESPÈCES DU GENRE *BUFO*



Légende



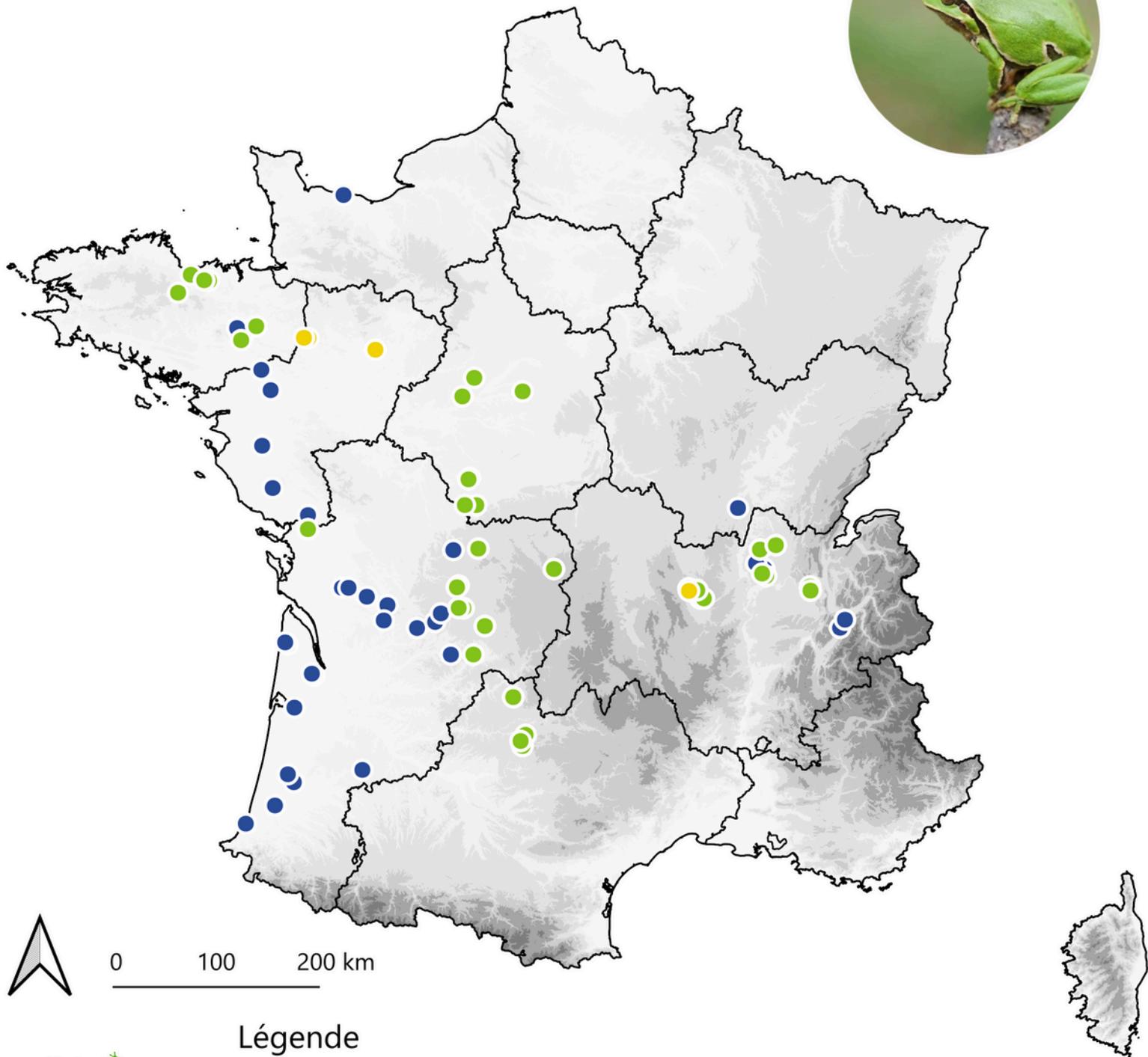
- Sites d'échantillonnage mutualisé (BEV)
- Sites d'échantillonnage 2023
- Sites d'échantillonnage de la littérature

Réalisation : A. Trochet (SHF) ; 15 décembre 2023 ; Sources : SHF, Arntzen et al. 2020 ; Dufresnes et al. 2020a

Figure 2. Localisation des prélèvements réalisés pour le couple d'espèces du genre *Bufo* sur le territoire de France métropolitaine.

LOCALISATION DES PRÉLÈVEMENTS

ESPÈCES DU GENRE *HYLA*



Légende



- Sites d'échantillonnage mutualisé (BEV)
- Sites d'échantillonnage 2023
- Sites d'échantillonnage de la littérature

Réalisation : A. Trochet (SHF) ; 15 décembre 2023 ; Sources : SHF, Stöck et al. 2012 ; Dufresnes et al. 2013, 2020b ; Drillon et al. 2019 ; Sanchez-Montez et al. 2019

Figure 3. Localisation des prélèvements réalisés pour le couple d'espèces du genre *Hyla* sur le territoire de France métropolitaine.

LOCALISATION DES PRÉLÈVEMENTS

ESPÈCES DU GENRE *NATRIX*

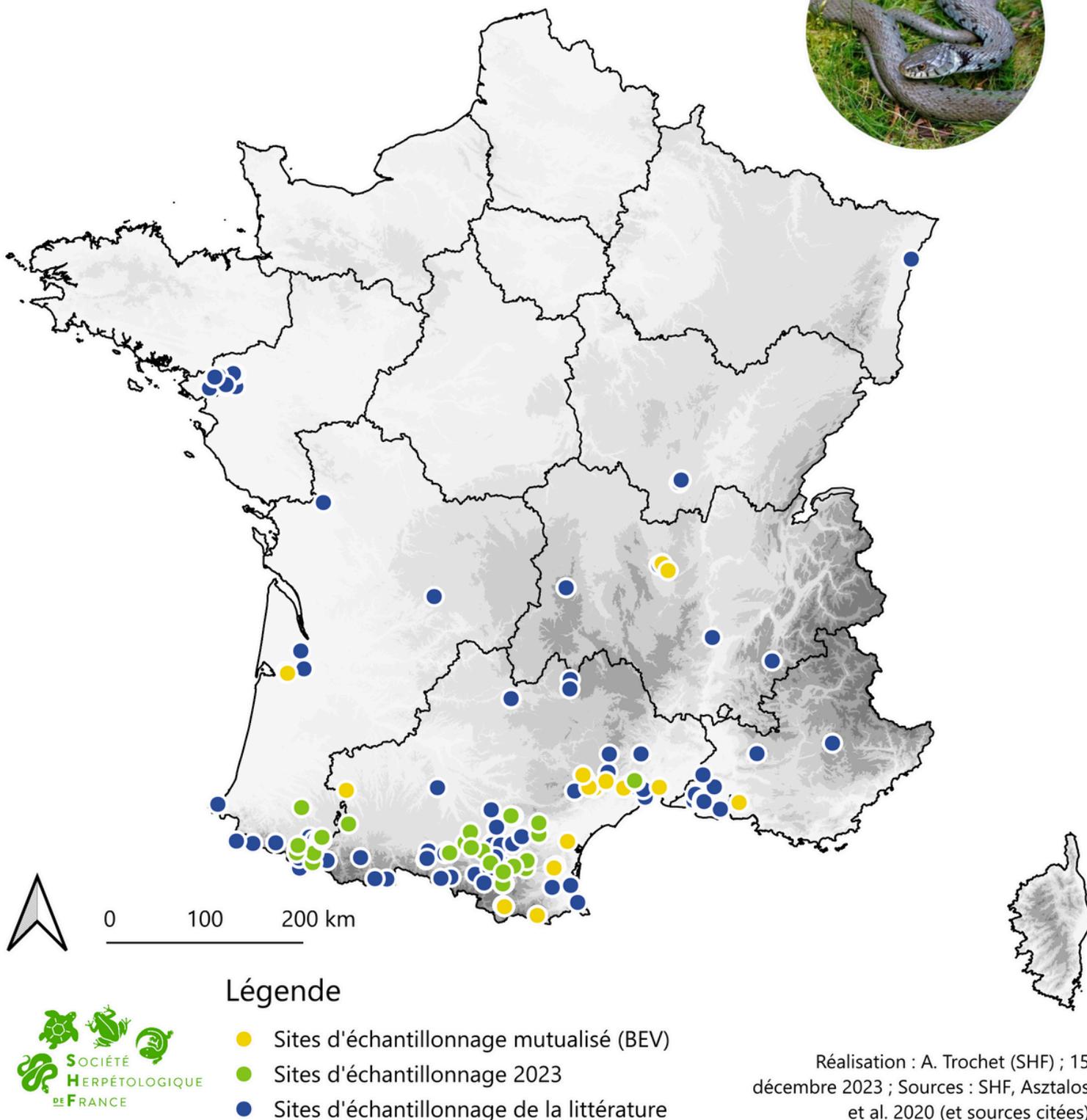
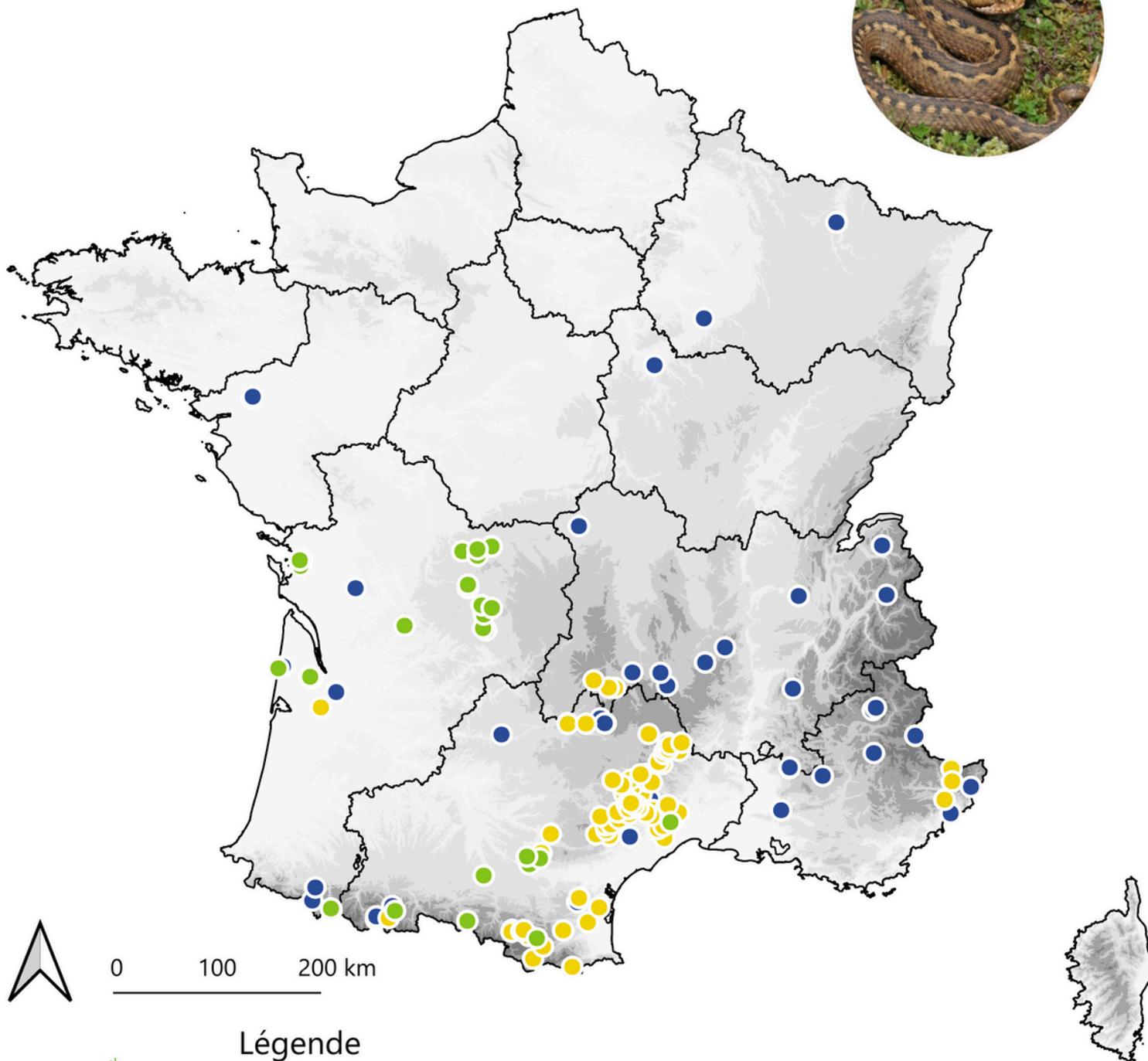


Figure 4. Localisation des prélèvements réalisés pour le couple d'espèces du genre *Natrix* sur le territoire de France métropolitaine.

