



HAL
open science

Rôle écologique des bassins d'orage routiers pour les amphibiens

Antonin Conan

► **To cite this version:**

Antonin Conan. Rôle écologique des bassins d'orage routiers pour les amphibiens. *Ecologie, Environnement*. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ064 . tel-03956572

HAL Id: tel-03956572

<https://theses.hal.science/tel-03956572>

Submitted on 25 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE présentée par :

Antonin CONAN

Soutenue le : 2 septembre 2022

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biologie des organismes

Rôle écologique des bassins d'orage routiers pour les amphibiens

THESE dirigée par :

Yves HANDRICH

Chargé de Recherche, IPHC/CNRS, Université de Strasbourg,
UMR 7178

Et Co-Encadrée par :

Jonathan JUMEAU

Chef de projet, chargé de recherche, CERISE, Collectivité
européenne d'Alsace

RAPPORTEURS :

Nathalie MONDY

Maîtresse de conférences, Université de Lyon 1, LEHNA/CNRS,
UMR 5023

Xavier BONNET

Directeur de Recherche, CEBC/CNRS, Université de La Rochelle,
UMR 7372

EXAMINATRICE interne :

Sylvie MASSEMIN

Maîtresse de conférences, Université de Strasbourg, IPHC/CNRS,
UMR 7178

EXAMINATEURS externes :

Claude MIAUD

Directeur d'étude, Ecole Pratique des Hautes Etude, CEFÉ/CNRS,
UMR 5175

Jehan-Hervé LIGNOT

Professeur, Université de Montpellier, CNRS, UMR 9190
MARBEC

Remerciements

Me voici maintenant à rédiger mes remerciements, après 3 ans et 9 mois de thèse ça en fait des personnes à remercier.

Je tiens avant toute chose à remercier mon directeur de thèse Yves Handrich, ainsi que mon encadrant Jonathan Jumeau, merci de m'avoir sélectionné et d'avoir eu confiance en moi. Je vous remercie également de m'avoir laissé une certaine autonomie dans la mise en place et la réalisation des protocoles, cela m'a permis de m'approprier totalement le sujet de cette thèse pour laquelle j'ai particulièrement adoré m'investir. Encore merci d'avoir été disponible tout au long de cette thèse durant laquelle j'ai pu développer et acquérir de nouvelles compétences, je pense particulièrement en statistiques, avec un GRAND merci à Jonathan 😊.

Je tiens également à remercier Claude Miaud qui, je pense, à jouer un rôle important dans le fait d'avoir été sélectionné pour cette thèse. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et pour la confiance que vous m'avez accordée.

Je souhaite remercier Caroline Hibold, directrice du DEPE d'avoir accepté de m'accueillir au sein de ce laboratoire, merci également d'avoir été présente lorsqu'il y avait des problèmes à régler ce qui m'a permis de finir ce projet en toute sérénité. Merci également à Vincent Viblanc et Sylvie Massemin pour leurs bons conseils et avis lors de nos réunions de suivi de thèse.

Je remercie naturellement les membres de mon comité de suivi de thèse, Aurélien Besnard, Claude Miaud et Claire Saraux, merci pour ces réunions très enrichissantes ainsi que vos nombreux conseils que j'ai essayé de respecter au mieux.

Je tiens à remercier évidemment les membres de mon jury, qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, Nathalie Mondy et Xavier Bonnet ainsi que les examinateurs, d'abord externes : Jehan-Hervé Lignot et Claude Miaud, mais aussi interne à l'université de Strasbourg : Sylvie Massemin. J'espère que mon travail vous plaira, et que cela vous donnera envie, un jour, de travailler avec moi 😊.

Un grand merci aux financeurs de cette thèse, sans eux ce travail n'aurait jamais pu avoir lieu, merci à la région Grand-Est, à la DREAL Grand-Est et particulièrement à Frédéric Voegel, merci également à la Collectivité européenne d'Alsace (anciennement conseil départemental du Bas-Rhin). Merci à Isabelle Zimmermann (CeA) de m'avoir accueilli au début de cette thèse

dans l'équipe MRI, désolé d'avoir choisi de rester à 100% à l'IPHC durant ce projet même si j'ai apprécié les journées passées dans vos locaux. Merci encore à Jonathan qui a participé majoritairement à la rédaction du dossier pour obtenir ce financement.

Durant ces 3 ans et 9 mois, j'ai pu côtoyer un grand nombre de personnes au sein du DEPE, mais également lors de réunions, formations et colloques. Ces remerciements vont donc être longs.

Tout d'abord, je tiens à remercier les enseignants chercheurs qui ont eu confiance en moi et qui m'ont laissé l'opportunité d'enseigner dans différentes disciplines et à différents niveaux universitaires allant de la Licence au Master. Merci à Cédric Sueur, Sylvie Massemin, Sylvie Raison, Isabelle Combroux et Josefa Bleu. J'ai vraiment apprécié enseigner vos matières aux étudiants et je suis content d'apprendre que je pourrais encore le faire une année supplémentaire durant mon poste d'ATER à Strasbourg.

Parmi les chercheurs, enseignants chercheurs et ITA du DEPE, nombreux sont ceux avec qui j'ai apprécié travailler, discuter ou encore boire des coups. C'est le cas bien sûr de Yves sans qui je n'aurais jamais pu rencontrer les autres personnes comme Pierre, François, Caroline, J-P, Vincent, Claire, Sylvie, Cédric, Marie, Josefa, Sandrine, Astolfo, Alexandre, David, Aurélie et Nicolas. Mais je n'oublie pas non plus Hélène, tu t'es beaucoup tracassé au sujet de mes manips crapauds à l'animalerie, les saisines éthiques, la liste des médicaments etc. J'ai fait mon possible pour te faciliter la tâche, mais heureusement que tu étais là, merci aussi pour nos discussions et pour les contacts que tu m'as donné sur les tortues en Corse et en Sardaigne. Je poursuis ensuite par un TRÈS GRAND merci à Manfred Enstipp qui a pris énormément de temps à corriger mes articles en anglais, pas uniquement la grammaire mais aussi la forme et le style ce qui m'a permis d'avoir de beaux articles à soumettre. Un merci particulier à Élisabeth, toujours présente pour effectuer mes commandes, ordres de mission et me faire un suivi budgétaire en temps réel.

Maintenant, je vais pouvoir passer à la partie des remerciements qui concerne les plus jeunes que j'ai côtoyé.

Je vais donc commencer par remercier les premières personnes que j'ai rencontrées au DEPE, Agnès et Lison, mes colocs de bureau. Pas toujours facile de cohabiter avec celles-ci. Non mais sérieusement, j'ai vraiment été heureux de faire votre connaissance et de partager ces moments avec vous, vous allez sûrement me manquer 😊. Je confirme les dires d'Agnès, nous avons vraiment le plus beau bureau du DEPE, du moins le plus verdoyant, mais sans vous il deviendra

grisonnant... Merci encore à Agnès d'avoir nourri mes rainettes, même pendant les vacances de Noël, grâce à toi elles se portent toutes très bien. D'ailleurs, il ne faut pas que j'oublie Tracey, également membre de notre bureau avec qui j'ai davantage parlé sur la fin de thèse, après mes nombreuses heures de formations en anglais. Tu dois également être en train de rédiger tes remerciements, bon courage à toi 😊.

