



# DNA environmental

## Detection of Exotic Species Bull Frog

Sologne  
2014

### Financial partners :



Team CDPNE :  
Gabriel Michelin  
Estelle Duchemann



Environnement et société : l'expert de vos projets



Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement

34, avenue Maunoury – 41 000 Blois – Tél. : 02 54 51 56 70 – Fax : 02 54 51 56 71 – [cdpne@wanado.fr](mailto:cdpne@wanado.fr) –

## Table of Contents

|      |                                                     |                                    |
|------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|
| I.   | Context of the study.....                           | 4                                  |
| II.  | Equipment end methods.....                          | 4                                  |
| III. | Results .....                                       | 6                                  |
| 1.   | DNA Detection .....                                 | 6                                  |
| 2.   | Classical detection .....                           | 6                                  |
| IV.  | Bull frog's impact to amphibian's community.....    | 7                                  |
| 3.   | Evaluation des 3 catégories d'étangs.....           | 11                                 |
| 4.   | Other results on the no detection of Bull frog .... | <b>Erreur ! Signet non défini.</b> |
| V.   | Conclusion.....                                     | 13                                 |
|      | Annexes .....                                       | <b>Erreur ! Signet non défini.</b> |
|      | Rapports SPYGEN.....                                | 16                                 |

## Table of Illustration

|                                                                                   |                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Figure 1 : Map of distribution of the analyzed sites .....                        | <b>Erreur ! Signet non défini.</b> |
| Figure 2 : Map of distribution of the analyzed sites and the positive sites ..... | 6                                  |
| Figure 4 : Pond little Epinay .....                                               | 7                                  |
| Figure 5 : Localization og Groups A-B-C ADNe 2014 .....                           | 8                                  |
| Figure 7 : Box plots .....                                                        | 11                                 |
| Tableau 1 : Données des Groupes A-B-C analyses ADNe 2014 .....                    | 9                                  |
| Tableau 2 : Not colonized sites .....                                             | 13                                 |
| Tableau 3 : Results DNAe 2014.....                                                | 15                                 |

## I. Context of the study

The Bull frog, is a specie of the North of the Nord America. She was introduced by human in Europe.

In Sologne, Bull frog created problems on the ecosystems when it colonised. She has a very vast diet and it's healthy carrier of a disease which it transmits in the others amphibians.

Discovered in 2002, since, many actions were established by **Departmental Committee of the Nature Conservation and the Environment** (Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement in french – CDPNE), with **ONCFS** (french institution to the protection of the wild nature) and **SEBB** (french institution restauration of rivers).

After 11 years of actions, the density of reproductive adults decreased, **9 adults for 2 adults by aquatic site. Same report to the weight, 471 at 197g.**

**So the eradication began** but it supposes **premature interventions** on the aquatic site.

The premature detection of the species is a priority. We use a classical method of visual and hearing detection of the species and a more precise detection by the environmental DNA

## II. Equipment end methods

Method is based to the obstinacy of the DNA. The environmental DNA brings a temporal and financial gain to compared with the day before environmental classic.

This method detect the Bull frog because it deposits DNA in the water.

Water's Taking in aquatic site like this photo 1 are realized.

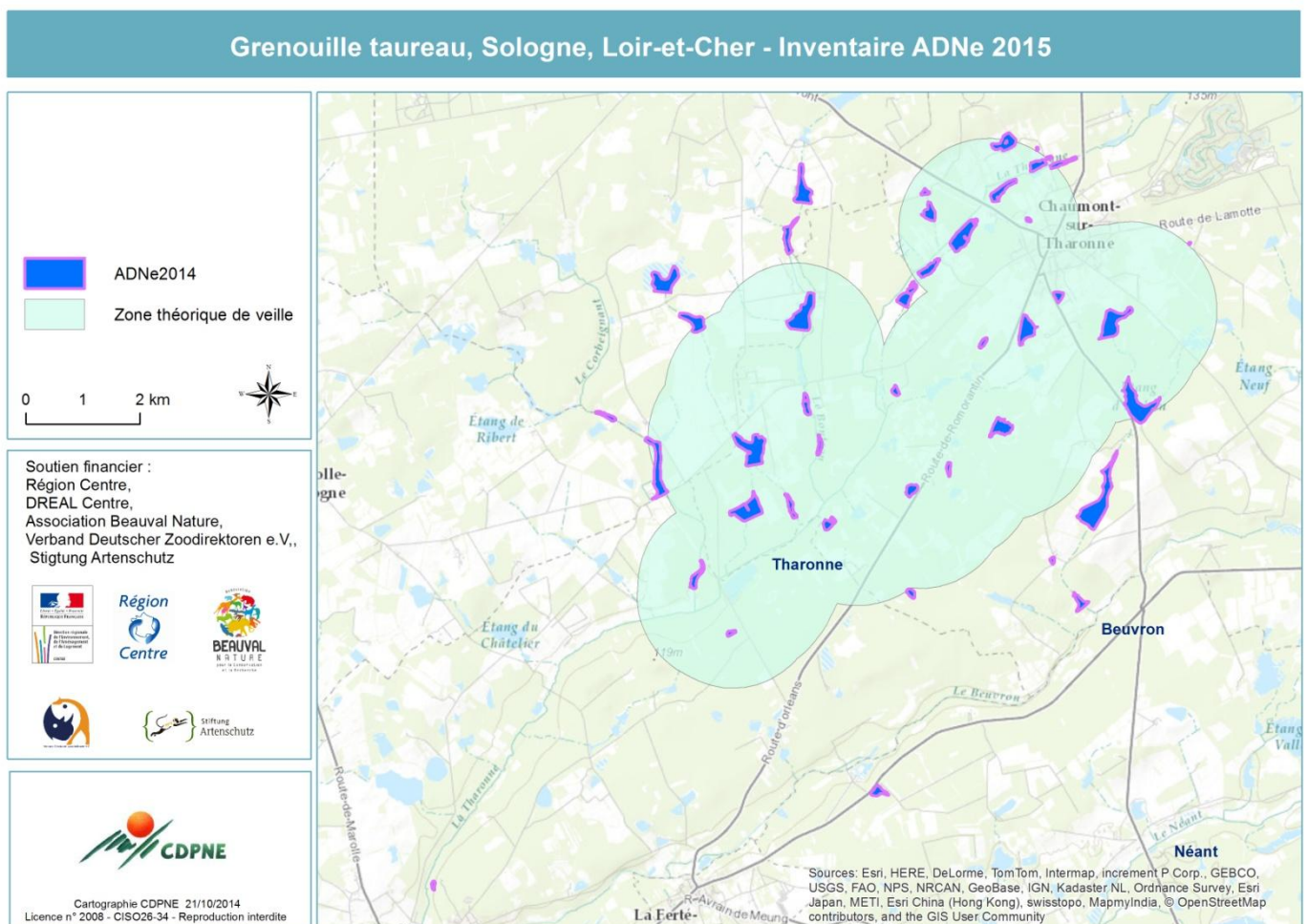


Photo 1 : Water's takings

**43 ponds were analyzed, 29 to the detection Bull frog and 14 to the detection all frog species.**

In 2014, we had two objectives, the premature detection on the periphery of the colonized zone and verify the impact of the Bull frog on the other native species.