LOCALISATION DES PRÉLÈVEMENTS

SOUS-ESPÈCES *VIPERA ASPIS*



Légende



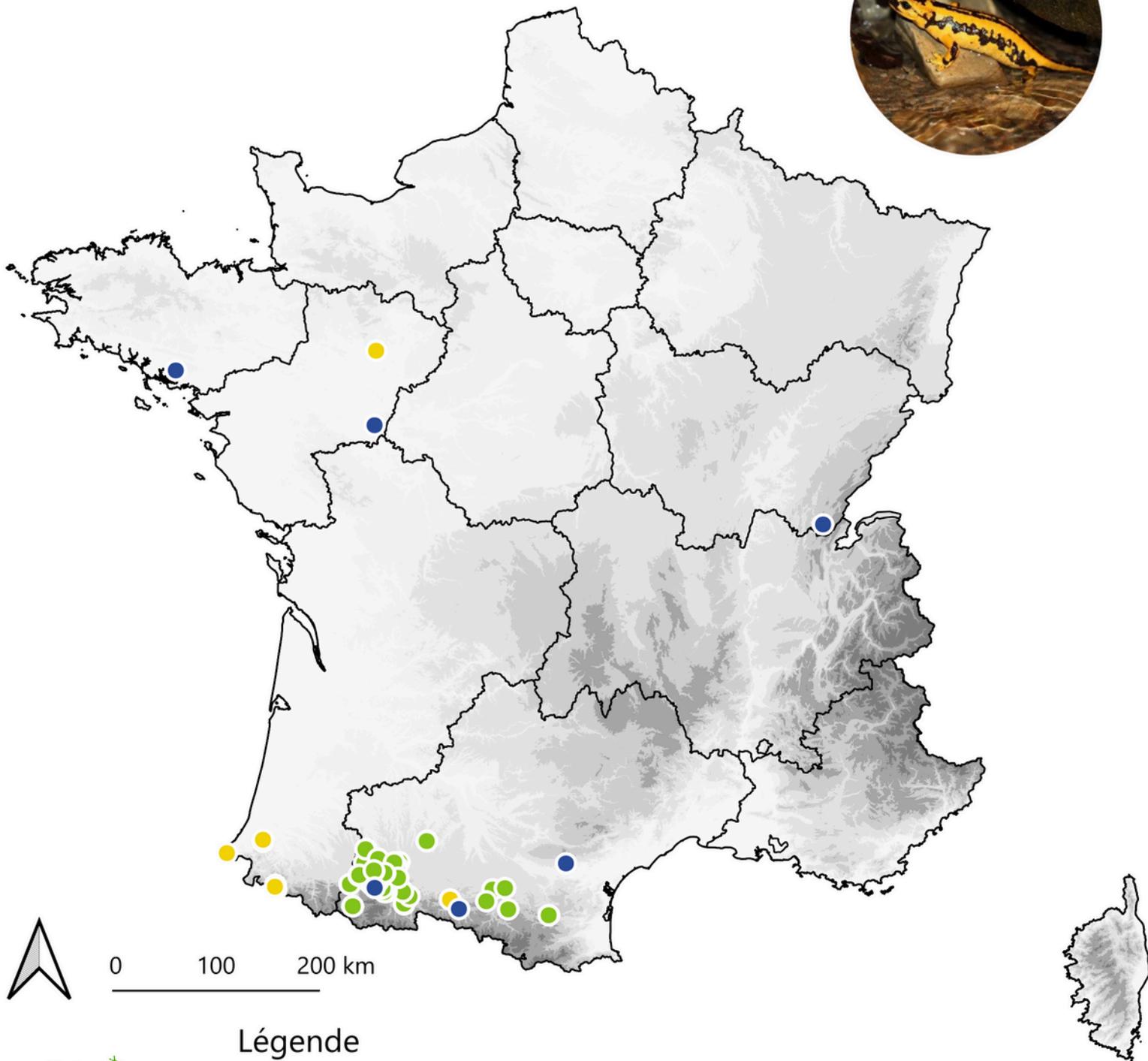
- Sites d'échantillonnage mutualisé (BEV)
- Sites d'échantillonnage 2023
- Sites d'échantillonnage de la littérature

Réalisation : A. Trochet (SHF) ; 15 décembre 2023 ; Sources : SHF, Martínez-Freiría et al. 2021 ; données non publiées de Ursenbacher S.

Figure 5. Localisation des prélèvements réalisés pour le couple de sous-espèces de *Vipera aspis* sur le territoire de France métropolitaine.

LOCALISATION DES PRÉLÈVEMENTS

SOUS-ESPÈCES *SALAMANDRA SALAMANDRA*



Légende



- Sites d'échantillonnage mutualisé (BEV)
- Sites d'échantillonnage 2023
- Sites d'échantillonnage de la littérature

Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
15 décembre 2023 ;
Sources : SHF, Burgon et al. 2021

Figure 6. Localisation des prélèvements réalisés pour le couple de sous-espèces de *Salamandra salamandra* sur le territoire de France métropolitaine.

ANALYSES GÉNÉTIQUES



ALYTES

Comme évoqué en introduction, les alytes ont bénéficié d'une étude spécifique réalisée par l'équipe de Johanna Ambu et Christophe Dufresnes (MNHN). Les méthodes utilisées ne sont pas détaillées dans le présent document, mais l'étude fera l'objet d'une publication scientifique très prochainement.

AUTRES ESPÈCES/SOUS-ESPÈCES

EXTRACTION D'ADN

L'ADN a été extrait de chacun des échantillons via le DNeasy Tissue Kit de chez QIAGEN, dans une salle dédiée à l'extraction ADN. Pour chaque série d'extractions (47 échantillons), un contrôle négatif d'extraction (NCext) a été inclus : 50µL d'eau ultra-pure, traités comme un « vrai » échantillon. Pour l'ensemble des extraits, la quantité d'ADN a ensuite été quantifiée avec un Nanodrop (Thermo Scientific). Les quantités d'ADN mesurées étaient très variables, comprises entre < 5ng.µL (en-dessous de la limite de détection de la méthode de dosage) et 200 ng.µL pour la plupart des échantillons. Les écouvillons buccaux, représentant la plus grande partie des échantillons, présentaient les plus faibles concentrations d'ADN. Pour les étapes suivantes, l'ensemble des échantillons a été standardisé à une concentration inférieure à 25ng.µL.

DEVELOPPEMENTS DES MARQUEURS GENETIQUES

Pour chacun des 5 couples d'espèces/sous-espèces, la littérature scientifique a été étudiée afin d'identifier un marqueur mitochondrial et un marqueur nucléaire permettant de discriminer les espèces et sous-espèces considérées. Ensuite, les séquences correspondant à ces marqueurs ont été alignées, et sur la base de ces alignements, des couples d'amorces ciblant des régions discriminantes ou potentiellement discriminantes des marqueurs identifiés ont été conçues manuellement. Les marqueurs (gènes) et les amorces sont rapportés dans le Tableau 4.

L'ensemble des couples d'amorces PCR a été ensuite testé sur 6 échantillons de chaque couple espèce/sous-espèces (issus d'individus collectés en allopatrie des zones de contact entre les espèces/sous-espèces) afin de valider leurs conditions d'amplification avec le QIAGEN Multiplex Kit (QIAGEN). Le protocole PCR retenu à la suite des tests PCR est le suivant : 15 min à 95°C, puis 35 cycles de 30s à 94°C, 40s à 58°C, et 1 min à 72°C, suivi de 10 min à 72°C. Ce protocole est commun à l'ensemble des couples d'amorces rapportés dans le Tableau 4.

ANALYSES GÉNÉTIQUES



Tableau 4. Marqueurs génétiques utilisés pour le minibarcoding

Taxons	Gène	Mt/Nuc	Référence du marqueur	Amorce F	Amorces R	Taille du marqueur
Alytes*	16S	Mt	Palumbi et al. 1991	CGCCTGTTTATC AAAAACAT	CCGGTCTGAACT CAGATCACGT	530 pb
		Nuc	*Analyse multilocus non détaillée ici (SNPs obtenus par ddRAD-seq suivant le protocole de Brelford et al. 2016)			
Bufo	16S	Mt	Carvalho et al. 2017	TCCTAACCGTGCG AAGGTAG	GTAAGTGTGCTCCGT GGTCAC	227 pb
	RPL3	Nuc	Recuero et al. 2012	GTGAGACTAAAGG ATGTAGAGC	ATGGTCTMTAGTC GTGCCAAG	165 pb
Hyla	Cytb	Mt	Dufresnes et al. 2013; Sánchez-Montes et al. 2019	CRGTAATYACCAA CCTTCTCTCAGC	TTGGATGAGCCGG TTTGGTGRAGG	141 pb
	Rag1	Nuc	Stöck et al. 2008	GCCCTTCTACCTG GATATCATC	AAATGGACCGGAC AGGTATTCC	205 pb
Natrix	ND4	Mt	Pokrant et al. 2016	CATTCATTATCCTC GCCCTATGAG	AGTTCCTGACAGG CTTCATTGTG	111 bp
	Rag1	Nuc	Carvalho et al. 2017	AGGATTATTGCTG GGCATAYGAG	GGATGCTTAGGAA GGATTTTACAG	290 bp
Salamandra	COI	Mt	Vences et al. 2014; Ehl et al. 2019	GTAATTGTGACCG CACATGCTTTCG	AATGATGGGGGAA GGAGTCAGAAAC	111 bp
	TTN	Nuc	Vences et al. 2014	TGGTGGTGCAGAA ATTGACTAC	GAGCATTGTCAC TGAAATGG	183 bp
Vipera	CR	Mt	Ursenbacher et al. 2006	CCCATTTTTTCAAT ACCTCACC	TTAGACAATAGG AGGTTTCGAGAC	314 pb
	NT3	Nuc	Martínez-Freiría et al. 2020	AAGCAGACGGCC AGAACCAAG	GGGTATTTTCACTG AGGAGGAC	141 pb

PROTOCOLE DE MINIBARCODING

Le protocole de minibarcoding utilisé est similaire à celui décrit par Corse et al. (2017) et Thomasdotter et al. (2023). Il comprend une première étape d'amplification des marqueurs par PCR, en utilisant les conditions de PCR décrites plus haut. Afin de permettre l'identification des échantillons après amplification, des séquences « tag » de 9-14 nucléotides (décrits dans Corse et al. 2017) ont été ajoutées à chaque amorce, permettant la création de 96 combinaisons d'amorces F et R. En plus du témoin d'extraction (NCext) décrit plus haut, deux types de témoins négatifs supplémentaires ont été ajoutés : un témoin négatif de PCR (NCpcr), et de 7 à 11 témoins négatifs de « tag » (NC tag). Les NCtag consistent en des tubes vides au sein des plaques de 96 tubes utilisées pour les amplifications par PCR et correspondant donc à des combinaisons de tag non utilisées pour les échantillons. Ils permettront d'évaluer le taux de mauvaise assignation des tags (mistagging ou tag-jump ; Schnell et al. 2015).