Je remercie également Isaac, qui est la première personne avec qui j'ai parlé au DEPE, merci de m'avoir payé ce premier repas à la cantine. Je sais que tu t'éclates en Israël dans ton nouveau job, c'est génial, j'espère te revoir bientôt. Dans la lignée des personnes parties trop tôt du labo, je remercie Lorène 'Tortue', merci pour l'aide que tu m'as apportée avec Isaac dans la mise au point d'un algorithme de photoID, merci de m'envoyer des offres de post-doc, j'ai apprécié les nombreuses discussions que nous avons eues au sujet des tortues entre autres. Merci également pour les nombreuses bouteilles de rhums martiniquais et guyanais que tu m'as amenées. J'ai hâte de venir te voir en Afrique du Sud 😊.

Je tiens également à remercier l'ensemble des doctorants passés et présents avec qui j'ai pu discuter et boire des coups, Florian, Flora, Adrien, Théo, Anouch, Nicolas, Timothée, mais aussi Pierre et Elisa, les 2 ovnis du labo. Moment sympa avec Elisa quand on se prenait une pause à parler des problèmes avec nos chiens. En parlant de chien, comment ne pas parler de Charlotte(-Anais), de longues discussions à parler de tout et de rien avec toi, mais surtout de rien pendant les pauses café. N'oublie pas, après la thèse on bosse ensemble sur la connectivité de mes petits crapauds. Surtout merci pour ton soutien lors de notre séjour au ski, merci d'avoir supporté ce boulet tout au long de la descente et aussi merci à AP, c'est un gars bien cet AP 😊. Un merci également à Martin, j'ai rarement rencontré une personne aussi gentille que m'sieur Quque, merci pour nos discussions et tes conseils pour l'enseignement, l'ATER mais également pour la mise en page de cette thèse qui j'espère grâce à toi sera jolie à lire.

Et après tous ces gens plus ou moins sympas, il y a la 'TEAM', la vraie. Les personnes avec qui on passe le plus de temps, avec ou sans les autres, mais bon c'est comme ça, c'est ce que l'on appelle le feeling. On commence donc par Madame FLEITZZ Julie, personne incroyable avec qui ça a collé de suite, en même temps entre gars du nord 😊. Tu es la personne avec qui j'ai passé le plus de temps, soit à l'escalade, soit au bar et maintenant de plus en plus au bar ou encore à la maison. Tu es une très bonne amie, et j'espère que cela durera même après la fin de nos contrats à Strasbourg (si fin il y a). On ne peut pas parler de Julie sans parler de sa moitié Ivan 😊, super sympa, toujours partant pour la petite, hâte que tu nous fasses visiter le Mexique

avec Laura. Et s'il n'y avait pas eu Julie, il n'y aurait sûrement jamais eu LORÈNE 'Hamster'. Sacré personnage cette Lorène, toujours de bonne humeur, souriante et pétillante on ne peut que passer des moments magiques avec elle. Ensuite vient un grand bonhomme, Meven, anciennement stagiaire dans la 'ToadTeam' (j'y reviendrai plus tard) maintenant titulaire au sein de la 'TEAM', encore un gars toujours partant pour picoler (en même temps c'est un Breton), j'espère que tu trouveras vite un sujet de thèse qui te plait en Amazonie, je passerais t'aider 😊. Cette 'TEAM' s'est agrandi récemment par l'arrivée d'un ancien stagiaire au DEPE dénommé Hugo. Ce petit gars, longtemps considéré comme un « électron libre », fait bel est bien parti de l'équipe. Très gentil voir trop gentil, il est toujours présent quand ça ne va pas. Je te considère également comme un très bon ami comme l'ensemble des personnes faisant partie de la 'TEAM'. Encore désolé de m'être emporté lors d'une partie de Molki, mais désormais c'est devant Koh-Lanta qu'on se réconcilie 😊. Enfin, je remercie toutes les personnes de cette 'TEAM' pour avoir intégré celle qui est la plus importante pour moi : Laura ♡, merci de l'avoir toujours convié à nos petites sauteries, je pense qu'elle est aussi heureuse que moi de vous connaître. Vous m'avez fait passer des moments inoubliables à Strasbourg. Et même si à la base nous étions réticents de venir s'installer en Alsace... maintenant nous ne voulons plus repartir. Ça me rappelle un proverbe ch'ti qui pourrait être transcrit en alsacien : « Wenn a uslander ins Elsass kommt, hielt er zwei moll, wenn er kommt un wenn er geht »¹, je n'ai pas hâte de partir 😊.

Je tiens également à remercier d'autres personnes ayant été présentes pendant, mais également avant la thèse comme c'est le cas de Guillaume, merci de m'avoir hébergé à Montpellier, merci pour les cours de Bachata et pour toutes les autres soirées qu'on a passé ensemble. Merci également pour tout ce que tu m'as appris sur le terrain, je pense à la capture des bestioles avec l'épuisette et les nasses, mais également à l'implantation de PitTag. Félicitations pour ton postdoc, j'espère que tu vas t'éclater. Il m'est impossible de parler de Guillaume sans rendre un hommage à Marie, nous étions inséparables tous les 3 lors de mon passage à Montpellier, tu nous manques tellement, on pense fort à toi. Je ne peux pas quitter Montpellier sans parler de mon copain Thibaut le sincier, on s'est connu sur les tracteurs dans les champs du Nord 🚧, retrouvés ensuite à Montpellier les pieds dans l'eau et maintenant tu m'as quitté pour te dorer la pilule à Mayotte, merci pour tous tes conseils, j'espère te revoir très vite. Enfin, je ne peux pas terminer cette page Montpellier sans parler de Julia, merci pour le nombre incroyable de

¹ « Quand un étranger vient vivre dans ch'Nord, il braie 2 fois, quand il arrive et quand il r'part »

vocaux que tu m'as envoyé, merci surtout de m'avoir appris qu'il était possible de les écouter en accéléré, très content d'avoir fait ta connaissance, j'espère qu'on pourra encore collaborer ensemble pendant et après ta thèse.

Je tiens également à remercier Aurélie et Vincent de chez BUFO, quelques sorties herpéto et discussions sur ce sujet super sympas, merci de m'avoir fait rencontrer Augustin. Herpétologue et naturaliste hors-pair, Mec prépare ta pirogue j'arrive en Guyane 😊 !

Un GRAND merci à l'ensemble des stagiaires que j'ai pu encadrer durant cette thèse ainsi que les CDDs tous appartenant à la 'ToadTeam'. Sans vous, je n'aurais jamais pu récolter toutes ces données et capturer tous ces crapauds. Merci aux CDD AI : Lorène 'Hamster', Meven et Nathan. Merci aux étudiants stagiaires de 2019 : Meven, Alicia, Éléonore^a, Emma^a, Nicolas, Emma^b, Nathan, Lola, Gabriel, Éléonore^b de 2020 : Camille, Tiphany, Pierre, Louanne, Farley, Antoine, Johanna, Nathan, Louis, de 2021 : Mona, Garance, Sasha, Adrien, Corentin, Joris, Justine, Léa, Doriane, Laura, Lucie, Sarah, Thomas, Oriane, et de 2022 : Jérémy, Astrid, Léo, Julie, Sarah, Coralie, Adèle, Marjorie et Louis. Avec un double merci à ceux qui ont participé à la rédaction d'articles et de posters. Je pense notamment à Nathan Dehaut, que j'ai pu encadrer 2 années lors de ces stages de L3 et de M1 et qui est revenu pour un CDD. Merci pour ton aide sur le terrain et pour ton investissement dans la rédaction d'articles, j'espère encore collaborer avec toi, même sur tes propres études futures 😊.

Un total de 42 stagiaires, encadrés avec l'aide de Yves, Jonathan et les CDDs en activité, ce qui est plutôt pas mal 😊.

Je pense que j'arrive maintenant à la fin de mes remerciements et j'espère n'avoir oublié personne.