We made a single session of water sampling by team of 2 persons for security reasons. 8 days were required: (June 17, 25, 26, 27, 30 and July 1, 3 and 4).



**Figure 1 : Distribution map of analyzed sites**



### III. Results

#### 1. DNA Detection

In 2014, 43 aquatic sites were analyzed in Sologne.

**3 ponds have a positive result to Bull frog DNA.**

- Pond Chancay Noth
- Pond Genièvre
- Pond of the Busonnière

*The method DNA allows to plan the move of invasive population*

#### 2. Classical detection

At the same time, a classical detection was made, and 5 ponds revealed positive in to the presence of the Bull frog.

- Pond Noues de Bry 35.1
- Pond Thibergères
- Pond of stag
- Pond Maître Jean
- Pond Ambon

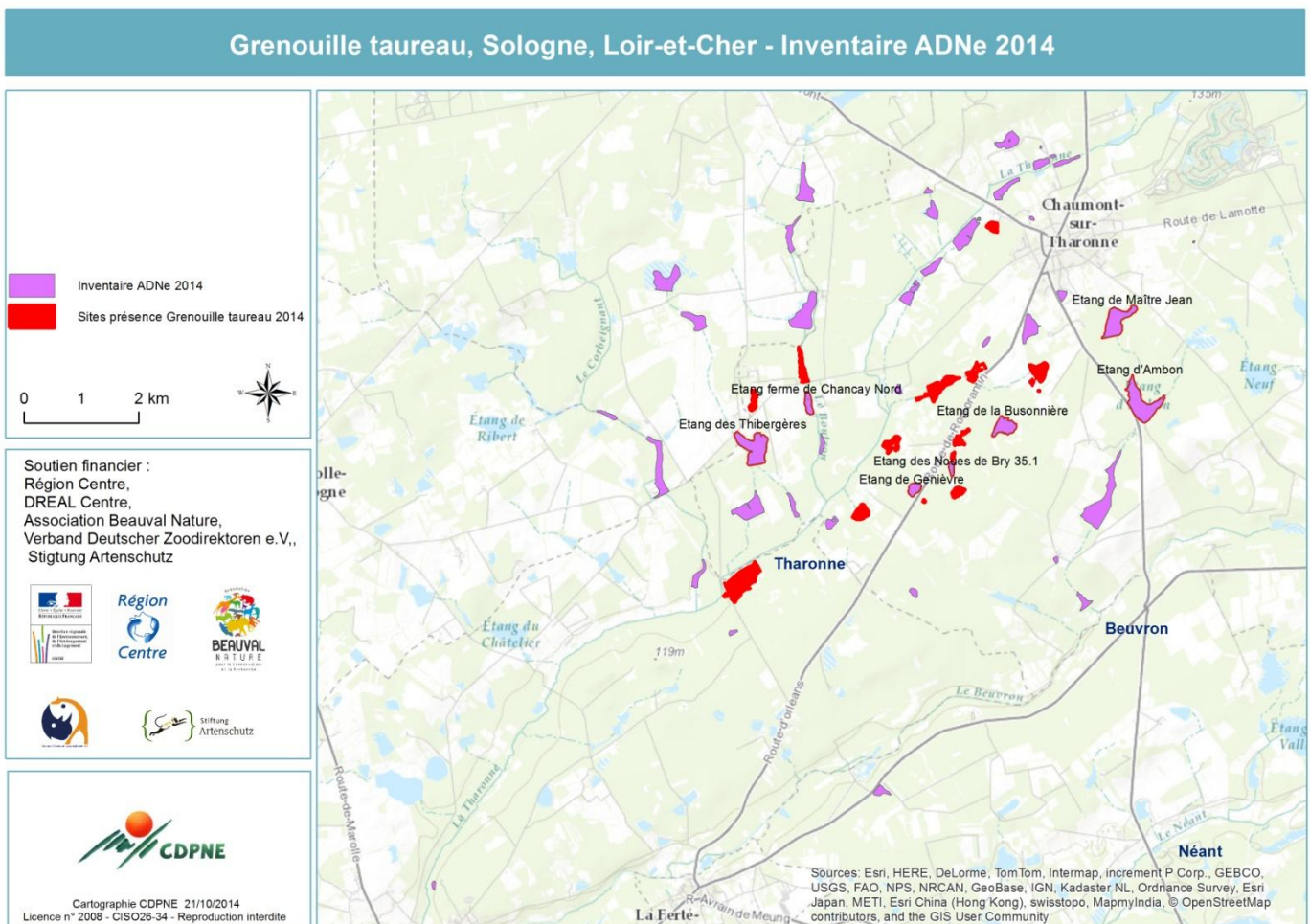


Figure 2 : Distribution map of analyzed and positive sites

#### IV. Bull frog's impact to amphibian's community

**14 ponds were analyzed to detect the DNA amphibian, native and exotic.**

The 14 ponds were selectionned in 3 categories

- Never colonized by the Bull frog (5 ponds),
- Colonized in past by Bull frog but not actually (5 ponds),
- Actually colonized by Bull frog (4 ponds).