ANALYSES GÉNÉTIQUES



Après vérification sur gel d'agarose et purification (kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), les produits de PCR ont subi une seconde PCR afin d'intégrer des adaptateurs indexés Nextera® XT (Illumina). Cette seconde PCR a été réalisée en utilisant la Phusion Plus DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) dans les conditions indiquées par le fournisseur. Après purification, les banques Nextera ainsi réalisées ont été séquencées sur un séquenceur NovaSeq 6000 Illumina System (Illumina) avec un cartouche SP-500 cycles à l'Institut du Cerveau de Paris. Les données brutes ont ensuite été filtrées avec le logiciel VTAM (González et al. 2023). Cette approche permet notamment d'éliminer du jeu de données i) les séquences faiblement représentées, ii) les erreurs de PCR et de séquençage, iii) les séquences chimères, iv) les séquences de pseudogènes, et de contrôler le phénomène de « mistagging ».

Après filtration et validation des données et des échantillons par VTAM, chaque échantillon/marqueur validé présentait un haplotype (pour les marqueurs mitochondriaux) et un ou deux allèles (pour les marqueurs nucléaires). Les haplotypes et les allèles ont ensuite été assignés taxonomiquement.



RÉSULTATS

La synthèse des assignations obtenues pour les marqueurs mitochondriaux et nucléaires a ensuite permis d'assigner un taxon à la plupart des échantillons analysés.

Pour les couples *Bufo bufo*/*Bufo spinosus*, *Hyla arborea*/*Hyla molleri* et *Natrix astreptophora*/*Natrix helvetica*, les deux marqueurs (mitochondrial et nucléaire) permettent chacun de discriminer les deux espèces. Quelques individus présentaient à la fois des haplotypes/allèles des deux espèces, et ont été identifiés comme hybrides et/ou introgressés (en d'autres termes, il n'a pas été possible de déterminer l'espèce pour ces échantillons).

En revanche, pour les couples des sous-espèces appartenant aux genres *Salamandra* et *Vipera*, seul le marqueur mitochondrial s'est révélé discriminant (le COI et la Control Region, respectivement). Le gène TTN est monomorphe au sein et entre les deux sous-espèces *Salamandra salamandra terrestris* et *Salamandra salamandra fastuosa* et ne permet donc pas de distinguer les deux sous-espèces. Concernant le gène NT3, malgré 11 allèles différents identifiés par nos analyses, aucun n'est apparu préférentiellement associé à *Vipera aspis aspis* ou *Vipera aspis zinnikeri* (sur la base des 6 individus en allopatrie, et donc a priori non-hybrides, issus de la collection BEV). Les marqueurs TTN (pour *Salamandra*) et NT3 (pour *Vipera*) n'ont donc pas permis de discriminer les sous-espèces considérées, ni de détecter des hybrides.

Concernant le couple *Bufo bufo*/*Bufo spinosus*, 5 échantillons n'ont pas pu être assignés à une des deux espèces ou à un hybride, et l'assignation taxonomique n'a pu être réalisée que pour un seul des deux marqueurs pour 10 échantillons. Au total, 29 individus hybrides ou introgressés ont pu être identifiés, soit 14% des échantillons assignés.

L'ensemble des échantillons de *Hyla* a pu être assigné à une des deux espèces ou à un hybride, mais 7 individus n'ont pu être assignés que sur la base du marqueur mitochondrial. Trente hybrides ou introgressés ont été identifiés sur la base du minibarcoding, soit 25% des échantillons.

Concernant le couple *Natrix astreptophora*/*Natrix helvetica*, deux individus n'ont pu être identifiés, et deux échantillons n'ont pu être assignés taxonomiquement que sur la base d'un des deux marqueurs. Parmi les individus assignés, 10 hybrides ou introgressés ont été détectés, soit 19% de l'effectif analysé.

L'ensemble des échantillons du genre *Salamandra* a pu être assigné à une des deux sous-espèces, sur la base du marqueur mitochondrial (COI). Un individu échantillonné en Hautes-Pyrénées présente cependant un haplotype dont la séquence est identique à celle d'haplotypes retrouvés au sein d'individus présents dans le Sud de l'Italie (voir Vences et al. 2014 ; Bisconti et al. 2018), et notamment à l'haplotype SPM 780 (GenBank ID : KF645985) assigné à *Salamandra salamandra gigliolii* par Vences et al. (2014).

Enfin, ce sont les échantillons du genre *Vipera* qui présentent le plus de données manquantes. Sur les 130 individus analysés, 24 n'ont pas été assignés. Notamment, la plupart des écouillons buccaux issus de la collection BEV présentaient des quantités d'ADN après extraction très faibles, et les rendements des PCR de ces individus se sont révélés inefficaces.

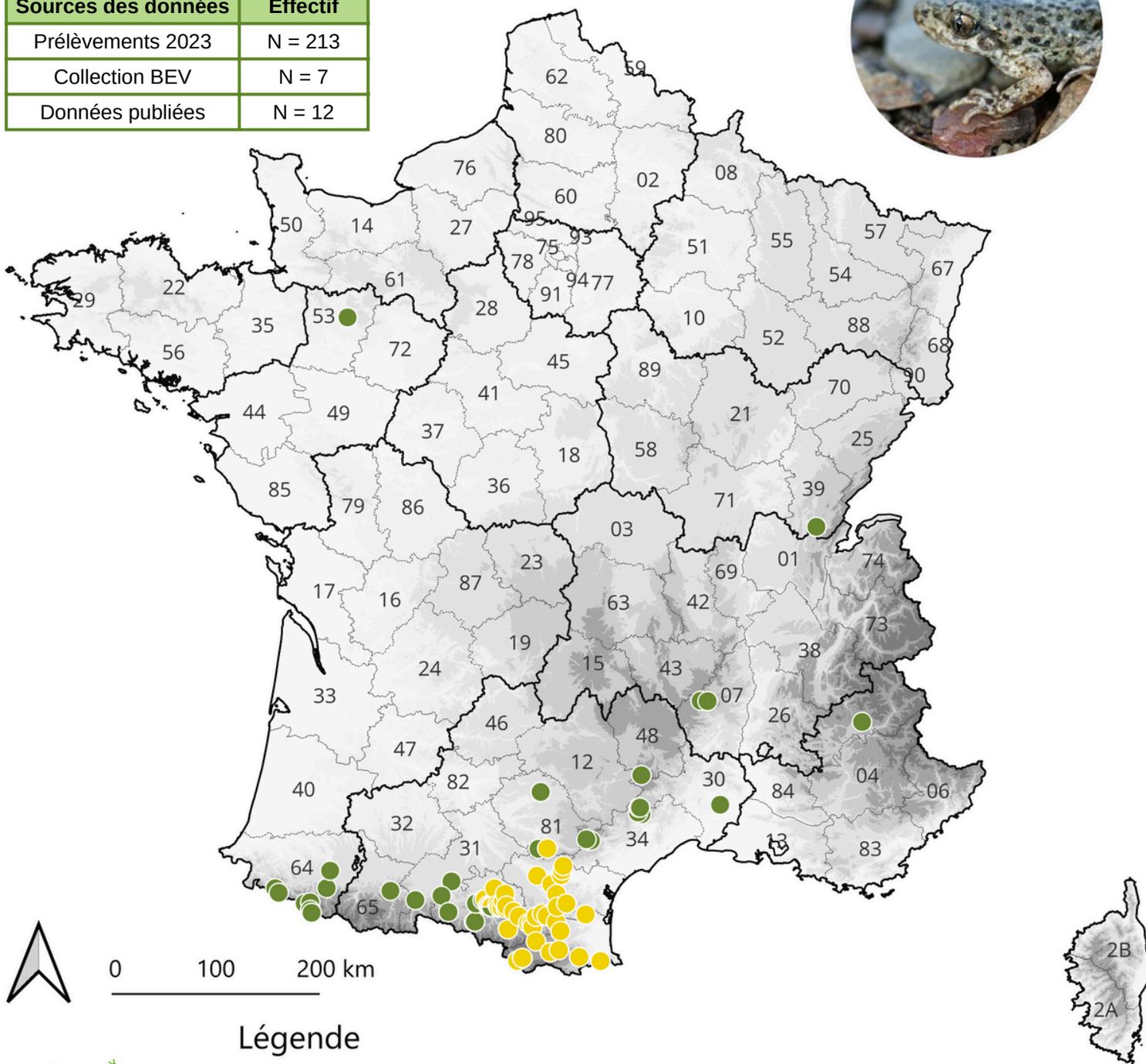
Pour les alytes, les analyses mitochondriales et nucléaires localisent la transition entre *Alytes obstetricans* et *Alytes almogavarii* au niveau de la Montagne Noire et de l'Ariège, les populations les plus proches montrant des signes de mélanges génétiques.

RESULTATS

L'ALYTE CATALAN (ALYTES ALMOGAVARIII)



Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 213
Collection BEV	N = 7
Données publiées	N = 12



Légende

Répartition des deux espèces d'Alytes sur la base des résultats de la présente étude et des données mutualisées

- *Alytes obstetricans*
- *Alytes almogavarii*



Réalisation :
A. Trochet (SHF) ; 21 juin 2024 ;
Sources : SHF, Goncalves et al.
2015 ; Lucati et al. 2022 ;
Vliegthart et al., 2023