Je termine donc ces remerciements par les meilleures personnes, ceux qui ont toujours été là pour moi, et qui le seront toujours : mes parents. Merci papa, maman de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de réaliser ces longues études, mais aussi de m'avoir soutenu avant de réaliser cette thèse. Maintenant, si on vous pose la question, vous pourrez dire que je suis docteur 😊. Je remercie également l'ensemble de ma famille proche et ma belle-famille qui s'est toujours intéressée à ce que je faisais de prêt ou de loin. Et enfin, je remercie la personne la plus importante à mes yeux, celle qui m'a supporté pendant ces 3 ans et 9 mois de thèse et qui me supporte depuis plus de 9 ans maintenant. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, merci

de m'avoir encouragé, motivé et soutenu avant et pendant cette thèse. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est aussi et surtout grâce à toi. Merci Laura d'être dans ma vie, je t'aime ♥ !

Enfin, un grand merci à l'ensemble des crapauds et grenouilles qui se sont laissés manipuler avec plus ou moins de facilité, sans vous, cette thèse n'aurait jamais pu être rédigée 😊 !



Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont lu et relu ce manuscrit, merci d'avoir pris le temps pour m'aider dans cette tâche qui n'était pas la plus agréable.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 1 |
| Table des matières | 8 |
| Liste des publications, communications et formations suivies | 10 |
| Préambule : | 14 |
| A) Introduction | 16 |
| I) Les amphibiens | 16 |
| 1) Écologie | 16 |
| a) Généralités | 16 |
| b) Cycle de vie en zone tempérée | 19 |
| 2) Leurs habitats menacés | 22 |
| a) Les habitats de reproduction : les zones humides | 22 |
| b) Les habitats terrestres des amphibiens, de grands oubliés de la conservation | 24 |
| 3) État de conservation des amphibiens | 26 |
| II) Déclin des amphibiens | 28 |
| 1) Causes de ce déclin | 28 |
| a) Fragmentation des paysages | 29 |
| b) Agriculture intensive | 30 |
| c) Urbanisation : les infrastructures linéaires de transport | 31 |
| 2) Conséquences sur le déclin des amphibiens | 33 |
| 3) Comment limiter les causes et conséquences : le cas particulier des bassins d'orage routiers | 34 |
| III) Pièges écologiques | 36 |
| 1) Définition | 36 |
| 2) Qu'en est-il pour les amphibiens ? | 38 |
| 3) Distinguer les pièges écologiques parmi d'autres sites | 39 |
| a) Attractivité forte | 39 |
| b) Valeur sélective faible | 40 |
| IV) Problématique de la thèse et acteurs locaux | 41 |
| 1) Contexte et objectifs de la thèse | 41 |
| a) Structuration de la thèse | 42 |
| b) Acteurs concernés | 44 |
| B) Méthode générale | 45 |
| I. Zone d'étude : la plaine agricole du Bas-Rhin. | 45 |
| II. Modèles biologiques | 46 |
| 1) Les Grenouilles vertes (<i>Pelophylax spp.</i>) | 47 |
| 2) Le Crapaud vert (<i>Bufo viridis</i>) | 48 |
| Chapitre 1 : Les bassins d'orage routiers : des habitats de reproduction pour les amphibiens ? | 50 |
| Étude 1 : Les bassins d'orage routiers peuvent-ils être exploités avec succès par la Grenouille verte européenne (<i>Pelophylax spp.</i>) ? | 50 |
| Discussion de l'étude 1 : | 64 |

| | |
|--|------------|
| Étude 2 : Les bassins d'orage routiers en tant que site de reproduction des amphibiens : une étude de cas sur les têtards du Crapaud vert | 65 |
| Discussion de l'étude 2 : | 78 |
| Étude 3 : Mortalité importante des têtards de Crapaud vert dans les bassins d'orage routiers : un problème de pollution et/ou de présence d'un nouveau prédateur ? | 80 |
| Discussion de l'étude 3 : | 96 |
| Conclusion et perspective du premier chapitre | 97 |
| <i>Chapitre 2 : Mesures de cloisonnements : comment empêcher l'accès des bassins d'orage routiers aux amphibiens ?</i> | 100 |
| Étude 4 : Efficacité des clôtures en grillage métallique pour empêcher l'accès des animaux aux infrastructures routières : une étude expérimentale sur les petits mammifères et les amphibiens. | 100 |
| Discussion de l'étude 4 : | 113 |
| Étude 5 : Efficacité d'une clôture permanente de protection de la faune pour limiter la mortalité routière des amphibiens. | 114 |
| Discussion de l'étude 5 : | 135 |
| Conclusion du second chapitre | 136 |
| <i>Chapitre 3 : Intérêts des bassins d'orage routiers dans le déplacement des Crapauds verts</i> | 138 |
| Étude 6 : Contribution des bassins d'orage à la connectivité paysagère : une étude de cas sur le Crapaud vert européen dans le Bas-Rhin, France | 138 |
| Discussion de l'étude 6 : | 152 |
| Étude 7 : Utilisation de l'habitat terrestre par un amphibien à proximité des bassins d'orage routiers : le Crapaud vert (<i>Bufo viridis</i>) dans la plaine d'Alsace, France. | 153 |
| Discussion de l'étude 7 : | 172 |
| Conclusion du troisième chapitre | 173 |
| <i>Discussion générale</i> | 174 |
| I) Apport de nouvelles connaissances | 175 |
| 1) Les bassins d'orage routiers et les amphibiens | 175 |
| 2) Les amphibiens face à des obstacles physiques pour leur conservation | 178 |
| 3) Le Crapaud vert (<i>Bufo viridis</i>) hors de l'eau | 179 |
| II) Recommandations | 181 |
| III) Perspectives | 183 |
| <i>Bibliographie</i> | 186 |
| <i>Annexes</i> | 214 |

Liste des publications, communications et formations suivies

Publications

| Article | Statut |
|--|----------------|
| Conan, A. , Jumeau, J., Dehaut, N., Enstipp, M., Georges, J.-Y. & Handrich, Y. (2021). Can road stormwater ponds be successfully exploited by the European green frog (<i>Pelophylax sp.</i>)? <i>Urban Ecosystems</i> . doi: http://dx.doi.org/10.1007/s11252-021-01129-z | Publié |
| Conan, A. , Fleitz, J., Garnier, L., Le Brishoual, M., Handrich, Y., Jumeau, J. (2022). Effectiveness of wire netting fences to prevent animal access to road infrastructures: an experimental study on small mammals and amphibians. <i>Nature Conservation</i> . doi: https://doi.org/10.3897/natureconservation.47.71472 . | Publié |
| Conan, A. , Dehaut, N., Handrich, Y., Jumeau, J. Stormwater ponds as an amphibian breeding site: a case study with European green toad tadpoles. <i>Environmental Science and Pollution Research</i> . https://doi.org/10.1007/s11356-022-22991-0 . | Publié |
| Conan, A. , Le Brishoual, M., Garnier, L., Fleitz, J., Dehaut, N., Enstipp, M., Jumeau, J., Handrich, Y. Efficacy of permanent wildlife fences to mitigate amphibian roadkill. <i>Ecological Applications</i> . | Soumis |
| Conan, A. , Mata, A., Lenormand, E., Zahariev, A., Enstipp, M., Handrich, Y., Jumeau, J. High mortality of European green toad tadpoles in road stormwater ponds: a problem of pollution or the presence of a new predator? | En préparation |
| Conan, A. , Handrich, Y., Jumeau, J. Contribution of stormwater ponds to landscape connectivity: a case study for the European Green toad in Bas-Rhin, France. | En préparation |
| Conan, A. , Dehaut, N., Le Brishoual, M., Handrich, Y., Jumeau, J. Terrestrial habitat use by an amphibian in the surroundings of roadside stormwater ponds: The European green toad in the Alsace plain, Eastern France. | En préparation |

Communications scientifiques

Conan A., 2019, « *Bassins d'orage routiers : source ou puit écologique ?* » Conférence jeunes chercheurs ITTECOP, 24 janvier 2019, Paris, France (Oral en français).