Figure 3 : Pond little Epinay



# Grenouille taureau, Sologne, Loir-et-Cher - Inventaire ADN 2014

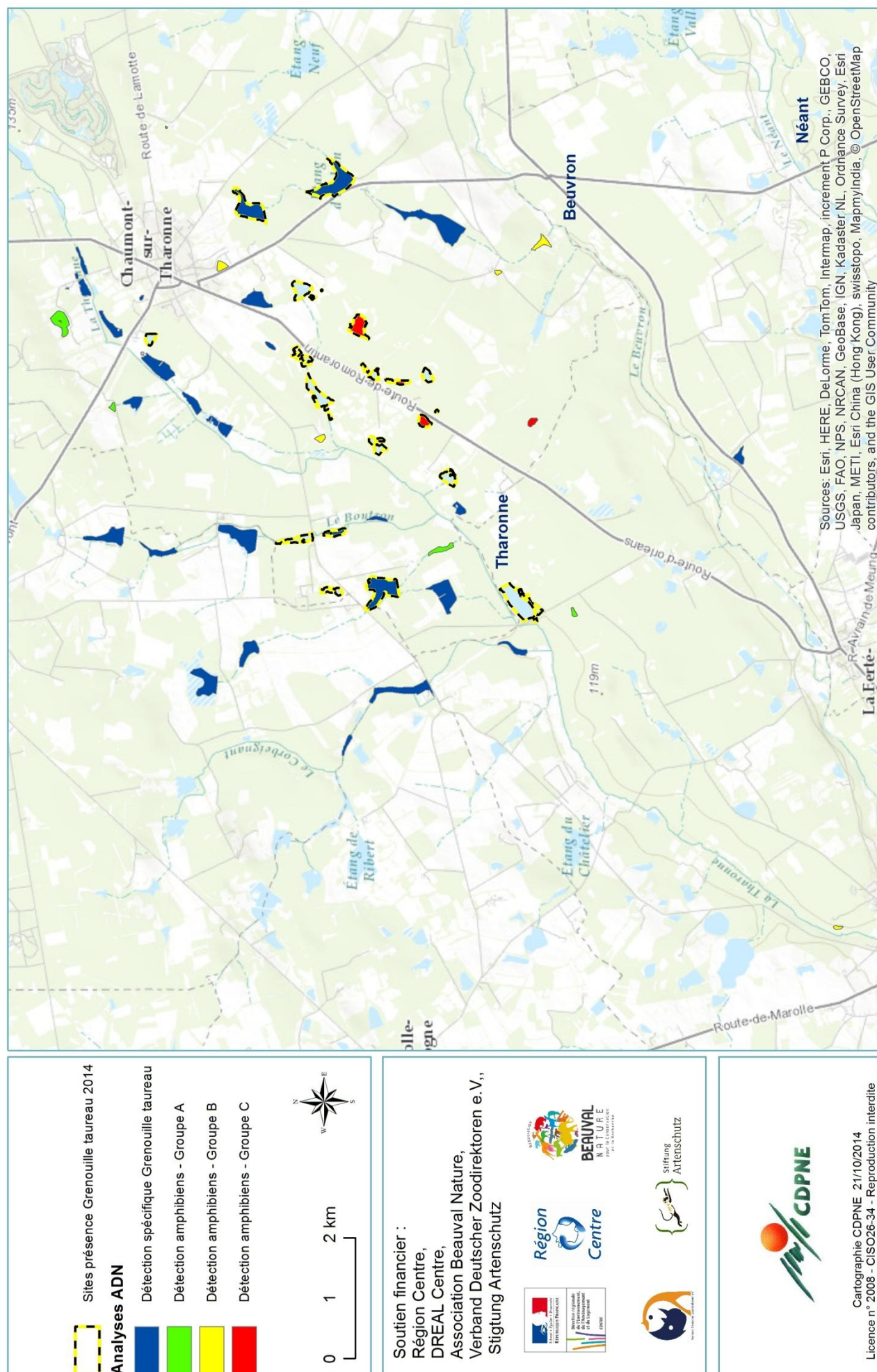


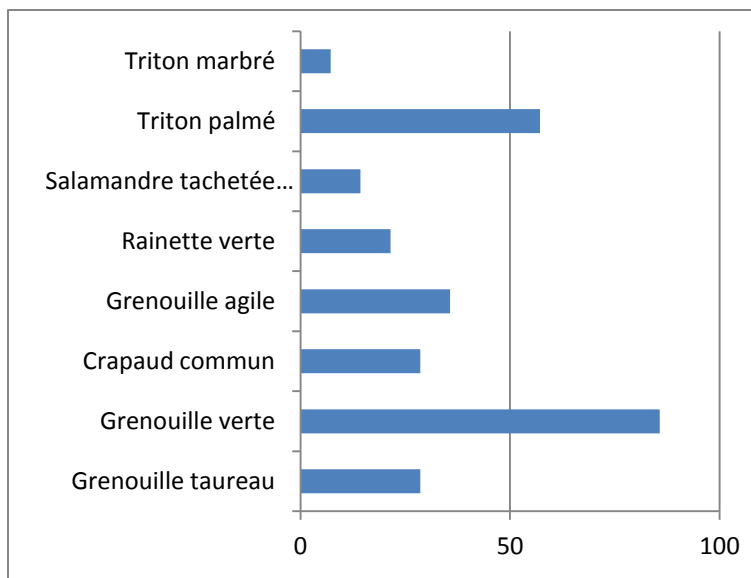
Figure 4 : Localization of Groups A-B-C DNAe 2014



Table 1 : Results of Groupes A-B-C analyses DNAe 2014

| ADNe communauté amphibien | Nom                                            | Nb KIT | Grenouille taureau – <i>Lithobates catesbeianus</i> | Grenouille verte – <i>Pelophylax spp.</i> | Crapaud commun – <i>Bufo bufo</i> | Grenouille agile – <i>Rana dalmatina</i> | Rainette verte – <i>Hyla arborea</i> | Salamandre tachetée terrestre – <i>Salamandra terrestris</i> | Triton palmé – <i>Lissotriton helveticus</i> | Triton marbré – <i>Triturus marmoratus</i> | Number native species |
|---------------------------|------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|
| A                         | Grand étang ferme de Mardelay (Pt 122)         | 2      | 0                                                   | oui                                       | oui                               | oui                                      | oui                                  |                                                              | oui                                          | 0                                          | 5                     |
| A                         | Etang carrière des Thibergères                 | 2      | 0                                                   | oui                                       | 0                                 | 0                                        | 0                                    | 0                                                            | oui                                          | 0                                          | 2                     |
| A                         | Etang du Saule                                 | 1      | 0                                                   | oui                                       | oui                               | oui                                      | 0                                    | 0                                                            | oui                                          | 0                                          | 4                     |
| A                         | Etang N 12 Sud Vilcou (pt 113)                 | 1      | 0                                                   | oui                                       | oui                               | 0                                        | 0                                    | oui                                                          | oui                                          | 0                                          | 4                     |
| A                         | Mares le Grand Vaulier                         | 1      | 0                                                   | oui                                       | 0                                 | oui                                      | oui                                  | oui                                                          | oui                                          | oui                                        | 6                     |
| B                         | Etang des Bertonnières                         | 2      | 0                                                   | 0                                         | 0                                 | 0                                        | 0                                    | 0                                                            | 0                                            | 0                                          | 0                     |
| B                         | Etang communal de Chaumont sur Tharonne pt 122 | 1      | 0                                                   | 0                                         | 0                                 | 0                                        | 0                                    | 0                                                            | 0                                            | 0                                          | 0                     |
| B                         | Etang de la Maselle                            | 1      | 0                                                   | oui                                       | 0                                 | 0                                        | 0                                    | 0                                                            | 0                                            | 0                                          | 1                     |
| B                         | Etang Courton                                  | 1      | 0                                                   | oui                                       | 0                                 | oui                                      | 0                                    | 0                                                            | oui                                          | 0                                          | 3                     |
| B                         | Etang ferme de Courcelle                       | 1      | 0                                                   | oui                                       | 0                                 | oui                                      | oui                                  | 0                                                            | oui                                          | 0                                          | 4                     |
| C                         | Etang genièvre                                 | 2      | oui                                                 | oui                                       | oui                               | 0                                        | 0                                    | 0                                                            | 0                                            | 0                                          | 2                     |
| C                         | Etang de la Busonnière                         | 2      | oui                                                 | oui                                       | 0                                 | 0                                        | 0                                    | 0                                                            | 0                                            | 0                                          | 1                     |
| C                         | Etang des Noues de Bry N 35.1                  | 1      | NON                                                 | oui                                       | 0                                 | 0                                        | 0                                    | 0                                                            | oui                                          | 0                                          | 2                     |
| C                         | Mare aux cerfs                                 | 1      | NON                                                 | oui                                       | 0                                 | 0                                        | 0                                    | 0                                                            | 0                                            | 0                                          | 1                     |