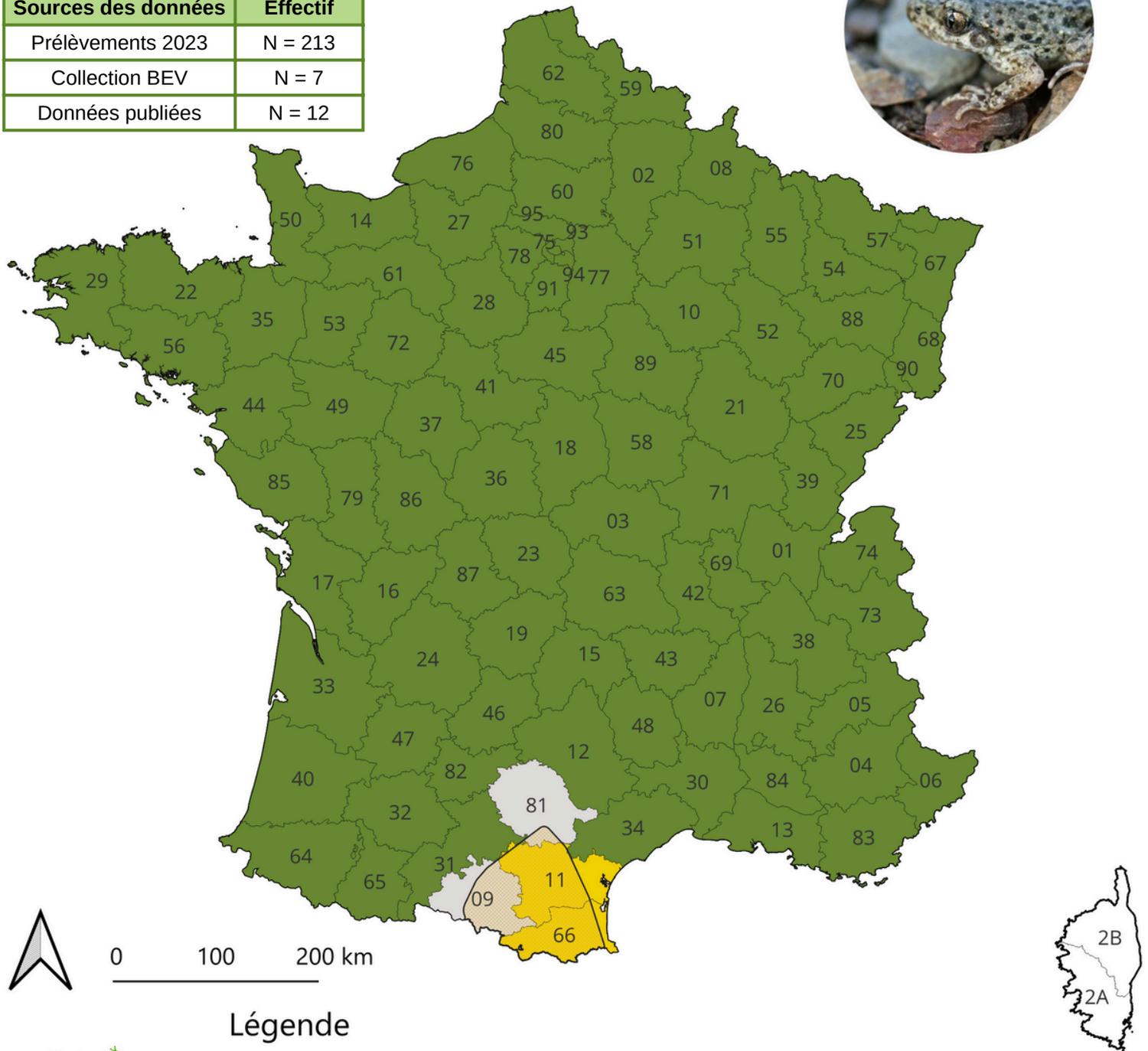
Figure 7. Identification de *Alytes obstetricans* et/ou *Alytes almogavarii* sur l'ensemble des échantillons prélevés ou mutualisés.

RESULTATS (SUITE)

L'ALYTE CATALAN (ALYTES ALMOGAVARIII)



Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 213
Collection BEV	N = 7
Données publiées	N = 12



Légende

- Départements où les deux espèces cohabitent et/ou des individus hybrides ont été identifiés
- Départements où seul Alytes almogavarii est présent
- Départements où seul Alytes obstetricans est présent
- Zone de présence de Alytes almogavarii

Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
4 juin 2024 ; Sources : SHF,
Goncalves et al. 2015 ;
Lucati et al. 2022 ;
Vliegenthart et al., 2023

Figure 8. Présence des deux espèces du genre Alytes par département, en fonction des résultats obtenus dans le cadre de la présente étude.

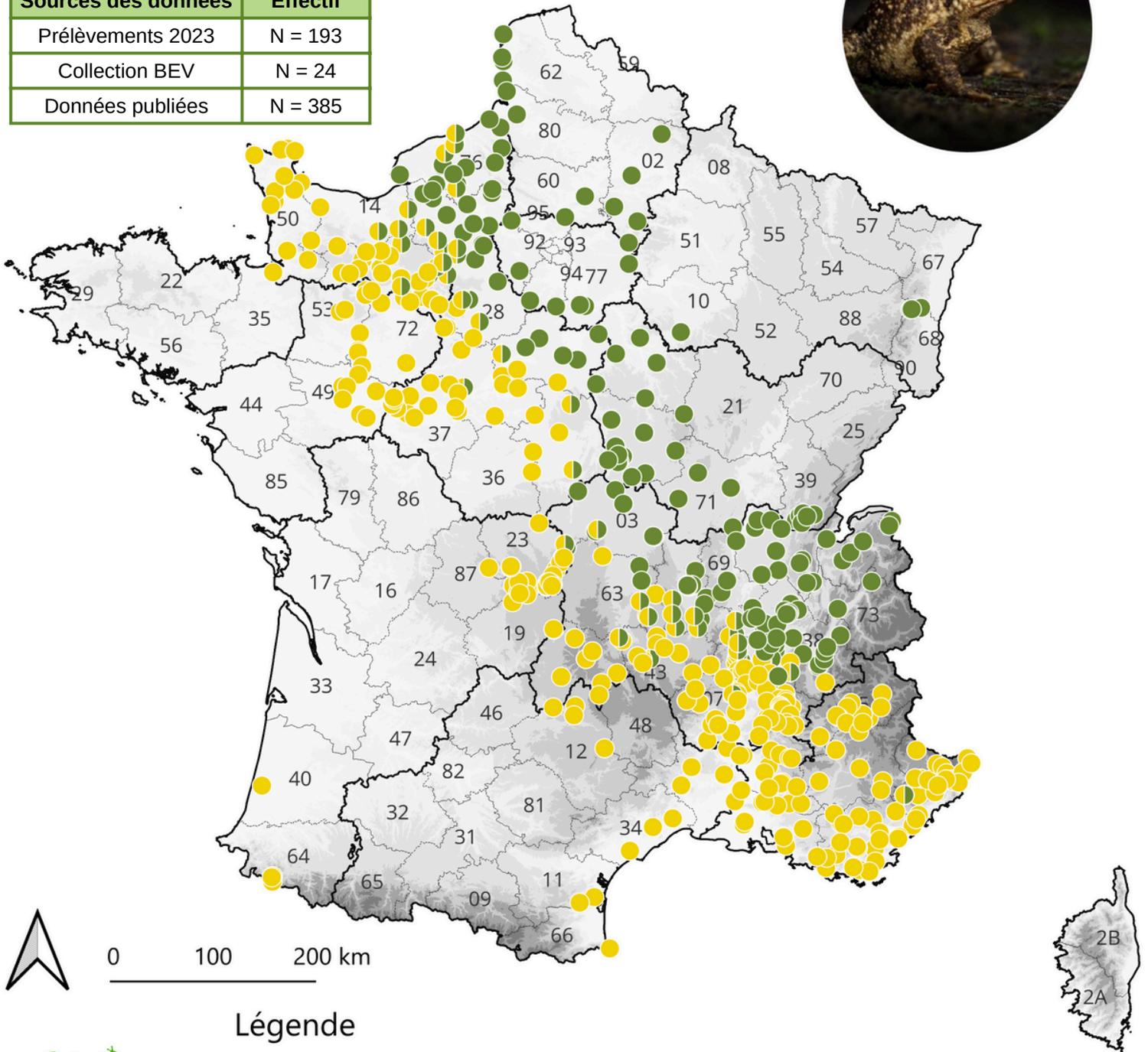


RESULTATS (SUITE)

LE CRAPAUD ÉPINEUX (*BUFO SPINOSUS*)



Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 193
Collection BEV	N = 24
Données publiées	N = 385



Légende

Répartition des deux espèces de Bufo sur la base des résultats de la présente étude et des données mutualisées

- *Bufo bufo*
- *Bufo spinosus*



Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
21 juin 2024 ;
Sources : SHF, Arntzen et al. 2020 ;
Dufresnes et al. 2020a

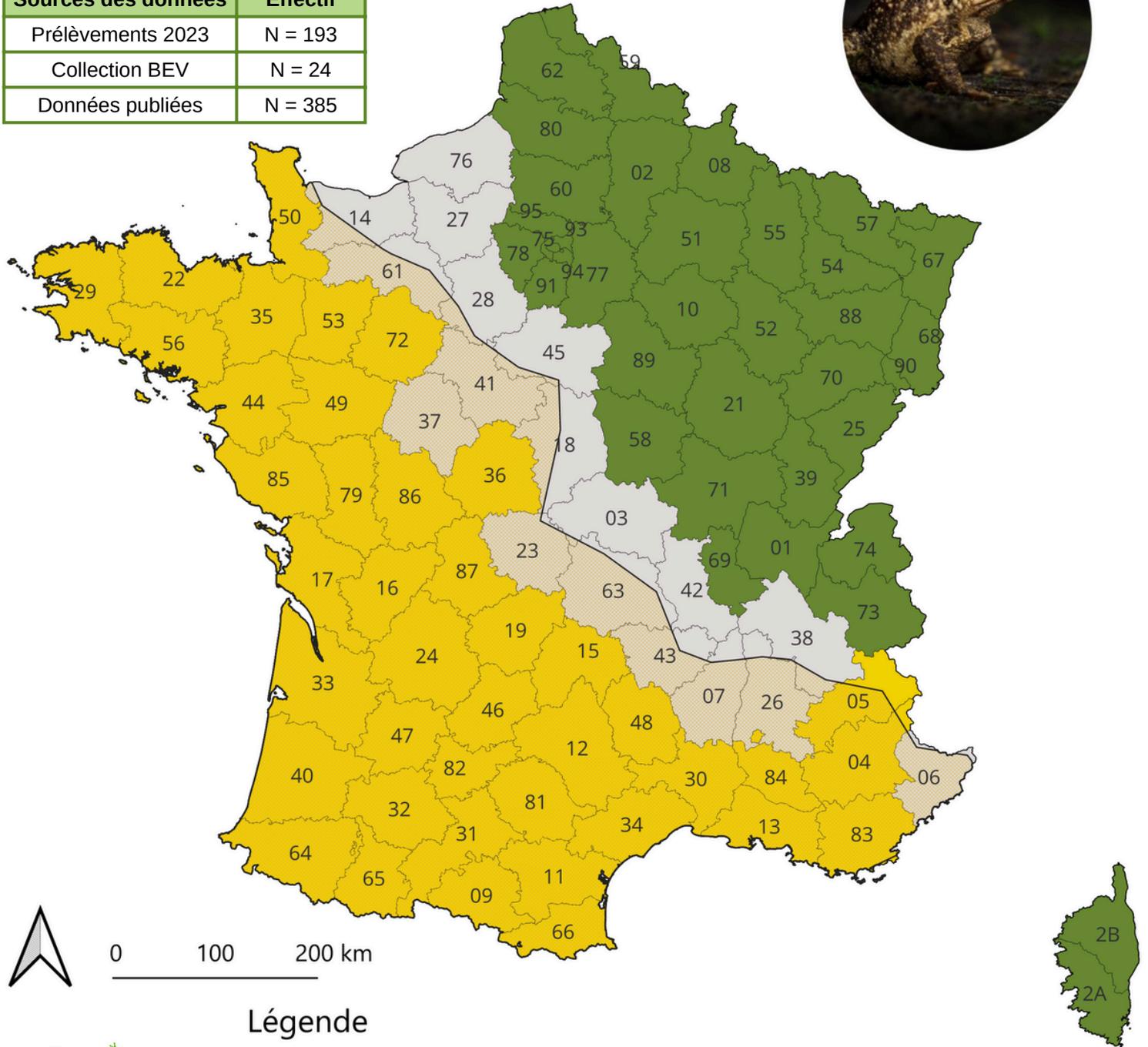
Figure 9. Identification de *Bufo bufo* et/ou *Bufo spinosus* sur l'ensemble des échantillons prélevés ou mutualisés.