Conan A., Courderot A., Handrich Y., Georges J-Y., Jumeau J., 2019, « *Intérêts des bassins d'orage pour les populations de Crapaud vert : étude de cas sur la connectivité paysagère* » Congrès de la société herpétologique de France, 10 au 12 octobre 2019, Moulis, France (Poster en français).

Clevenot L., **Conan A.**, Jumeau J., 2020, « *Utilisation des bassins de rétention des eaux pluviales par la faune aquatique : le cas des amphibiens* » Webinaire ITTECOP, 17 April 2020, Online (Oral en français).

Conan A., Jeantet L., Jumeau J., Handrich Y., Georges J-Y., Debache I., 2020, « *Photo identification du Crapaud vert (*Bufo viridis*) ; le deep learning est-il une solution plus efficace que les méthodes actuelles ?* » Workshop imaginecology, 16 au 17 novembre 2020, en ligne (Oral en français).

Conan A., Le Brishoual M., Garnier L., Fleitz J., Dehaut N., Georges J-Y., Jumeau J., Handrich Y., 2021, « *Road mortality mitigation measures: fences for amphibians* » The Infrastructure and Ecology Network Europe (IENE) conference, 12 au 14 janvier 2021, en ligne (Oral en anglais).

Conan A., Le Brishoual M., Fleitz J., Garnier L., Jumeau J., Handrich Y., 2021, « *Réduction de la mortalité routière : efficacité des clôtures petites faunes pour les amphibiens* » Congrès de la société herpétologique de France, 21 au 23 octobre 2021, Lille, France (Oral en français).

Conan A., Legrand A., Dayon J., Bussac A., Chereau N., Bonnaire E., Handrich Y., Jumeau J., 2021, « *Suivi individuel par photo-identification : Test d'un logiciel avec quatre Espèces d'amphibiens* » Congrès de la société herpétologique de France, 21 au 23 octobre 2021, Lille, France (Poster en français).

Jumeau J., **Conan A.**, Ganier C., Chombart M., Piaugeard., Drais-Canovas E., 2021, « *Tests d'efficacité et préconisations concernant la mise en place d'échappatoires petite faune dans les conduites d'évacuation des eaux* » Congrès de la société herpétologique de France, 21 au 23 octobre 2021, Lille, France (Poster en français).

Conan A., Dehaut N., Coquard L., Mata A., Zahariev A., Handrich Y., Jumeau J., 2021, « *Green toad tadpole in disturbed conditions: study of development, locomotion and metabolism* » Meeting in Animal Ecophysiology 5th edition, CEPA5, 2 to 4 November 2021, Montpellier, France (Oral en français)

Conan A., Dehaut N., Coquard L., Mata A., Zahariev A., Handrich Y., Jumeau J., 2022, « *High Green toad tadpole mortality in road stormwater ponds: a problem of pollution or the presence of an 'endemic' predator?* » 15th edition of the Ecology and Behaviour meeting, 21 to 24 March 2022, Strasbourg, France (Poster en anglais)

Formations suivies

| Nom | Heures comptabilisées | Date |
|---|-----------------------|------|
| Publiciser ses travaux de recherche : être (re)connu | 3 | |
| Ethique de l'expérimentation animale | 7 | |
| Formation pour la conception ou la réalisation des procédures expérimentales sur les rongeurs | 30 | |
| Chirurgie des rongeurs | 7 | |
| Image J : Niveau 1 | 14 | 2019 |
| Charte de déontologie des métiers de la recherche | 3 | |
| MOOC « intégrité scientifique dans les métiers de la recherche » | 10 | |
| S'initier à la vulgarisation scientifique | 13 | |
| Anglais usuel | 39 | |
| Stage intensif en anglais | 30 | 2020 |
| Notion de bien-être animal et bonnes pratiques vétérinaire ex et in situ | 3 | |
| Formation Capture Marquage Recapture | 8 | 2021 |
| Utilisation des animaux de la faune sauvage non hébergée à fins scientifiques | 20 | |

Préambule :

Cette introduction de thèse est construite avec un plan permettant la justification du sujet. J'ai décidé de commencer cette introduction en m'intéressant dans un premier temps à la biologie générale de l'ensemble des amphibiens modernes et en introduisant leurs spécifications. Ensuite, je me suis focalisé sur les amphibiens des zones tempérées et plus précisément sur les espèces européennes en présentant leur cycle de vie biphasique. J'ai alors exposé l'état de conservation de leurs différents habitats : les zones humides pour la reproduction et l'habitat terrestre pour la recherche alimentaire, la période estivale et hivernale, avant de me pencher sur les statuts de conservation des espèces françaises. Dans un second temps, j'ai décrit les causes majeures responsables du déclin des espèces d'amphibiens européennes, qui peuvent également être transposées aux autres régions du globe. Je me suis ensuite intéressé plus particulièrement à l'impact des infrastructures routières ainsi que les mesures de réduction mises en place lors de leur construction. Cela m'a permis d'introduire la troisième et dernière partie de cette introduction sur les pièges écologiques, axe central de la thèse. Après avoir défini la notion de piège écologique ainsi que le lien avec les amphibiens je suis arrivé à la problématique de la thèse et la description de sa structure.

Cette introduction n'a pas pour but d'être une revue bibliographique sur le déclin des amphibiens. En effet, plus de 82 000 références s'intéressent à ce déclin, dont 21 000 durant ces 10 dernières années. Les articles cités font alors essentiellement référence à des questions et modèles européens dans un contexte de biologie de la conservation, en lien plus ou moins étroit avec la problématique de la thèse.

Enfin, cette thèse s'inscrit dans un projet de recherche nommé CERISE faisant suite à la thèse de Jonathan Jumeau et ayant pour objectif de transmettre les connaissances scientifiques

en écologie routière aux aménageurs, autorités compétentes, et bureaux d'étude afin d'adapter les mesures prises pour la conservation des espèces.

A) Introduction

I) Les amphibiens

1) Écologie

a) Généralités

Les amphibiens *lato sensu* sont apparus il y a environ 370 millions d'années et étaient les premiers vertébrés à s'adapter à la vie terrestre (Scosch 2014). Ils ont pu, au cours de leur histoire évolutive, coloniser tous types d'habitats, des océans aux habitats terrestres (Steyer 2002). Par la suite, les amphibiens modernes, ou Lissamphibiens, sont apparus sur terre il y a plus de 200 millions d'années (Carroll 2009). Ils représentent un groupe monophylétique composé de 4 ordres : les Allocaudata, ordre fossile actuellement disparu, les Anoures (crapauds et grenouilles), les Urodèles (tritons et salamandres), et les Gymnophiones (cécilies) (**Figure 1**). Aujourd'hui, plus de 8200 espèces d'amphibiens modernes (non fossiles) sont décrites dans le monde (AmphibiaWeb) et de nouvelles espèces sont encore découvertes chaque année (*i.e.* ~100 nouvelles espèces/an, Streicher *et al.* 2020 ; Yang & Poyarkov 2021 ; Ninh *et al.* 2022).