8 species were detected on the 14 ponds.



*Triturus marmoratus*



*Salamandra terrestris*



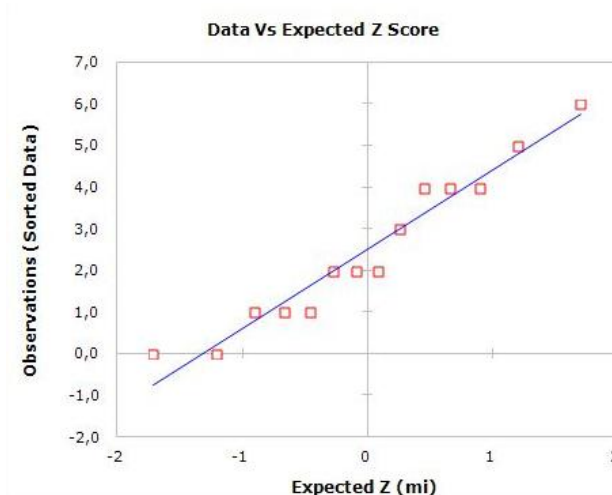
*Bufo Bufo*

***Pelophylax spp.* or *Grenouille verte*** in French, is a popular amphibian on ponds with ***Lissotriton helveticus***.

| Groupes | Nom                                     | Number native species |
|---------|-----------------------------------------|-----------------------|
| A       | Grand étang ferme de Mardelay           | 5                     |
| A       | Etang carrière des Thibergères          | 2                     |
| A       | Etang du Saule                          | 4                     |
| A       | Etang N 12 Sud Vilcou (pt 113)          | 4                     |
| A       | Mares le Grand Vaulier                  | 6                     |
| B       | Etang des Bertonnières                  | 0                     |
| B       | Etang communal de Chaumont sur Tharonne | 0                     |
| B       | Etang de la Maselle                     | 1                     |
| B       | Etang Courton                           | 3                     |
| B       | Etang ferme de Courcelle                | 4                     |
| C       | Etang genièvre                          | 2                     |
| C       | Etang de la Busonnière                  | 1                     |
| C       | Etang des Noues de Bry N 35.1           | 2                     |
| C       | Mare aux cerfs                          | 1                     |

N = 14, Average = 2.5, Médian = 2.0, Standard deviation = 1.871, Variance = 3.5, p-value = 0.39461

**The result distribution is a normal distribution**

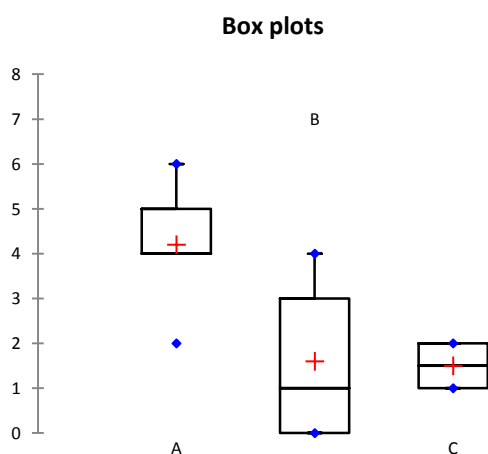


### 3. Evaluation des 3 catégories d'étangs

We verified if there is a difference between 3 categories of ponds.

| Groupes               | A    | B    | C    |
|-----------------------|------|------|------|
| Number native species | 5    | 0    | 2    |
|                       | 2    | 0    | 1    |
|                       | 4    | 1    | 2    |
|                       | 4    | 3    | 1    |
|                       | 6    | 4    | NA   |
| average               | 4,2  | 1,6  | 1,5  |
| median                | 4    | 1    | 1,5  |
| Standard deviation    | 1,48 | 1,82 | 0,58 |
| Variance              | 2,2  | 3,3  | 0,33 |

Below, a graphical representation of 3 groups using boxplots method.



**Ponds A** (never Bull frog) is different to groups B and C. We have verify if 3 groups are significantly different.

| Contraste | Difference | Difference standardised | Critical Value | Pr > Diff    | Significatif |
|-----------|------------|-------------------------|----------------|--------------|--------------|
| A vs C    | 2,700      | 2,783                   | 2,701          | <b>0,043</b> | <b>Oui</b>   |
| A vs B    | 2,600      | 2,843                   | 2,701          | <b>0,039</b> | <b>Oui</b>   |
| B vs C    | 0,100      | 0,103                   | 2,701          | <b>0,994</b> | <b>Non</b>   |

- **Comparison between group A and group B**

**p-value 0,039**, below 0.05.

Groups are statically different.

- **Comparison between group A and group C**

**p-value 0,043.**, below 0.05.

Groups are statically different.