RESULTATS (SUITE)

LE CRAPAUD ÉPINEUX (*BUFO SPINOSUS*)



Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 193
Collection BEV	N = 24
Données publiées	N = 385



Légende

- Départements où les deux espèces cohabitent et/ou des individus hybrides ont été identifiés
- Départements où seul *Bufo spinosus* est présent
- Départements où seul *Bufo bufo* est présent
- Zone de présence de *Bufo spinosus*

Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
21 juin 2024 ;
Sources : SHF, Arntzen et al. 2020 ;
Dufresnes et al. 2020a

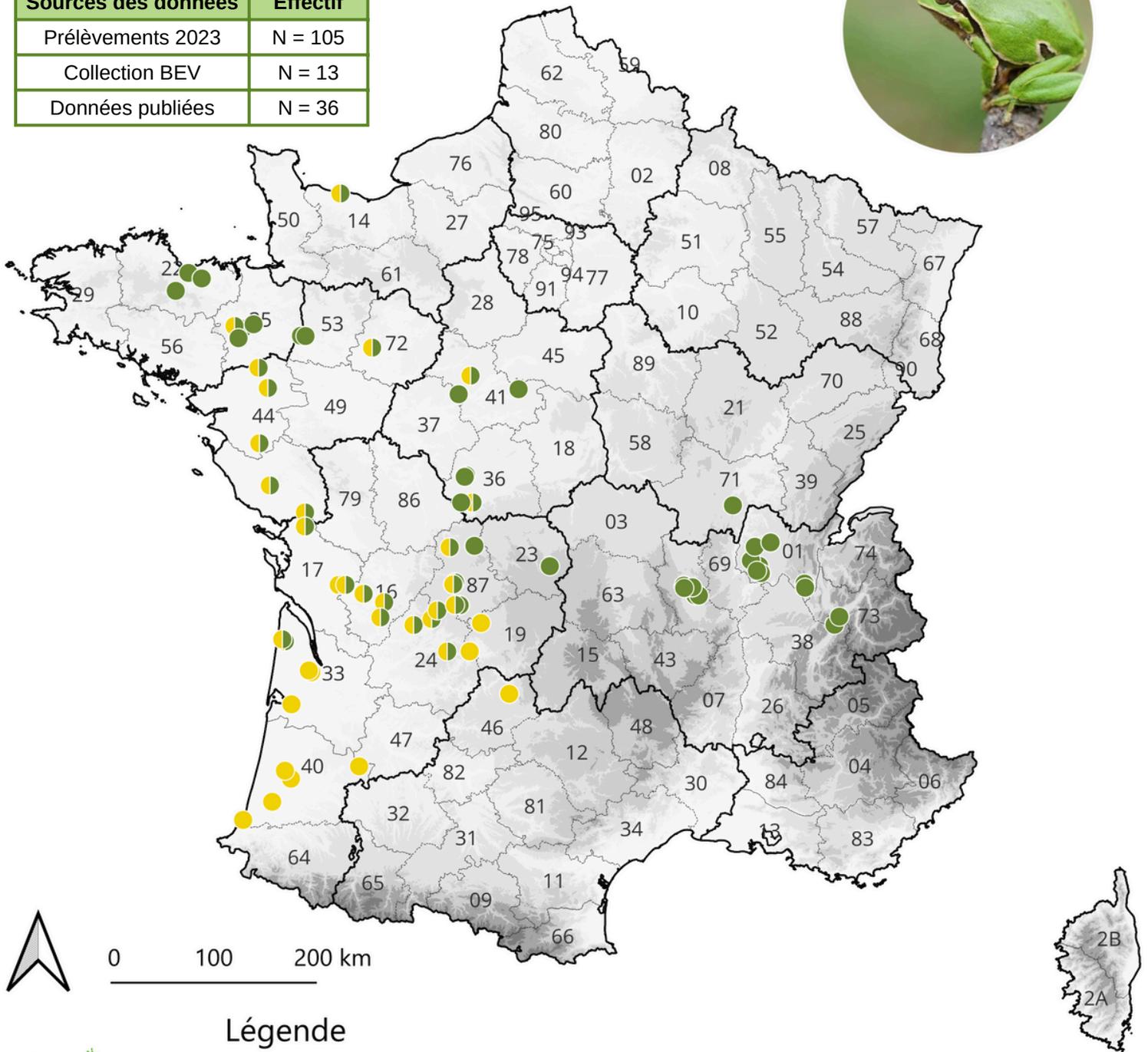
Figure 10. Présence des deux espèces du genre *Bufo* par département, en fonction des résultats obtenus dans le cadre de la présente étude.

RESULTATS (SUITE)

LA RAINETTE IBÉRIQUE (*HYLA MOLLERI*)



Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 105
Collection BEV	N = 13
Données publiées	N = 36



Légende

Répartition des deux espèces d'*Hyla* sur la base des résultats de la présente étude et des données mutualisées

- *Hyla arborea*
- *Hyla molleri*

Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
21 juin 2024 ;

Sources : SHF, Stöck et al. 2012 ;
Dufresnes et al. 2013, 2020b ; Drillon et al.
2019 ; Sanchez-Montez et al. 2019

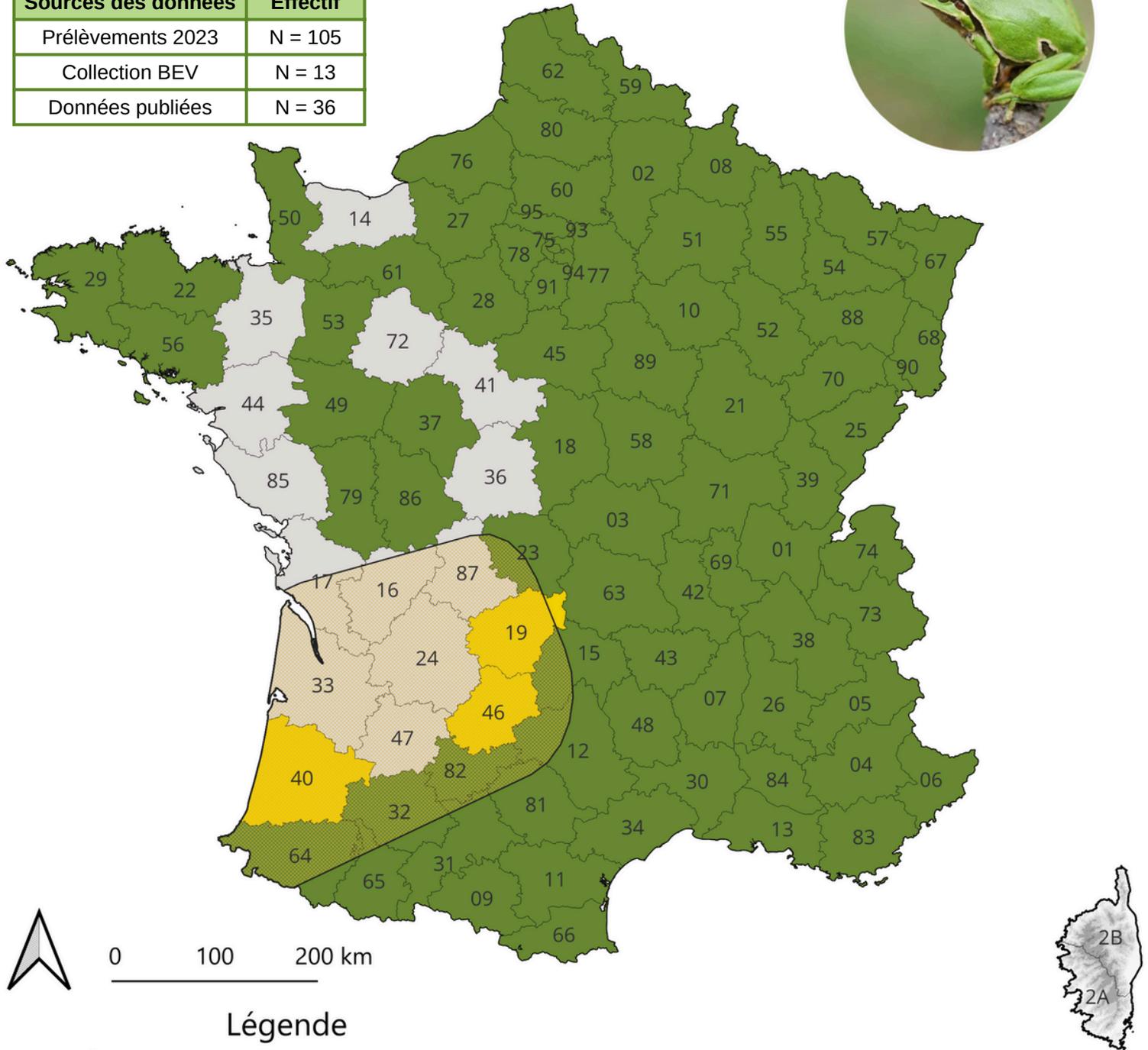
Figure 11. Identification de *Hyla arborea* et/ou *Hyla molleri* sur l'ensemble des échantillons prélevés ou mutualisés.

RESULTATS (SUITE)

LA RAINETTE IBÉRIQUE (*HYLA MOLLERI*)



Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 105
Collection BEV	N = 13
Données publiées	N = 36



Légende

- Départements où les deux espèces cohabitent et/ou des individus hybrides ont été identifiés
- Départements où seule *Hyla molleri* est présente
- Départements où seule *Hyla arborea* est présente
- Zone de présence d'*Hyla molleri*

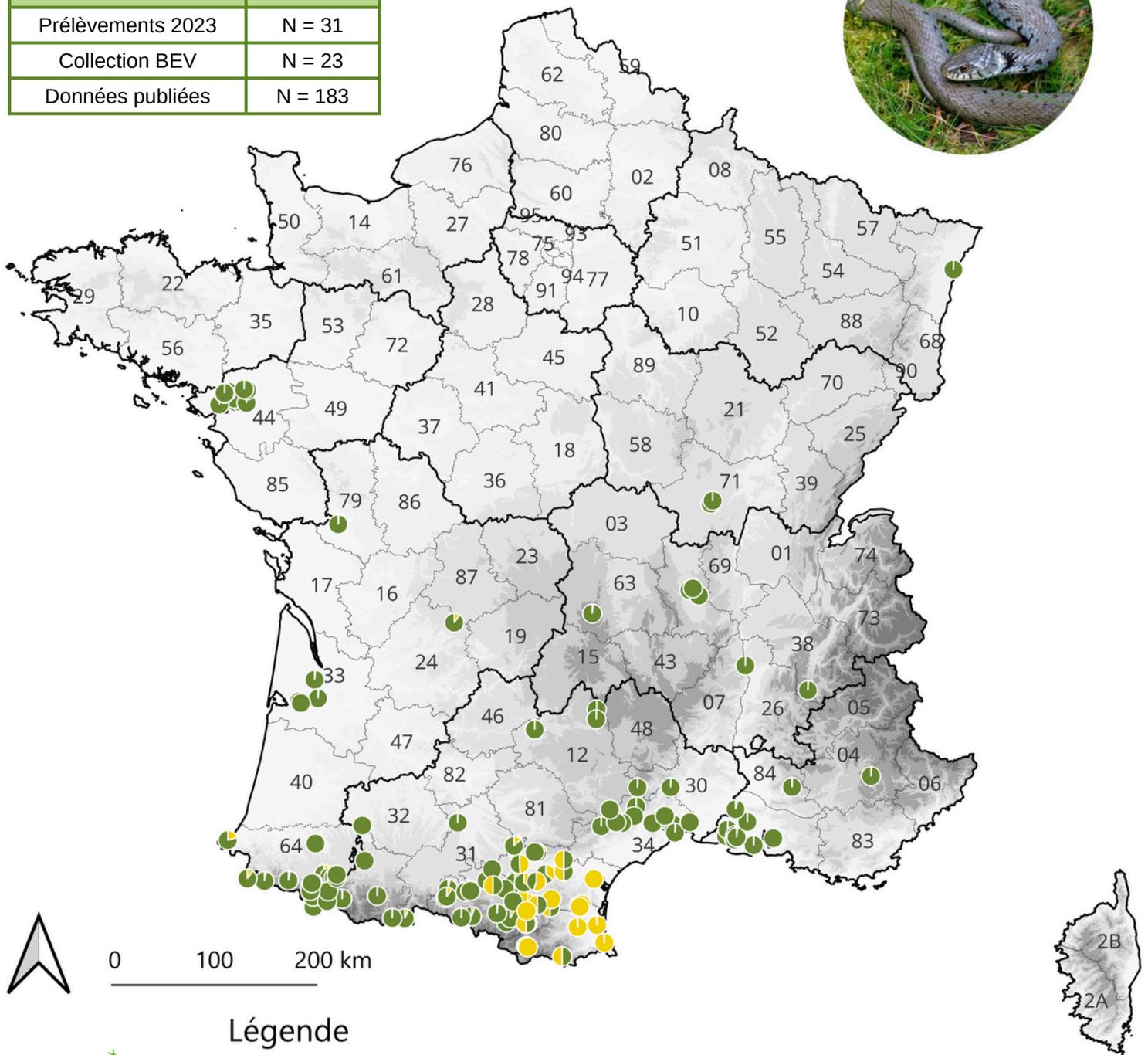
Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
21 juin 2024 ;
Sources : SHF, Stöck et al. 2012 ;
Dufresnes et al. 2013, 2020b ;
Drillon et al. 2019 ;
Sanchez-Montez et al. 2019

Figure 12. Présence des deux espèces du genre *Hyla* par département, en fonction des résultats obtenus dans le cadre de la présente étude.