Les 3 ordres d'amphibiens modernes sont facilement différenciables morphologiquement. Tout d'abord, les Anoures sont les amphibiens dépourvus de queue à l'état adulte et comprennent à la fois les grenouilles et les crapauds. Ils possèdent des pattes plus ou moins développées et sont adaptés au saut. De plus, les mâles anoures présentent des sacs vocaux (**Figure 2**) leur donnant la capacité d'émettre des chants nécessaires lors de la reproduction. Ces derniers peuvent servir à attirer les individus mâles et femelles vers un site de reproduction, mais également lors de la sélection de partenaires (*i.e.* « meilleur chanteur » ; Köhler *et al.* 2017). Le chant des amphibiens est un bon critère pour différencier les espèces, même lorsque celles-ci sont cryptiques au niveau phylogénique (*i.e.* morphologiquement semblables) (Schneider & Sinsch 1992 ; Köhler *et al.* 2017). Les Urodèles quant à eux gardent leur queue au stade adulte et ont une morphologie similaire à celle des lézards. Ils se déplacent en marchant et ne sont pas adaptés au saut. Enfin, les Gymnophiones, ou cécilies, sont des amphibiens fousisseurs avec une morphologie vermiforme. C'est le seul ordre absent des zones tempérées (Amérique du Nord, Europe...) (**Figure 3**).



Figure 1 : Phylogénie des amphibiens modernes (Sous-classe des Lissamphibiens et les 3 ordres non fossiles), d'après Jetz & Pyron

Les amphibiens sont des animaux ectothermes poïkilothermes, c'est-à-dire que leur température interne varie en fonction de celle du milieu extérieur. Ils sont donc particulièrement sensibles aux changements climatiques actuels (*e.g.* augmentation de la température) (Duellman & Trueb 1994 ; Stuart *et al.* 2004). De plus, les amphibiens possèdent une peau fine et perméable, leur donnant des propriétés physiologiques importantes pour les échanges hydriques et gazeux, mais s'accompagnant d'une vulnérabilité à la déshydratation (Duellman & Trueb 1994 ; Buckley & Jets 2007). En conséquence, ils affectionnent les zones humides, les sous-bois et sortent en général après la pluie. Bien que tous les amphibiens soient pulmonés (avec quelques exceptions *e.g.* *Plethodontidae*), chez quelques espèces la respiration cutanée peut représenter 30% de l'absorption en oxygène et jusqu'à 100% de l'élimination en dioxyde de carbone (Feder & Burggren 1985). Observée chez des amphibiens émergés et immergés, cette respiration cutanée permet de rester parfois plusieurs heures sous l'eau sans avoir besoin de ressortir pour respirer (Gottlieb & Jackson 1976). Par ailleurs, la peau parfois « verruqueuse » de certaines espèces comme les *Bufo* et les *Salamandridae* peut être accompagnée de glandes parotoïdes, sécrétant une substance toxique contenant des alcaloïdes qui peuvent éventuellement dissuader leurs prédateurs (Toledo & Jared 1995). Ces glandes parotoïdes sont plus ou moins développées et visibles en fonction des espèces.



Figure 2 : Grenouille rieuse (*Pelophylax ridibundus*) mâle chanteur laissant apparaître ses deux sacs vocaux latéraux (photo Antoine Coquis®).

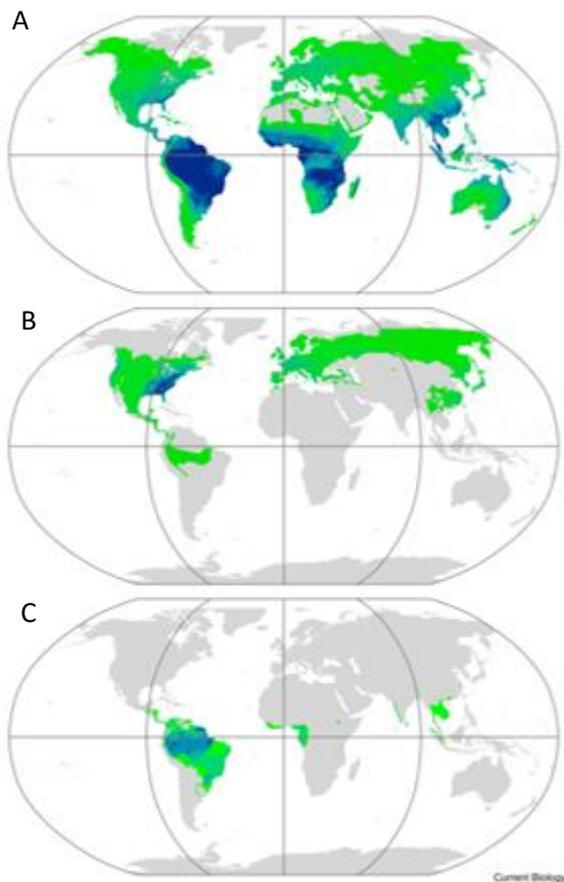


Figure 3 : Répartition mondiale des trois ordres d'amphibiens. Les Anoures en (A) sont présents sur l'ensemble des continents à l'exception de l'Arctique et de l'Antarctique. Les Urodèles en (B) sont majoritairement répartis dans l'hémisphère nord. Les Gymnophiones en (C) sont uniquement présents en milieu tropical. La couleur foncée (bleu) indique les zones géographiques de plus grande richesse spécifique. D'après Wake & Koo 2018.

Les amphibiens sont présents sur presque la totalité du globe à l'exception des îles océaniques, de l'Arctique et de l'Antarctique (Wells 2007) (**Figure 3**). Ils sont majoritairement retrouvés en zone tropicale et tempérée. Malgré qu'ils soient moins tolérants à la dessiccation et nécessitent un taux plus élevé d'humidité que d'autres vertébrés (Ludwig 1945), il est possible de rencontrer certaines espèces, et plus particulièrement les Anoures, dans des zones désertiques (**Figure 3A**). Dans ces milieux très secs, ces espèces ont mis en place différents modes de reproductions (da Silva *et al.* 2012). Certaines d'entre elles (*e.g.* famille des *Leptodactylidae*) secrètent une mousse muqueuse dans laquelle sont déposés les œufs afin de les prévenir de la dessiccation, même après l'éclosion et pendant le développement larvaire (Dobkin & Gettinger 1985). Ce « nid de mousse » permet de limiter la dessiccation en maintenant une température inférieure à celle du milieu ambiant afin de limiter l'évaporation et de protéger la descendance des rayons UV et de la vue des prédateurs. En revanche, en zone tropicale et notamment en forêt équatoriale où le taux d'humidité ambiant est élevé, les

amphibiens sont moins soumis à la dessiccation mais plutôt à une forte prédation due à une plus forte richesse spécifique (Freestone *et al.* 2011). Parmi ces espèces, certaines présentent des adaptations face à cette prédation, en arborant par exemple des couleurs vives afin de signaler leur toxicité (*e.g.* couleur aposématique) (Hegna *et al.* 2013).

Dans le cadre de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à des espèces d'amphibiens de zones tempérées présentant un cycle de vie biphasique avec une phase aquatique et terrestre.

b) Cycle de vie en zone tempérée

En zone tempérée, la majorité des amphibiens présentent un cycle de vie caractéristique, dit biphasique, avec une phase aquatique généralement utilisée pour la reproduction des adultes, le développement des œufs et la croissance des larves, et une phase terrestre représentant la majeure partie de leur vie (Baumberger *et al.* 2019). En début de printemps, les adultes vont rejoindre des sites aquatiques (zone humide, mare...) pour la saison de reproduction, en général de manière synchrone pour les individus d'une même espèce (**Figure 4**). Mâles et femelles rejoignant le site quasi simultanément pour une majorité d'espèce ; on parle alors de reproduction « explosive » (*i.e.* rapide et intense) (Wells 2007). Il est ainsi fréquent d'observer de grands épisodes de migration pour rejoindre un plan d'eau. Chez certaines espèces, les chants des mâles arrivés en premier attirent les femelles, pouvant alors choisir leur partenaire (*e.g.* Crapaud calamite, Crapaud vert) (Tejedo 1992). Au contraire, chez d'autres espèces c'est le mâle qui choisit la femelle (*e.g.* Crapaud commun) (Wells 1977).