- **Comparison between group B and group C**

p-value 0,994

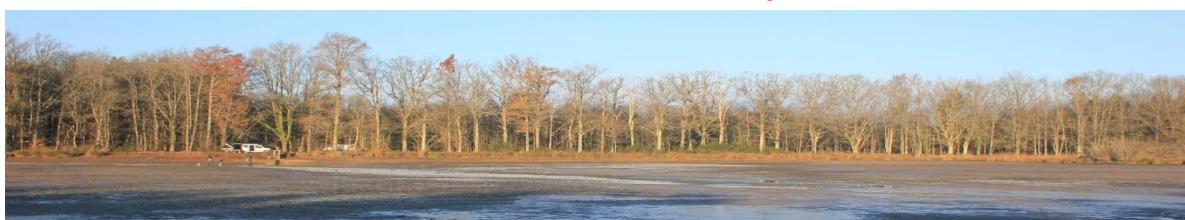
We cannot say that both groups are different.

The number of species for group A **4.2** (average).

The number of species for group B **1.6** (average).

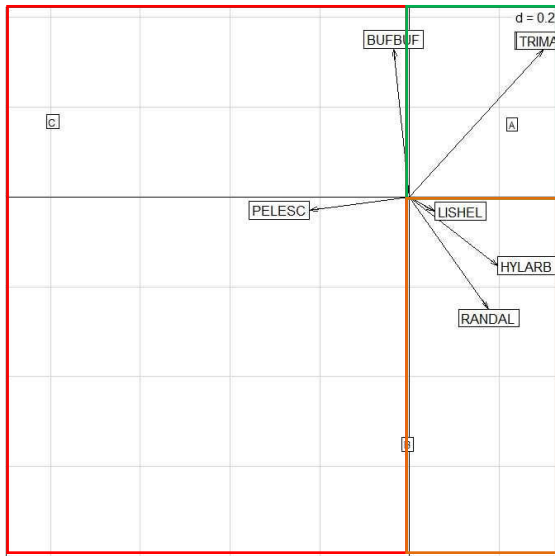
The number of species for group C **1.5** (average).

**The Bull frog decrease number of native species.**





Results can also be displayed differently.



- PELESC : *Pelophylax spp.*
- BUFBUF : *Bufo Bufo*
- TRIMAR : *Triturus marmoratus*

- LISHEL : *Lissotriton helveticus*
- HYLARB : *Hyla arborea*
- RANDAL : *Rana dalmatina*

Only *Pelophylax spp.* is represented in the group C instead of *Hyla arborea*, *Rana dalmatina*, *Lissotriton helveticus* and *Triturus marmoratus* found in other groups.

**So, we observe a simplification of the amphibian's population when the Bull frog colonizes a pond.**

## 4. Other results on the no detection of Bull Frog

Table 2 : Non-colonized sites

| Nom                                  | Date de colonization |
|--------------------------------------|----------------------|
| Pond Auteroche                       | 2003                 |
| Pond castle of Villebourgeon         | 2011                 |
| Pond Thibergères / Milberlan         | 2009                 |
| Pond castle of Yvoy-le-Marron        | 2010                 |
| Pond of Villiers                     | 2008                 |
| Pond of Farinard                     | 2010                 |
| Pond of Passée                       | 2012                 |
| Pond of Moulin                       | 2010                 |
| Pond of the canardière               | 2010                 |
| Pond face sud Autroche               | 2011                 |
| Pond Villiers cote farm              | 2009                 |
| Pond of Bertonnières                 | 2008                 |
| Pond of the Source                   | 2003                 |
| Pond farm to Chancay SUD             | 2009                 |
| Pond of Chaumont sur Tharonne pt 122 | 2011                 |
| Pond of the Maselle                  | 2003                 |
| Pond Courton                         | 2007                 |
| Pond farm to Courcelle               | 2003                 |

18 ponds having been colonized by the Bull frog in the past are actually not colonized.

*The DNAe method can judge the efficiency of the operation of eradication*

## V. Conclusion

The classical method of detection and the DNAe method are two complementary methods to the Bull frog's detection.

It's necessary to use the DNA method on the big pond and the classical method on the little pond but the use of both is essential.

In 2014, analyses of the amphibian DNA on 14 ponds proved the Bull frog's impact on the biodiversity.