RESULTATS (SUITE)

LA COULEUVRE ASTREPTOPHORE (*NATRIX ASTREPTOPHORA*)

Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 31
Collection BEV	N = 23
Données publiées	N = 183



Légende

Répartition des deux espèces de *Natrix* sur la base des résultats de la présente étude et des données mutualisées

- *Natrix helvetica*
- *Natrix astreptophora*

Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
21 juin 2024 ;

Sources : SHF, Asztalos et al. 2020 (et sources citées)

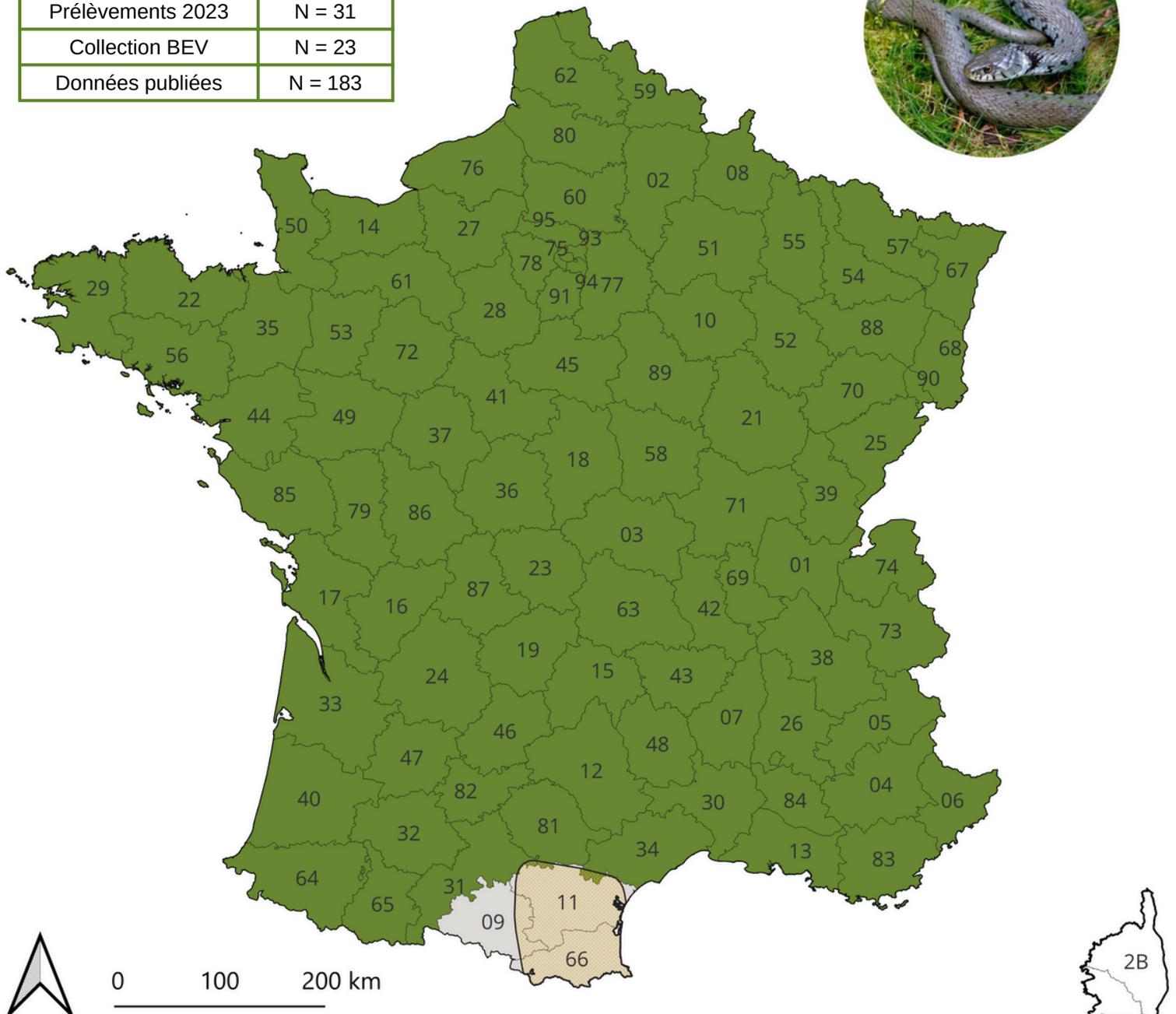


Figure 13. Identification de *Natrix helvetica* et/ou *Natrix astreptophora* sur l'ensemble des échantillons prélevés ou mutualisés.

RESULTATS (SUITE)

LA COULEUVRE ASTREPTOPHORE (NATRIX ASTREPTOPHORA)

Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 31
Collection BEV	N = 23
Données publiées	N = 183



Légende



- Départements où les deux espèces cohabitent et/ou des individus hybrides ont été identifiés
- Départements où seule *Natrix helvetica* est présente
- Zone de présence de *Natrix astreptophora*

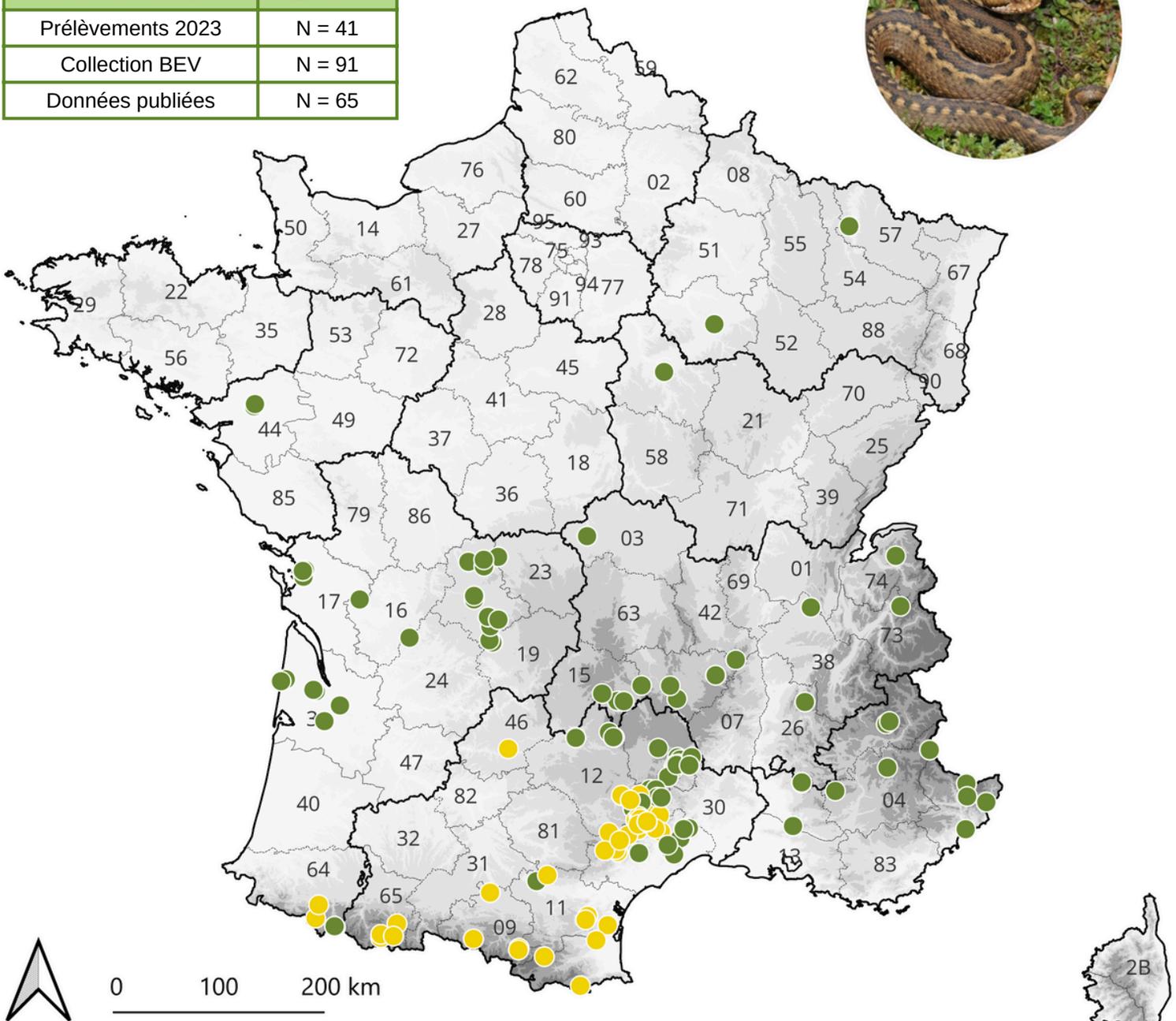
Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
3 juin 2024 ; Sources : SHF,
Asztalos et al. 2020 (et sources
citées)

Figure 14. Présence des deux espèces du genre *Natrix* par département, en fonction des résultats obtenus dans le cadre de la présente étude.

RESULTATS (SUITE)

LA VIPÈRE ASPIC DE ZINNIKER (*VIPERA ASPIS ZINNIKERI*)

Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 41
Collection BEV	N = 91
Données publiées	N = 65



Légende

Répartition des deux sous-espèces de *Vipera* sur la base des résultats de la présente étude et des données mutualisées

- *V. aspis aspis*
- *V. aspis zinnikeri*

Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
21 juin 2024 ;
Sources : SHF, Martínez-Freiria
et al. 2021 ; données non
publiées de Ursenbacher S.