La reproduction des amphibiens est sexuée et le développement est indirect. Chez les Anoures, le mâle attrape la femelle avec ses pattes antérieures et se positionne sur son dos, cette position d'accouplement typique est appelée « amplexus » (Taylor & Guttman 1977 ; Carvajal-Castro *et al.* 2020). La femelle va pondre ses œufs dans le milieu aquatique qui seront ensuite fécondés par le sperme du mâle (Taylor & Guttman 1977 ; Miaud & Muratet 2018). Après une courte période d'incubation, les œufs vont éclore et donner des larves inertes qui deviendront mobiles au bout de quelques jours. Ces larves, communément appelées « têtards » ont une respiration branchiale (externe dans un premier temps). Le développement larvaire dure de quelques jours à plusieurs mois, voire plusieurs années pour certaines espèces (et selon les conditions du milieu), au terme duquel les têtards se métamorphosent et prennent une forme

adulte à respiration aérienne pulmonée, comme tous les Tétrapodes (Taylor & Guttman 1977 ; Miaud & Muratet 2018). Dans le cas des Urodèles, et en particulier les tritons, les mâles effectuent une parade nuptiale complexe afin d'attirer les femelles. Elle consiste en une émission de phéromones et de mouvements de queues. À la suite de cette parade, le mâle dépose un spermatophore dans le fond de l'eau et la femelle vient l'aspirer par le cloaque. Cette dernière va ensuite pondre ses œufs individuellement dans des feuilles qu'elle repliera délicatement avec ses pattes arrière (Taylor & Guttman 1977 ; Raffaëlli 2014 ; Miaud & Muratet 2018). Tout comme les Anoures, le développement chez les tritons passe également par une phase larvaire aquatique et une métamorphose. En revanche, chez les salamandres, la reproduction est terrestre avec un accouplement et ce sont les larves qui seront relâchées directement dans l'environnement aquatique, celles-ci se développant jusqu'à la métamorphose sur plusieurs mois (Taylor & Guttman 1977 ; Raffaëlli 2014 ; Miaud & Muratet 2018).

Après la métamorphose, les jeunes individus (appelés « crapelets » chez les crapauds) de la majorité des espèces d'amphibiens sortent du milieu aquatique et utilisent le milieu terrestre pour s'alimenter, se déplacer et trouver un abri. Pendant une période mal connue, ces jeunes de l'année vont s'éloigner plus ou moins de leur lieu de naissance avant de s'installer dans un abri définitif pour passer leur premier hiver (brumation) (**Figure 4 et 5**). Ces juvéniles peuvent rester plusieurs années en phase terrestre avant de rejoindre le plan d'eau pour se reproduire. C'est par exemple le cas du Crapaud commun dont les juvéniles restent en phase terrestre jusqu'à ce qu'ils atteignent la maturité sexuelle vers 3 à 4 ans. À ce moment, ils rejoignent la mare dès le printemps pour effectuer leur première reproduction (Tomasevic *et al.* 2008).

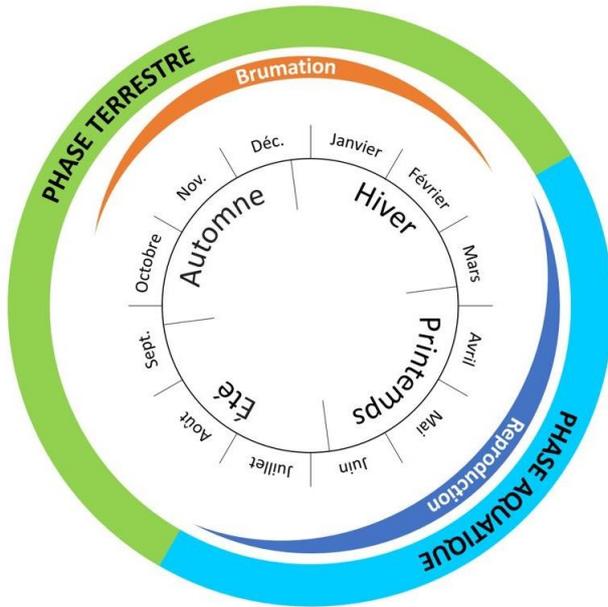


Figure 4: Différentes phases du cycle de vie des amphibiens en fonction des saisons. Les amphibiens sont en phase aquatique pour la reproduction à partir du printemps et pouvant s'étaler jusqu'à la fin juillet, après cela ils sortent de l'eau et passent en phase terrestre durant laquelle ils s'alimentent puis entrent en brumation (période de repos hivernal) à partir de l'automne et jusqu'à la fin de l'hiver en fonction de la météo et des températures extérieures.