# Appendix

Tableau 3 : Results DNAe 2014

| ADNe communauté amphibien | Nom                                            | Date de colonisation | Surface (m²) | Périmètre (m) | DN spécifique Grenouille taureau | ADNe communauté amphibien | Nb KIT | Ref. Kit | Date terrain | Grenouille taureau | Grenouille verte | Crapaud commun | Grenouille agile | Rainette verte | Salamandre tachetée terrestre | Triton palmé | Triton marbré |
|---------------------------|------------------------------------------------|----------------------|--------------|---------------|----------------------------------|---------------------------|--------|----------|--------------|--------------------|------------------|----------------|------------------|----------------|-------------------------------|--------------|---------------|
| 1                         | 1 Etang Autochoche                             | 2003                 | 106609       | 2321          | 6                                | 6                         | 931    | 932      | 933          | 928                | 927              | 930            | 25/06/2014       |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang du Chateau de Villebourgeon            | 2011                 | 55712        | 1845          | 5                                | 5                         | 929    | 934      | 935          | 936                | 937              | 25/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang d'Ambon                                | 2010                 | 81375        | 1749          | 5                                | 5                         | 952    | 953      | 954          | 955                | 960              | 03/07/2014     | oui              |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang des Thibergeres ou Miberlan            | 2009                 | 77194        | 1537          | 5                                | 5                         | 978    | 979      | 980          | 981                | 982              | 30/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang Chateau de la Motte ilot               | 0                    | 52003        | 1388          | 2                                | 2                         | 946    | 947      |              |                    |                  | 26/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang de maître Jean                         | 2011                 | 61229        | 1363          | 3                                | 3                         | 957    | 958      | 959          |                    |                  | 03/07/2014     | oui              |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang des Thibergeres pt 107                 | 0                    | 58927        | 1336          | 3                                | 3                         | 956    | 962      | 970          |                    |                  | 03/07/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang des chateaux de Yvoy-le-Marron         | 2010                 | 71282        | 1298          | 3                                | 3                         | 917    | 918      | 943          |                    |                  | 26/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang de Villiers                            | 2008                 | 19368        | 1237          | 3                                | 3                         | 940    | 941      | 942          |                    |                  | 25/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang Bas                                    | 0                    | 46029        | 1216          | 3                                | 3                         | 924    | 925      | 926          |                    |                  | 26/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang des Oiseaux                            | 0                    | 53292        | 1206          | 3                                | 3                         | 919    | 920      | 921          |                    |                  | 26/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang de Farinard                            | 2010                 | 22683        | 1089          | 3                                | 3                         | 916    | 922      | 923          |                    |                  | 26/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang de la Passee                           | 2012                 | 39246        | 952           | 2                                | 2                         | 968    | 969      |              |                    |                  | 01/07/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang le Moulin                              | 2010                 | 24722        | 937           | 2                                | 2                         | 964    | 965      |              |                    |                  | 03/07/2014     |                  |                |                               |              |               |
| 1                         | Grand etang ferme de Mardelay (Pt 122)         | 0                    | 32199        | 894           | 2                                | 2                         | 991    | 992      |              |                    |                  | 17/06/2014     | 0                | oui            | oui                           | oui          |               |
|                           | 1 Etang publique de la Brosse                  | 0                    | 33157        | 889           | 2                                | 2                         | 872    | 915      |              |                    |                  | 26/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang des Anglais (de la canardiere 32)      | 2010                 | 17195        | 853           | 2                                | 2                         | 961    | 986      |              |                    |                  | 30/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
| 1                         | Etang genievre                                 | 2002                 | 13927        | 841           | 2                                | 2                         | 990    | 996      |              |                    |                  | 03/07/2014     | oui              | oui            |                               |              |               |
|                           | 1 Etang face sud Autroche                      | 2011                 | 13035        | 750           | 2                                | 2                         | 951    | 966      |              |                    |                  | 04/07/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang communal la Grenouillere               | 0                    | 12330        | 723           | 2                                | 2                         | 949    | 950      |              |                    |                  | 17/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang Villiers cote ferme                    | 2009                 | 20997        | 716           | 2                                | 2                         | 976    | 977      |              |                    |                  | 01/07/2014     |                  |                |                               |              |               |
| 1                         | Etang carrière des Thibergeres                 | 0                    | 13064        | 701           | 2                                | 2                         | 1000   | 1001     |              |                    |                  | 03/07/2014     | oui              |                |                               | oui          |               |
| 1                         | Etang de la Busonnière                         | 2004                 | 13064        | 701           | 2                                | 2                         | 988    | 989      |              |                    |                  | 03/07/2014     | oui              | oui            |                               |              |               |
| 1                         | Etang des Bertonnières                         | 2008                 | 13259        | 665           | 2                                | 2                         | 1004   | 1005     |              |                    |                  | 27/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
| 1                         | Etang ferme de Chancay NORD                    | 2009                 | 12964        | 617           | 2                                | 2                         | 985    | 987      |              |                    |                  | 30/06/2014     | oui              |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang de la Source                           | 2003                 | 12313        | 574           | 2                                | 2                         | 967    | 971      |              |                    |                  | 01/07/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang le Mardelay                            | 0                    | 15844        | 553           | 1                                | 1                         | 948    |          |              |                    |                  | 17/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang ferme de Chancay SUD                   | 2009                 | 8338         | 531           | 2                                | 2                         | 983    | 984      |              |                    |                  | 30/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang de Corbeignat                          | 0                    | 9231         | 410           | 1                                | 1                         | 938    |          |              |                    |                  | 27/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
| 1                         | Etang communal de Chaumont sur Tharonne pt 122 | 2011                 | 9326         | 387           | 1                                | 1                         | 1006   |          |              |                    |                  | 27/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
| 1                         | Etang des Noudes de Bry N 35.1                 | 2002                 | 6105         | 372           | 1                                | 1                         | 992    |          |              |                    |                  | 04/07/2014     | oui              |                |                               | oui          |               |
| 1                         | Mare aux cerfs                                 | 2002                 | 7266         | 327           | 1                                | 1                         | 993    |          |              |                    |                  | 03/07/2014     | oui              | oui            |                               |              |               |
| 1                         | Etang de la Maselle                            | 2003                 | 6471         | 321           | 1                                | 1                         | 993    |          |              |                    |                  | 01/07/2014     |                  | oui            |                               |              |               |
|                           | Etang du Saule                                 | 0                    | 4342         | 282           | 1                                | 1                         | 998    |          |              |                    |                  | 25/06/2014     | oui              | oui            |                               | oui          |               |
| 1                         | Etang N 12 Sud Vilcou (pt 113)                 | 0                    | 4294         | 276           | 1                                | 1                         | 1003   |          |              |                    |                  | 25/06/2014     | oui              | oui            | oui                           | oui          |               |
| 1                         | Etang Courton                                  | 2007                 | 3415         | 252           | 1                                | 1                         | 999    |          |              |                    |                  | 30/06/2014     | oui              | oui            |                               | oui          |               |
| 1                         | Etang ferme de Courcelle                       | 2003                 | 3179         | 217           | 1                                | 1                         | 1002   |          |              |                    |                  | 27/06/2014     | oui              | oui            | oui                           | oui          |               |
|                           | 1 Etang ferme de Molinois                      | 0                    | 26318        | 1128          | 4                                | 4                         | 972    | 973      | 974          | 975                |                  | 04/07/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Mare 1 le Mardelay (proche ferme)            | 0                    | 513          | 102           | 1                                | 1                         | 939    |          |              |                    |                  | 17/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Mare 2 le Mardelay (proche entrée)           | 0                    | 2090         | 192           | 1                                | 1                         | 944    |          |              |                    |                  | 17/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
|                           | 1 Etang le Petit Epinay                        | 0                    | 5695         | 324           | 1                                | 1                         | 945    |          |              |                    |                  | 25/06/2014     |                  |                |                               |              |               |
| 1                         | Mares le Grand Vaulier                         | 0                    | 579          | 114           | 1                                | 1                         | 997    |          |              |                    |                  | 03/07/2014     | oui              | oui            | oui                           | oui          | oui           |
| 1                         | Etang le charmois                              | 0                    | 2021         | 171           | 1                                | 1                         | 963    |          |              |                    |                  | 03/07/2014     |                  |                |                               |              |               |
| 14                        | 29                                             |                      | Nombre kits  | 74            | 19                               | 91                        |        |          |              |                    |                  |                |                  |                |                               |              |               |





---

## RAPPORT D'ANALYSES

Détection de la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*)  
grâce à l'ADN environnemental

*CDPNE – Août 2014*

---

[www.spygen.com](http://www.spygen.com)



## 1°) Description du projet :

**Code étude :** DE140016

**Client :** Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement de Loir et Cher

- **Adresse :** CDPNE, 34 Avenue Maunoury, Cité administrative, 41000 BLOIS
- **Contact :** Gabriel MICHELIN
- **Téléphone :** 02 54 51 56 70 - **Email :** gabrielmichelin.cdpne@orange.fr