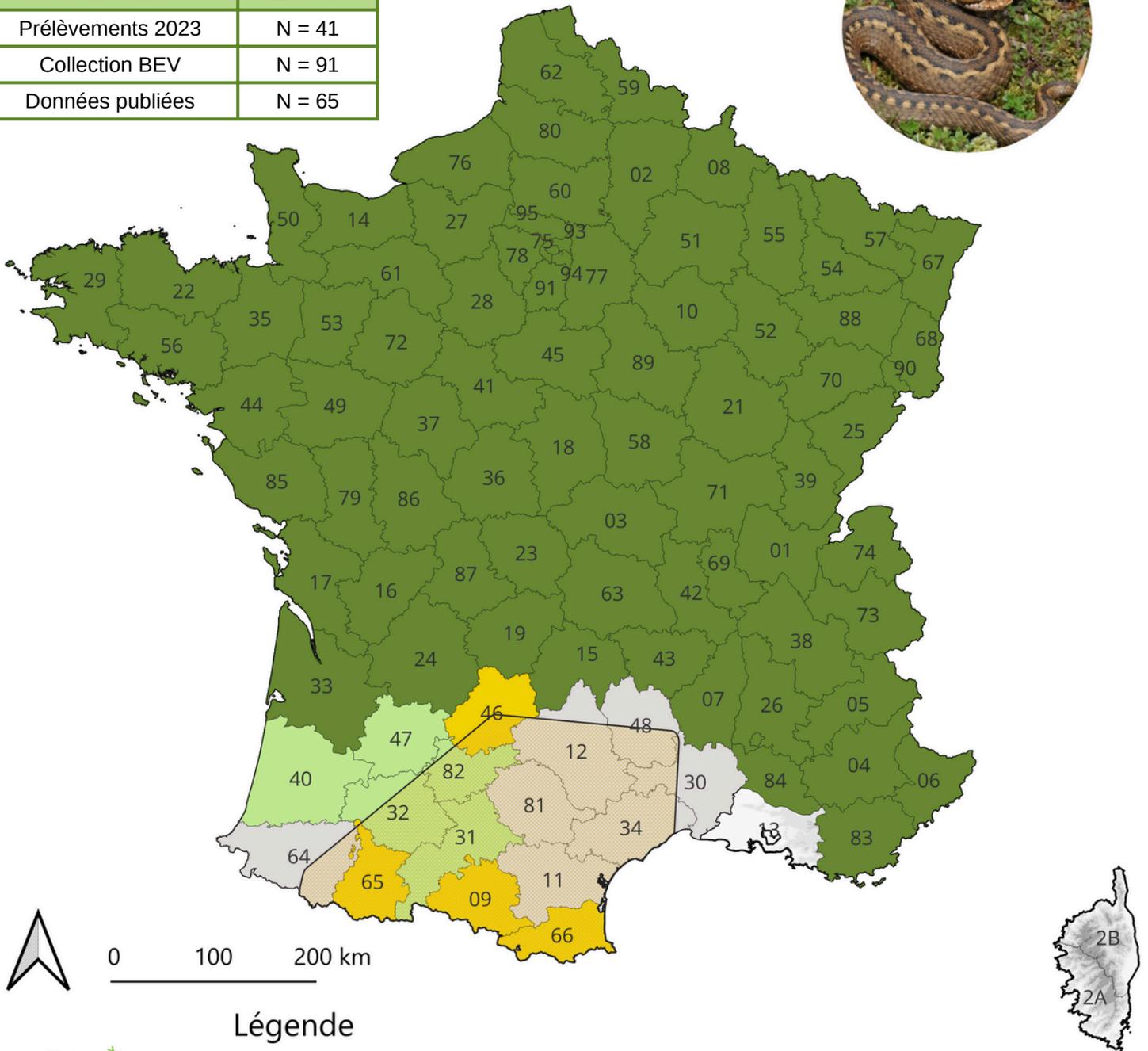
Figure 15. Identification de *Vipera aspis aspis*/*Vipera aspis zinnikeri* sur l'ensemble des échantillons prélevés ou mutualisés.

RESULTATS (SUITE)

LA VIPÈRE ASPIC DE ZINNIKER (*VIPERA ASPIS ZINNIKERI*)



Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 41
Collection BEV	N = 91
Données publiées	N = 65



Légende



- Départements où les deux espèces cohabitent et/ou des individus hybrident ont été identifiés
- Départements où seule *V. aspis zinnikeri* est présente
- Départements où seule *V. aspis aspis* est présente
- Départements sans données
- Zone de présence de *V. aspis zinnikeri*

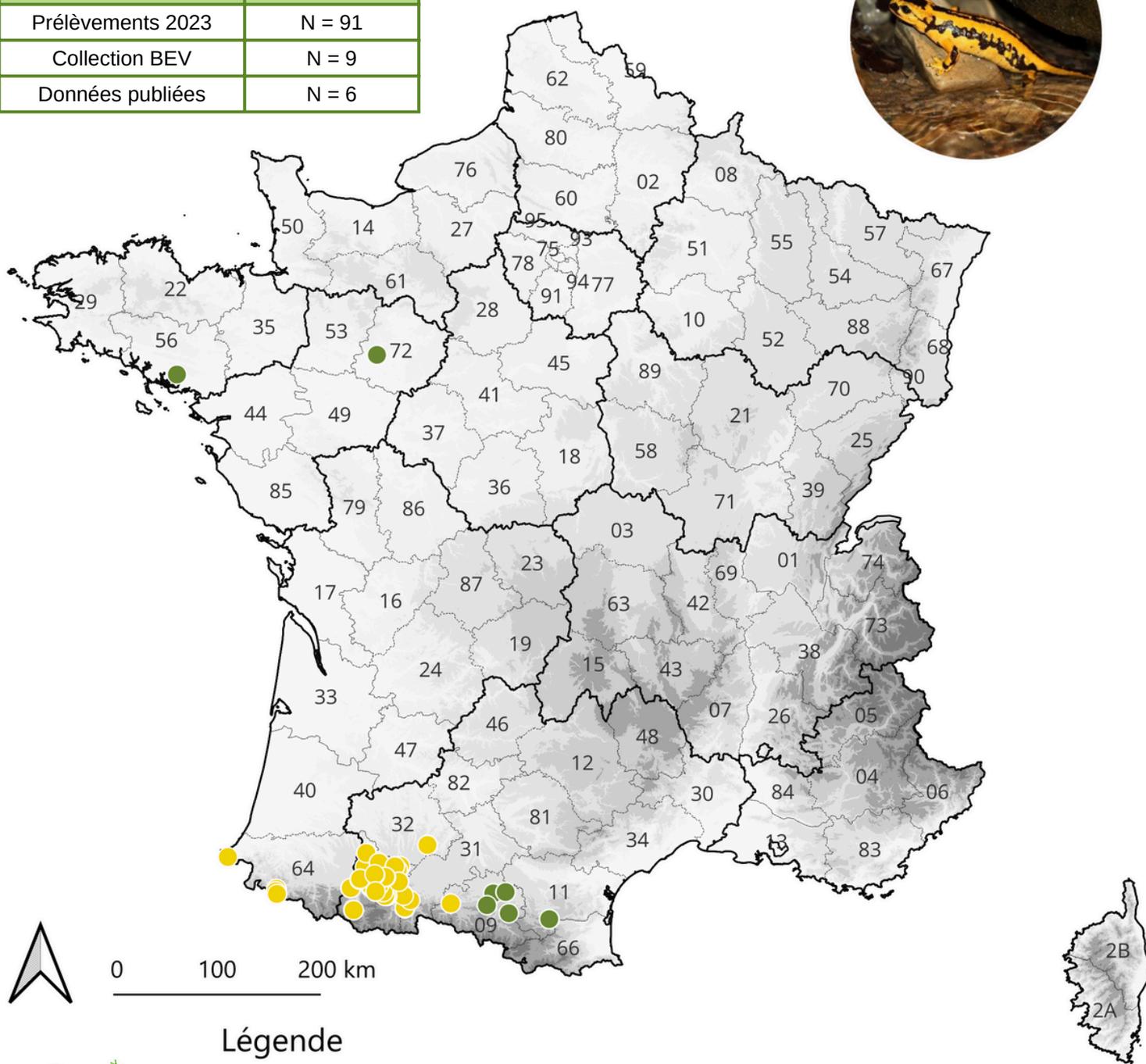
Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
21 juin 2024 ;
Sources : SHF,
Martínez-Freiria et al. 2021 ;
données non publiées de
Ursenbacher S.

Figure 16. Présence des deux sous-espèces de *Vipera aspis* par département, en fonction des résultats obtenus dans le cadre de la présente étude.

RESULTATS (SUITE)

LA SALAMANDRE TACHETÉE FASTUEUSE (*S. SALAMANDRA FASTUOSA*)

Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 91
Collection BEV	N = 9
Données publiées	N = 6



Légende

Répartition des deux sous-espèces de *Salamandra* sur la base des résultats de la présente étude et des données mutualisées

- *S. salamandra terrestris*
- *S. salamandra fastuosa*

Réalisation : A. Trochet (SHF) ;
21 juin 2024 ;
Sources : SHF,
Burgon et al. 2021

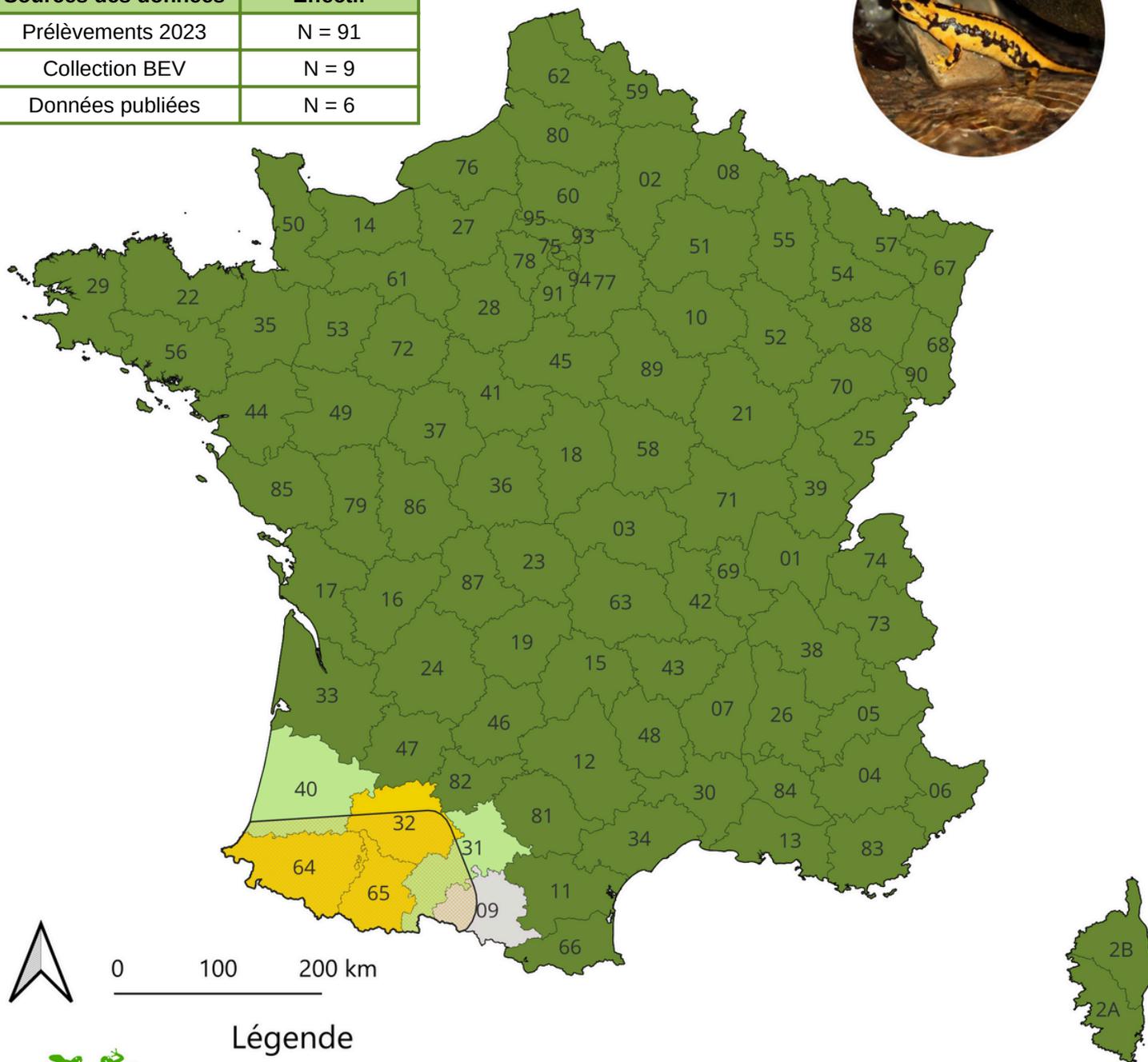


Figure 17. Identification de *Salamandra salamandra terrestris* et/ou *Salamandra salamandra fastuosa* sur l'ensemble des échantillons prélevés ou mutualisés.