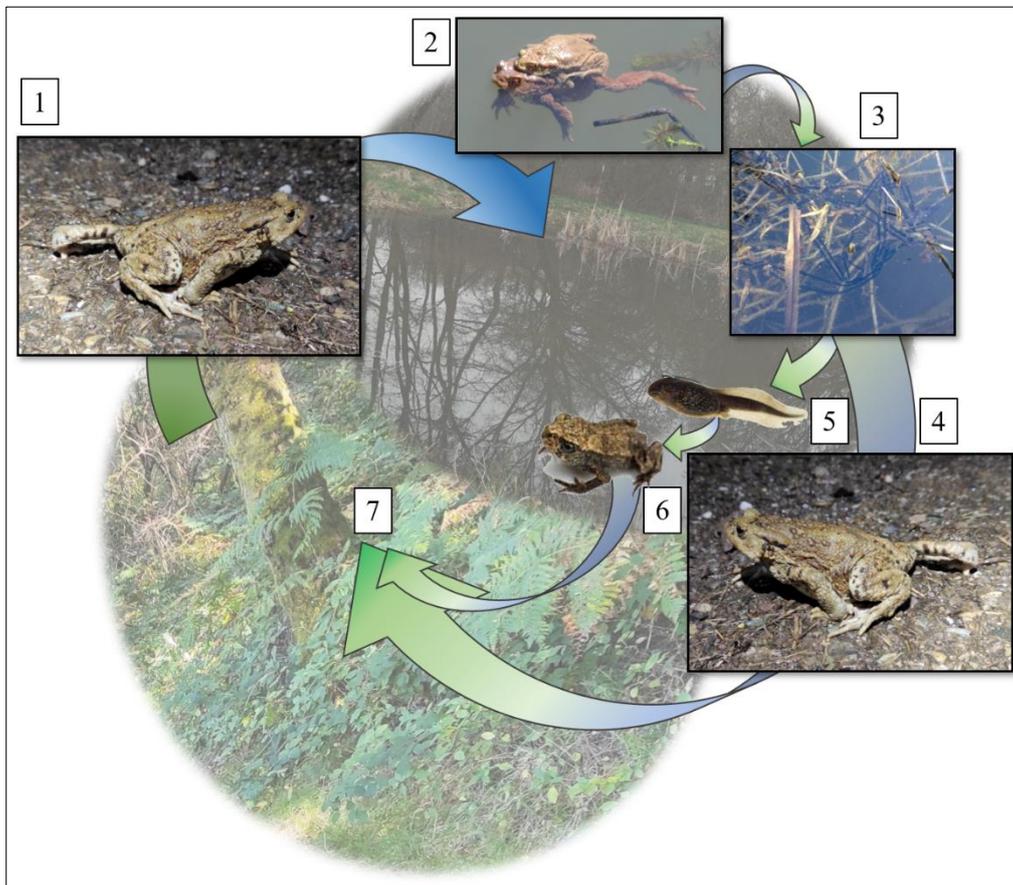


Figure 5: Cycle de vie d'un amphibien de zone tempérée. (1) Migration saisonnière, les adultes quittent l'habitat terrestre pour rejoindre l'habitat aquatique (mare) pour se reproduire, (2) reproduction, la femelle dépose ses œufs dans le fond du plan d'eau (3), (4) après la reproduction les individus adultes rejoignent l'habitat terrestre pour passer l'été et l'hiver. Les œufs (3) éclosent et donnent des têtards (5) qui se développent et se métamorphosent en juvéniles (6). Ces juvéniles quittent ensuite l'habitat aquatique pour rejoindre l'habitat terrestre (dispersion juvénile). (7) Les adultes et les juvéniles se déplacent en phase terrestre pour s'alimenter et rechercher des abris quotidiens, mais également pour passer l'hiver. La phase aquatique des adultes (2) ne dure que quelques jours en début de printemps pour la majorité des espèces alors que le développement des œufs et des larves peut durer jusqu'à la fin de l'été. (Photos© Adrien Legrand, Matthieu Berroneau & Antonin Conan)

2) Leurs habitats menacés

a) Les habitats de reproduction : les zones humides

Les zones humides constituent l'habitat aquatique naturel indispensable aux amphibiens modernes de zones tempérées (*e.g.* reproduction et développement larvaire). Néanmoins, il s'agit d'un des habitats les plus menacés au monde (Davidson 2014).

D'après la convention de Ramsar (1971), « *les zones humides sont des étendues de marais, de fagnes, de tourbières ou d'eaux naturelles ou artificielles, permanentes ou temporaires, où l'eau est stagnante ou courante, douces, saumâtres ou salées, y compris des étendues d'eau marine dont la profondeur à marée basse n'excède pas six mètres* », cette définition reconnue à l'internationale est simplifiée dans le droit français. Selon le code de l'environnement (articles L. 214-7-1 et R. 211-108), les zones humides sont des « *terrains, exploités ou non, habituellement inondés ou gorgés d'eau douce, salée ou saumâtre de façon permanente ou temporaire, ou dont la végétation, quand elle existe, y est dominée par des plantes hygrophiles pendant au moins une partie de l'année* ». Ces zones humides sont d'une grande importance, car elles abritent entre 20 et 40% de la biodiversité connue (Zhang *et al.* 2020).

Les zones humides actuelles peuvent être classées en 3 catégories :

- Les zones humides naturelles, caractérisées par une association végétale, formée naturellement. Ces zones humides naturelles sont rares dans le paysage, notamment dans les paysages entièrement façonnés par l'Homme (*e.g.* plaine agricole). En France, il reste peu de zones humides naturelles, celles-ci sont principalement des tourbières, marais littoraux ou des forêts alluviales. Néanmoins, leur caractère naturel est de moins en moins évident car l'ensemble de ces milieux est majoritairement géré par l'homme ;
- Les zones humides semi-naturelles qui à la différence des zones humides naturelles sont d'origine anthropique. C'est le cas par exemple des mares de compensation, de jardin, des ornières, des étangs ou de certains lacs ;
- Les zones humides artificielles, entièrement créées par l'homme dont la structure n'est pas biologique (*e.g.* béton, bâche plastique). Ces zones n'ont pas forcément pour but d'abriter la biodiversité et sont généralement des bassins de gestion des eaux pluviales (bassins de rétention, de gestion des eaux de carrières...).

Au cours du XX^e siècle, 60 à 70% des zones humides mondiales auraient disparu (Davidson 2014). Ce constat en fait l'habitat le plus impacté par l'érosion de la biodiversité. En France le bilan est le même, mais peu d'études récentes se sont intéressées à la dynamique de réduction des zones humides restantes. L'une d'elles montre que sur 772 zones humides intérieures de France métropolitaine, 20 % d'entre elles présentent une régression notable de leur superficie (>10 %) entre 2000 et 2010 (CGDD, 2012). Cette tendance n'est pas encline à s'inverser au regard de l'urbanisation intense observée dans notre pays (INSEE 2020).

Il en va de même pour la qualité actuelle (XXI^e siècle) de ces milieux humides résiduels. Ainsi, en France et dans le monde plus de 50% des zones humides étudiées sont dégradées (CGDD 2012 ; Davidson 2014 ; RAMSAR, 2018). Cette dégradation est due notamment à l'introduction de polluants chimiques et d'engrais, à la salinisation (anthropique ou lié à la montée des eaux littorales) et la surexploitation (*e.g.* pêche ; Smith *et al.* 2006 ; Herbert *et al.* 2015 ; RAMSAR 2018). Cela impacte négativement la biodiversité inféodée à ces habitats et les services écosystémiques qu'ils prodiguent (RAMSAR 2018).

Néanmoins, l'action anthropique sur les zones humides naturelles et semi-naturelles ne se limite pas à leur destruction et à leur dégradation, mais s'accompagne également de la création de nouvelles zones humides, dites artificielles. Elles peuvent être de différentes natures, comme par exemple des zones de gestion des eaux pluviales des carrières et des noues d'infiltration, ou encore des bassins d'orage routiers, auxquels cette thèse s'intéresse particulièrement. Toutes ces zones humides artificielles ont pour but initial le recueil d'eau (polluée ou non), créant des zones aquatiques permanentes ou temporaires pouvant offrir des habitats de substitution aux espèces inféodées aux zones humides (Lesbarrères *et al.* 2010). Ces habitats sont rapidement colonisés par la faune et la flore avec parfois une richesse spécifique comparable à celle des zones humides naturelles (Hassal & Anderson, 2015 ; Sievers, 2017 ; Jumeau *et al.* 2020). Néanmoins, la qualité de certaines d'entre elles (*i.e.* eau polluée) interroge sur la viabilité des populations s'y installant. En plus de la création de ces zones humides artificielles non initialement vouées à abriter la biodiversité, d'autres actions sont mises en place afin de protéger les zones humides naturelles restantes. En effet, la convention Ramsar datant de 1971 et mise en place dès 1975 engage les états membres (171 pays actuellement) à la conservation et l'utilisation durable des zones humides avec la création de sites Ramsar (*i.e.* zone humide d'importance internationale abritant des espèces vulnérables de poissons et d'oiseaux d'eau, il en existe 52 en France). De plus, depuis 1992 l'ensemble des zones humides est protégé par le code de l'environnement en France (via la procédure dite de « Loi sur l'eau »),

avec notamment la mise en place de plans nationaux milieux humides depuis 1995 et ce jusqu'en 2026. Ces derniers permettent de valoriser les zones humides en essayant d'abord d'acquérir de nouvelles connaissances sur ces milieux afin de mettre en place des mesures de gestion.