**Responsables de l'étude :** Pauline Jean (Chef de projets) – pauline.jean@spygen.com

**Type d'analyse :** Détection d'espèces cibles en milieu aquatique stagnant grâce à l'ADN environnemental

**Espèce cible :** Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*)

**Nombre de sites :** 83

## 2°) Protocole d'analyse et contrôle qualité :

Les analyses ont été effectuées en suivant le protocole Ficetola *et al.* 2008. Les extractions ont été réalisées dans une salle dédiée à l'étude de l'ADN rare ou dégradé. À chaque étape du protocole des témoins négatifs ont été analysés en parallèle aux échantillons, afin de contrôler la pureté des consommables utilisés et de détecter d'éventuelles contaminations croisées au cours de la manipulation (*cf. extraction (-) & PCR (-) dans Contrôles qualité*). Une amplification de l'ADN, par quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), a été effectuée avec un couple d'amorces spécifiques à la Grenouille taureau. Des contrôles positifs (tissus provenant de l'espèce cible) ont été analysés au cours de cette dernière étape afin de contrôler les conditions d'amplification (*cf. PCR (+) dans Contrôles qualité*).

### ➤ Contrôles qualité :

| Type de contrôle | Nombre | Résultat | Commentaires                                    |
|------------------|--------|----------|-------------------------------------------------|
| Extraction (-)   | 5      | Négatif  | Aucune contamination détectée lors de l'analyse |
| PCR (-)          | 4      | Négatif  |                                                 |
| PCR (+)          | 8      | Positif  | Conditions d'amplification optimales            |

### 3°) Résultats :

| N° échantillon | Détection Grenouille taureau | Nombre répliquats positifs |
|----------------|------------------------------|----------------------------|
| WS1400872      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400915      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400916      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400917      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400918      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400919      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400920      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400921      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400922      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400923      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400924      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400925      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400926      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400927      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400928      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400929      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400930      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400931      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400932      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400933      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400934      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400935      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400936      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400937      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400938      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400939      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400940      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400941      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400942      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400943      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400944      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400945      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400946      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400947      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400948      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400949      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400950      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400951      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400952      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400953      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400954      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400955      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400956      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400957      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400958      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400959      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400960      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400961      | NON                          | 0/12                       |
| WS1400962      | NON                          | 0/12                       |

2/3

Détection de la Grenouille taureau grâce à l'ADN environnemental - CDPNE - Août 2014

| N° échantillon   | Détection Grenouille taureau | Nombre réplicats positifs |
|------------------|------------------------------|---------------------------|
| WS1400963        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400964        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400965        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400966        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400967        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400968        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400969        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400970        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400971        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400972        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400973        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400974        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400975        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400976        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400977        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400978        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400979        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400980        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400981        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400982        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400983        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400984        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400985        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400986        | NON                          | 0/12                      |
| <b>WS1400987</b> | <b>OUI</b>                   | <b>1/12</b>               |
| WS1400991        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400992        | NON                          | 0/12                      |
| WS1400998        | NON                          | 0/12                      |
| WS1401000        | NON                          | 0/12                      |
| WS1401001        | NON                          | 0/12                      |
| WS1401002        | NON                          | 0/12                      |
| WS1401003        | NON                          | 0/12                      |
| WS1401004        | NON                          | 0/12                      |
| WS1401005        | NON                          | 0/12                      |

#### 4°) Commentaires :

La persistance de l'ADN environnemental dans un écosystème d'eau douce est d'environ 15 jours (Dejean et al. 2011). Pour le site où la présence de la Grenouille taureau a été détectée, cela signifie donc que l'espèce était présente lors de l'échantillonnage ou au maximum 15 jours avant la réalisation des prélèvements d'eau.

Le protocole d'échantillonnage a été optimisé pour permettre la détection d'un individu peu mobile sur un site dont la surface est inférieure ou égale à un hectare. Sur des sites nouvellement colonisés par la Grenouille taureau ou sur lesquels des actions de lutte ont été menées, l'espèce peut être présente à une très faible densité de population. Sur les plans d'eau de grande taille (> 1 ha), nous recommandons donc d'augmenter le nombre de prélèvements (à définir selon la taille et la typologie du site).

Les extraits d'ADN seront conservés pendant 6 mois dans nos locaux avant d'être éliminés ou bien renvoyés chez le client sur demande et à ses frais.

3/3

Détection de la Grenouille taureau grâce à l'ADN environnemental - CDPNE - Août 2014



---

## RAPPORT D'ANALYSES

eDNA Metabarcoding pour l'inventaire des Amphibiens  
en milieu aquatique stagnant

*CDPNE – Octobre 2014*

---

[www.spygen.com](http://www.spygen.com)





## 1°) Description du projet :

**Code étude :** DE140016

**Cliant :** Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement de Loir et Cher

- **Adresse :** CDPNE, 34 Avenue Maunoury, Cité administrative, 41000 BLOIS
- **Contact :** Gabriel MICHELIN
- **Téléphone :** 02 54 51 56 70 - **Email :** gabrielmichelin.cdpne@orange.fr

**Responsables de l'étude :** Pauline Jean (Chef de projets) – pauline.jean@spygen.com

**Type d'analyse :** Analyses eDNA Metabarcoding pour l'inventaire des Amphibiens sur 19 sites

## 2°) Protocole d'analyse et contrôles qualité :

Les extractions d'ADN ont été réalisées dans une salle dédiée à l'ADN rare ou dégradé. À chaque étape du protocole des témoins négatifs ont été analysés en parallèle aux échantillons, afin de contrôler la pureté des consommables utilisés et de détecter d'éventuelles contaminations croisées au cours de la manipulation (cf. *Extraction (-) & PCR (-) dans Contrôles qualité*).

Une amplification de l'ADN a été effectuée avec un couple d'amorces universelles pour les Amphibiens puis les échantillons amplifiés ont été séquencés à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération (HiSeq - Illumina). Les séquences obtenues ont été analysées avec des outils bio-informatiques permettant d'éliminer les erreurs dues à l'amplification ou au séquençage (à l'aide de différents filtres) et de comparer chaque séquence avec la base de référence Amphibiens SpyGen®. Une liste d'espèces est ainsi établie pour chaque échantillon avec le nombre de séquences associées par taxon.

La technologie actuellement utilisée est basée sur la détection d'ADN mitochondrial et ne permet donc pas de distinguer des espèces hybrides comme par exemple les Grenouilles vertes (*Pelophylax sp.*).