RESULTATS (SUITE)

LA SALAMANDRE TACHETÉE FASTUEUSE (*S. SALAMANDRA FASTUOSA*)

Sources des données	Effectif
Prélèvements 2023	N = 91
Collection BEV	N = 9
Données publiées	N = 6



Légende



- Départements où les deux espèces cohabitent et/ou des individus hybrides ont été identifiés
- Départements où seule *S. salamandra fastuosa* est présente
- Départements où seule *S. salamandra atra* est présente
- Départements sans données
- Zone de présence de *S. salamandra fastuosa*

Réalisation : A. Trochet (SHF) ; 21 juin 2024 ; Sources : SHF, Burgon et al. 2021

Figure 18. Présence des deux sous-espèces de *Salamandrina salamandra* par département, en fonction des résultats obtenus dans le cadre de la présente étude.

L'approche par minibarcoding développée ici a prouvé qu'elle permettait la discrimination rapide d'espèces proches, ainsi qu'une détection *a minima* d'individus hybrides ou introgressés.

En revanche, pour les niveaux sub-spécifiques, cette approche présente des limites, notamment pour les minibarcodes nucléaires. Si le marqueur mitochondrial permet d'assigner chaque échantillon à un taxon, il ne permet pas d'évaluer le niveau d'hybridation/introgression entre les deux taxons considérés. Ainsi, certains échantillons (non précisés sur les cartes), pour lesquels une espèce a été assignée uniquement sur un marqueur (nucléaire ou mitochondrial) ne garantit pas la détermination apposée. Il pourrait s'agir d'individus hybrides ou introgressés.

Cette étude a donc un caractère préliminaire, pour laquelle les résultats sont à interpréter avec précaution. En effet, les individus marqués "déterminés" (par exemple, les individus identifiés comme étant de la sous-espèce *Salamandra salamandra fastuosa*) dans le cadre de cette étude pourraient s'avérer être réellement des individus de la sous-espèce pressentie (par exemple : une "vraie" *Salamandra salamandra fastuosa*) ou se révéler être un hybride ou un individu introgressé si les échantillons de la présente étude sont de nouveaux analysés en augmentant le nombre de marqueurs testés.

Par conséquent, il est probable que la présente étude sous-estime le nombre réel d'individus hybrides/introgressés. Pour une meilleure assignation et une caractérisation des niveaux d'hybridation/introgression, l'utilisation de marqueurs multiples de type microsatellites ou SNPs serait à mettre en oeuvre sur les échantillons analysés (et sur des échantillons complémentaires à prélever dans les zones de contacts).



- Arntzen JW, Canestrelli D & Martínez-Solano I (2020). Environmental correlates of the European common toad hybrid zone. *Contributions to Zoology* 89(3): 270-281.
- Asztalos, M, Schultze N, Ihlow F et al. (2020). How often do they do it? An in-depth analysis of the hybrid zone of two grass snake species (*Natrix astreptophora* and *Natrix helvetica*). *Biological Journal of the Linnean Society* 131(4): 756-773.
- Bisconti R, Porretta D, Arduino P et al. (2018). Hybridization and extensive mitochondrial introgression among fire salamanders in peninsular Italy. *Scientific Reports* 8(1): 13187.
- Burgon JD, Vences M, Steinfartz S et al. (2021). Phylogenomic inference of species and subspecies diversity in the Palearctic salamander genus *Salamandra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 157: 107063.
- Carvalho SB, Velo-Anton G, Tarroso P et al. (2017). Spatial conservation prioritization of biodiversity spanning the evolutionary continuum. *Nature ecology & evolution* 1(6): 0151.
- Corse E, Meglécz E, Archambaud G et al. (2017). A from-benchtop-to-desktop workflow for validating HTS data and for taxonomic identification in diet metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources* 17(6): e146-e159.
- Drillon O, Dufresnes G, Perrin N et al. (2019). Reaching the edge of the speciation continuum: hybridization between three sympatric species of tree frogs (*Hyla*). *Biological Journal of the Linnean Society* 126: 43-750.
- Dufresnes C, Wassef J, Ghali K et al. (2013). Conservation phylogeography: does historical diversity contribute to regional vulnerability in European tree frogs (*Hyla arborea*) ? *Molecular Ecology* 22: 5669-5684.
- Dufresnes C, Berroneau M, Dubey S et al. (2020b). The effect of phylogeographic history on species boundaries: a comparative framework in *Hyla* tree frogs. *Scientific Reports* 10: 1-12.
- Dufresnes C, Ghielmi S, Halpern B et al. (2024). Phylogenomic insights into the diversity and evolution of Palearctic vipers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 197: 108095.
- Dufresnes C, Litvinchuk S, Rozenblut-Koscisty B, et al. (2020a). Hybridization and 539 introgression between toads with different sex chromosome systems. *Evolution Letters* 4(5): 444-456.
- Ehl S, Vences M & Veith M (2019). Reconstructing evolution at the community level: a case study on Mediterranean amphibians. *Molecular phylogenetics and evolution* 134: 211-225.
- Gonçalves H, Maia-Carvalho B, Sousa-Neves T et al. (2015). Multilocus phylogeography of the common midwife toad, *Alytes obstetricans* (Anura, Alytidae): contrasting patterns of lineage diversification and genetic structure in the Iberian refugium. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 93: 363-379.
- González A, Dubut V, Corse E et al. (2023). VTAM: A robust pipeline for validating metabarcoding data using controls. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 21: 1151-1156.
- Burgon JD, Vences M, Steinfartz S et al. (2021). Phylogenomic inference of species and subspecies diversity in the Palearctic salamander genus *Salamandra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 157: 107063.
- Lucati F, Miró A, Bosch J et al. (2022). New insights on patterns of genetic admixture and phylogeographic history in Iberian high mountain populations of midwife toads. *PLoS ONE* 17: e0277298.
- Martínez-Freiría F, Freitas I, Zuffi MA et al. (2020). Climatic refugia boosted allopatric diversification in western Mediterranean vipers. *Journal of Biogeography* 47(8): 1698-1713.
- Martínez-Freiría I, Freitas G, Velo-Anton N et al. (2021). Brito, Integrative taxonomy reveals two species and intraspecific differentiation in the *Vipera latastei-monticola* complex. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 59: 2278-2306.
- Pokrant F, Kindler C, Ivanov M et al. (2016). Integrative taxonomy provides evidence for the species status of the Ibero-Maghrebian grass snake *Natrix astreptophora*. *Biological Journal of the Linnean Society* 118(4): 873-888.
- Recuero E, Canestrelli D, Vörös J et al (2012). Multilocus species tree analyses resolve the radiation of the widespread *Bufo bufo* species group (Anura, Bufonidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 62(1): 71-86.
- Sánchez-Montes G, Recuero E, Barbosa AM et al. (2019). Complementing the Pleistocene biogeography of European amphibians: Testimony from a southern Atlantic species. *Journal of Biogeography* 46(3): 568-583.
- Sánchez-Montes G, Recuero E, Marcia Barbosa A et al. (2019). Complementing the Pleistocene biogeography of European amphibians: Testimony from a southern Atlantic species. *Journal of Biogeography* 46: 568-583.
- Schnell IB, Bohmann K & Gilbert MTP (2015). Tag jumps illuminated—reducing sequence-to-sample misidentifications in metabarcoding studies. *Molecular ecology resources* 15(6): 1289-1303.
- Stöck M, Dubey S, Klütsch C et al. (2008). Mitochondrial and nuclear phylogeny of circum-Mediterranean tree frogs from the *Hyla arborea* group. *Molecular phylogenetics and evolution* 49(3): 1019-1024.
- Stöck M, Dufresnes C, Litvinchuk SN et al. (2012). Cryptic diversity among Western Palearctic tree frogs: postglacial range expansion, range limits, and secondary contacts of three European tree frog lineages (*Hyla arborea* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 1-9.
- Thomasdotter A, Shum P, Mugnai F et al. (2023). Spineless and overlooked: DNA metabarcoding of autonomous reef monitoring structures reveals intra- and interspecific genetic diversity in Mediterranean invertebrates. *Molecular Ecology Resources* 23(7): 1689-1705.
- Trujillo T, Gutiérrez-Rodríguez J, Arntzen JW et al. (2017). Morphological and molecular data to describe a hybrid population of the Common toad (*Bufo bufo*) and the Spined toad (*Bufo spinosus*) in western France. *Contributions to Zoology* 86(1): 1-9.
- Ursenbacher S, Conelli A, Golay P et al. (2006). Phylogeography of the asp viper (*Vipera aspis*) inferred from mitochondrial DNA sequence data: evidence for multiple Mediterranean refugial areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38(2): 546-552.
- Vences M, Sanchez E, Hauswaldt JS et al. (2014). Nuclear and mitochondrial multilocus phylogeny and survey of alkaloid content in true salamanders of the genus *Salamandra* (Salamandridae). *Molecular phylogenetics and evolution* 73: 208-216.
- Vliegenthart C, van de Vrede M, den Boer I et al. (2022). The limits of mtDNA analysis for determining the provenance of invasive species: a midwife toad example. *Amphibia-Reptilia* 44: 27-33.

Remerciements

La SHF et ses partenaires souhaitent exprimer leur profonde gratitude envers Philippe Geniez pour son engagement dans le projet et son aide précieuse dans la coordination des échantillons de la collection BEV du CEFE de Montpellier. Un grand merci également à Pierre-André Crochet et Christophe Dufresnes pour leur précieuse assistance dans la mise en œuvre du projet, et dans la mutualisation des données auprès de collègues chercheurs.

La SHF souhaite également remercier chaleureusement toutes les personnes ayant participé à la récolte des échantillons sur l'ensemble du territoire.

Les analyses génétiques réalisées par ADENKO ont été conduites au sein du Service Commun de Biologie Moléculaire de l'IMBE (Aix-Marseille Université).

Financements

Cette étude a pu être réalisée grâce au soutien financier du Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des territoires, de l'Unité d'appui et de recherche PatriNat et de l'Inventaire national du patrimoine naturel.

Citation recommandée

Trochet A, Dubut V, Dufresnes C, Geniez P, Crochet PA (2024). Mise à jour de la répartition des nouvelles espèces d'amphibiens et de reptiles présentes en France hexagonale. Société herpétologique de France, Paris. 34 pp.



REMERCIEMENTS



**MINISTÈRE
DE LA TRANSITION
ÉCOLOGIQUE
ET DE LA COHÉSION
DES TERRITOIRES**

*Liberté
Égalité
Fraternité*



Crédit photos Matthieu Berroneau
Damien Troquereau
Gilles Pottier