### ➤ Contrôles qualité :

| Type de contrôle | Nombre | Résultat | Commentaires                                    |
|------------------|--------|----------|-------------------------------------------------|
| Extraction (-)   | 1      | Négatif  | Aucune contamination détectée lors de l'analyse |
| PCR (-)          | 1      | Négatif  |                                                 |

### 3°) Résultats :

#### ✓ WS1400988

| Nom vernaculaire   | Nom scientifique               | Nombre de séquences |
|--------------------|--------------------------------|---------------------|
| Grenouille verte   | <i>Pelophylax sp.</i>          | 2160                |
| Grenouille taureau | <i>Lithobates catesbeianus</i> | 20842               |

#### ✓ WS1400989

Aucune séquence d'ADN d'Amphibiens n'a été détectée dans cet échantillon.

#### ✓ WS1400990

| Nom vernaculaire   | Nom scientifique               | Nombre de séquences |
|--------------------|--------------------------------|---------------------|
| Crapaud commun     | <i>Bufo bufo</i>               | 4528                |
| Grenouille verte   | <i>Pelophylax sp.</i>          | 42118               |
| Grenouille taureau | <i>Lithobates catesbeianus</i> | 214019              |

#### ✓ WS1400991

| Nom vernaculaire | Nom scientifique              | Nombre de séquences |
|------------------|-------------------------------|---------------------|
| Triton palmé     | <i>Lissotriton helveticus</i> | 12842               |
| Grenouille verte | <i>Pelophylax sp.</i>         | 2673                |

#### ✓ WS1400992

| Nom vernaculaire | Nom scientifique              | Nombre de séquences |
|------------------|-------------------------------|---------------------|
| Crapaud commun   | <i>Bufo bufo</i>              | 451                 |
| Rainette verte   | <i>Hyla arborea</i>           | 6484                |
| Triton palmé     | <i>Lissotriton helveticus</i> | 2962                |
| Grenouille verte | <i>Pelophylax sp.</i>         | 3742                |
| Grenouille agile | <i>Rana dalmatina</i>         | 15127               |

#### ✓ WS1400993

| Nom vernaculaire | Nom scientifique      | Nombre de séquences |
|------------------|-----------------------|---------------------|
| Grenouille verte | <i>Pelophylax sp.</i> | 1788                |

#### ✓ WS1400994

| Nom vernaculaire | Nom scientifique      | Nombre de séquences |
|------------------|-----------------------|---------------------|
| Grenouille verte | <i>Pelophylax sp.</i> | 27470               |

✓ WS1400995

| Nom vernaculaire | Nom scientifique              | Nombre de séquences |
|------------------|-------------------------------|---------------------|
| Triton palmé     | <i>Lissotriton helveticus</i> | 48197               |
| Grenouille verte | <i>Pelophylax sp.</i>         | 337840              |

✓ WS1400996

| Nom vernaculaire   | Nom scientifique               | Nombre de séquences |
|--------------------|--------------------------------|---------------------|
| Crapaud commun     | <i>Bufo bufo</i>               | 24162               |
| Grenouille taureau | <i>Lithobates catesbeianus</i> | 126694              |

✓ WS1400997

| Nom vernaculaire    | Nom scientifique              | Nombre de séquences |
|---------------------|-------------------------------|---------------------|
| Rainette verte      | <i>Hyla arborea</i>           | 15852               |
| Triton palmé        | <i>Lissotriton helveticus</i> | 16022               |
| Grenouille verte    | <i>Pelophylax sp.</i>         | 66414               |
| Grenouille agile    | <i>Rana dalmatina</i>         | 13576               |
| Salamandre tachetée | <i>Salamandra salamandra</i>  | 119                 |
| Triton marbré       | <i>Triturus marmoratus</i>    | 852                 |

✓ WS1400998

| Nom vernaculaire | Nom scientifique              | Nombre de séquences |
|------------------|-------------------------------|---------------------|
| Crapaud commun   | <i>Bufo bufo</i>              | 1233                |
| Triton palmé     | <i>Lissotriton helveticus</i> | 1361                |
| Grenouille verte | <i>Pelophylax sp.</i>         | 846                 |
| Grenouille agile | <i>Rana dalmatina</i>         | 3992                |

✓ WS1400999

| Nom vernaculaire | Nom scientifique              | Nombre de séquences |
|------------------|-------------------------------|---------------------|
| Triton palmé     | <i>Lissotriton helveticus</i> | 168607              |
| Grenouille verte | <i>Pelophylax sp.</i>         | 631486              |
| Grenouille agile | <i>Rana dalmatina</i>         | 37801               |

✓ WS1401000

| Nom vernaculaire | Nom scientifique              | Nombre de séquences |
|------------------|-------------------------------|---------------------|
| Triton palmé     | <i>Lissotriton helveticus</i> | 68                  |
| Grenouille verte | <i>Pelophylax sp.</i>         | 149                 |

✓ **WS1401001**

Aucune séquence d'ADN d'Amphibiens n'a été détectée dans cet échantillon.

✓ **WS1401002**

| Nom vernaculaire | Nom scientifique              | Nombre de séquences |
|------------------|-------------------------------|---------------------|
| Rainette verte   | <i>Hyla arborea</i>           | 11325               |
| Triton palmé     | <i>Lissotriton helveticus</i> | 2393                |
| Grenouille verte | <i>Pelophylax sp.</i>         | 9562                |
| Grenouille agile | <i>Rana dalmatina</i>         | 8673                |

✓ **WS1401003**

| Nom vernaculaire    | Nom scientifique              | Nombre de séquences |
|---------------------|-------------------------------|---------------------|
| Crapaud commun      | <i>Bufo bufo</i>              | 1087                |
| Triton palmé        | <i>Lissotriton helveticus</i> | 647                 |
| Grenouille verte    | <i>Pelophylax sp.</i>         | 99                  |
| Salamandre tachetée | <i>Salamandra salamandra</i>  | 17                  |

✓ **WS1401004**

Aucune séquence d'ADN d'Amphibiens n'a été détectée dans cet échantillon.

✓ **WS1401005**

Aucune séquence d'ADN d'Amphibiens n'a été détectée dans cet échantillon.

✓ **WS1401006**

Aucune séquence d'ADN d'Amphibiens n'a été détectée dans cet échantillon.

**4°) Commentaires :**

La persistance de l'ADN environnemental dans un écosystème d'eau douce est d'environ 15 jours (Dejean *et al.* 2011). Cela signifie donc que les espèces d'Amphibiens détectées étaient présentes lors de l'échantillonnage ou durant les 15 jours précédant les prélèvements d'eau sur les sites concernés.

Les extraits d'ADN seront conservés pendant 6 mois dans nos locaux avant d'être éliminés ou bien renvoyés chez le client sur demande et à ses frais.