b) Les habitats terrestres des amphibiens, de grands oubliés de la conservation

Comme mentionné plus haut, les amphibiens des zones tempérées passent la majeure partie de leur cycle de vie dans le milieu terrestre (**Figure 4**) (Baumberger *et al.* 2019). Au cours de cette phase terrestre, les amphibiens se déplacent, parfois sur de grandes distances (*e.g.* dispersion juvénile) (Cayuela *et al.* 2020). C'est également durant cette période que les amphibiens vont s'alimenter, et rechercher des gîtes quotidiens et hivernaux (Groff *et al.* 2017). Étant sensibles à la dessiccation, de petite taille et à capacité locomotrice (*i.e.* vitesse et distance de déplacement) modeste, ils sont plus vulnérables pendant cette phase terrestre, d'autant plus lorsqu'ils rencontrent des obstacles dans le paysage (route, ville, champs) (Chelgren *et al.* 2006 ; Cayuela *et al.* 2019). En effet, il est courant d'observer chaque printemps des épisodes de pic de mortalité lorsque des routes viennent couper leurs couloirs de dispersion (Sillero 2008). Malgré l'enjeu que représentent les habitats terrestres pour ces espèces (majorité du cycle de vie, passage de l'hiver, dispersion, mortalité très élevée), il existe à l'heure actuelle peu d'études s'intéressant aux déplacements des amphibiens en phase terrestre (Eggert *et al.* 1999 ; Miaud *et al.* 2000 ; Indermaur *et al.* 2009). Il est effectivement bien plus aisé d'étudier les amphibiens au cours de leur période de reproduction, alors qu'ils sont tous concentrés sur les lieux de ponte pendant un temps relativement court, ainsi que particulièrement visibles et bruyants, plutôt qu'en phase terrestre. En effet, au cours de cette dernière, les amphibiens sont dispersés sur de grands territoires à parcourir et présentent un comportement cryptique. De plus, les pontes et les larves des différentes espèces sont facilement observables et différenciables dans les sites aquatiques pendant la reproduction. Toutefois, depuis quelques années, les avancées techniques permettent de mieux aborder les déplacements des amphibiens et l'utilisation de l'habitat pendant cette phase terrestre. Ces avancées ont été permises via deux approches complémentaires : (1) l'identification individuelle ; (2) la radio-téléométrie.

Apports via l'identification individuelle : Tout d'abord, il est possible de reconnaître les individus d'une même espèce au cours du temps, et par conséquent de suivre des déplacements

entre différents sites de reproduction. Pour ce faire, il est possible d'avoir recours à différentes méthodes plus ou moins invasives pour réaliser une identification individuelle. Dans les années 70 et jusqu'à encore récemment, le toe-clipping était une méthode courante (ablation de phalange) (Clarke 1972 ; Phillott *et al.* 2007), néanmoins cette technique est peu éthique (Drechsler *et al.* 2015). De nos jours elle est jugée obsolète et proscrite. Les avancées techniques ont amené à des méthodes alternatives comme l'implantation d'élastomères fluorescents de petite taille ou encore de micro-puces RFID (PitTag) en sous-cutané permettant un suivi individuel fiable (Osborn *et al.* 2011 ; Le Chevalier *et al.* 2017 ; Testud 2020). Pour certaines espèces présentant des motifs contrastés sur le corps, il est possible d'avoir recours à la photo-identification, une méthode non invasive et de plus en plus testée et développée ces dernières années (Matthé *et al.* 2017 ; Burgstaller *et al.* 2020 ; Dalibard *et al.* 2021). L'identification individuelle en suivant des protocoles de capture-marquage-recapture (CMR) permet donc de mettre en évidence des déplacements. Néanmoins il s'agit d'évènements isolés, aléatoires avec une impossibilité de retracer les déplacements fins en phase terrestre comme peuvent l'apporter d'autres techniques (*e.g.* suivi GPS).

Apports via la radio-téléométrie : Cette technique existe depuis les années 1960 et permet en localisant des individus porteurs d'un radio-émetteur de suivre et quantifier le déplacement des animaux *in natura*, à différentes échelles de distances et de durée. Elle était utilisée uniquement sur les gros animaux, ce qui était à l'époque une révolution dans l'histoire de la biologie de terrain (MacDonald 1978). Aujourd'hui avec la miniaturisation de l'électronique embarquée, il est possible de suivre des animaux de plus petite taille comme les amphibiens, et ce sur plusieurs mois. Ces dernières années, cette technique a été utilisée en Europe en privilégiant l'étude de diverses espèces en danger (*e.g.* Crapaud vert, Pélobate brun).

Ces avancées technologiques sont des outils importants pour mieux connaître les déplacements des amphibiens pendant la phase terrestre et à terme mener à bien des politiques efficaces pour limiter les menaces qui pèsent sur ces espèces. Cela permettrait également de mettre en place des mesures de gestion et de protection des milieux favorables aux amphibiens, particulièrement vulnérables sur l'ensemble de leur cycle de vie.

Tout au long de leur vie, les amphibiens vont utiliser un ensemble d'éléments du paysage qui correspond à leur domaine vital (Burt 1943). Au sein de ce domaine vital, les animaux vont réaliser des déplacements sur de plus ou moins longues distances (Joly 2019). Il s'agit d'abord de déplacements quotidiens qui s'effectuent sur de petites distances, essentiellement pour la recherche alimentaire (« foraging »), mais également pour éviter les

prédateurs et rechercher des gîtes quotidiens. Des déplacements saisonniers entre le(s) site(s) aquatique(s) de reproduction et le(s) site(s) terrestre(s) d'hivernage s'y observent également. Ces derniers s'opèrent sur de plus grandes distances et sont dépendants des espèces (Joly 2019). Par exemple, lors des migrations pré-reproduction (*i.e.* adulte) les individus peuvent parcourir plusieurs dizaines de kilomètres (10 km chez la Grenouille rousse *Rana temporaria* ; Beshkov & Angelova, 1981 et 12 km chez le Crapaud calamite *Epidalea calamita* ; Sinsch *et al.* 2012). Enfin, certains individus adultes peuvent également quitter leur domaine vital initial, composé de leur site de naissance ou de reproduction, pour en acquérir un nouveau, il s'agit d'un phénomène de dispersion adulte (Clobert *et al.* 2009 ; Joly 2019). Il est alors possible de différencier une dispersion juvénile d'une dispersion adulte qui d'après Joly (2019) peut chez certaines espèces représenter un faible pourcentage d'individus. L'efficacité de ces déplacements dépend de plusieurs variables tels que les capacités de locomotion de l'espèce, la qualité du paysage traversé (plus ou moins favorable), ou encore les mécanismes d'orientation et de sélection des sites (Joly 2019). Par exemple, les Anoures ou Urodèles sont attirés vers les mares de reproduction par les chants d'autres individus de la même espèce ou d'autres espèces d'amphibiens (Gerhardt 1995 ; Yeager *et al.* 2014 ; Muller & Schwarzkopf 2017). Certaines espèces peuvent également utiliser la vision, l'olfaction et le magnétisme terrestre pour s'orienter (Wilson 2001 ; Sinsch 2006 ; Joly 2019) mais aussi utiliser des cartes mentales pour se déplacer dans des environnements déjà visités, voir familiers (Wilson 2001 ; Knight 2019 : *Dendrobates auratus*).

3) État de conservation des amphibiens

Dans le monde, 41% des espèces d'amphibiens sont menacées. En France métropolitaine, on retrouve 37 espèces d'amphibiens autochtones dont 13 Urodèles et 24 Anoures, toutes protégées au niveau national et inscrites sur la liste rouge de l'UICN (UICN 2015). Un arrêté fixant la liste des amphibiens et « reptiles » protégés sur l'ensemble du territoire national a été mis en place et mis à jour le 8 janvier 2021. Cet arrêté stipule que sur l'ensemble du territoire métropolitain, pour la quasi-totalité des espèces d'amphibiens (N=35/37, **Tableau 1**), « *il est interdit de détruire ou d'enlever les œufs, larves et nids ainsi que de détruire, mutiler et capturer tout individu de ces espèces* ». De plus, pour ces mêmes espèces, « *la détention, le transport, la naturalisation, ainsi que la vente ou l'achat d'animaux vivants ou morts ou sous-parties prélevés dans la nature est interdit* » (legifrance.gouv.fr).

Enfin, pour certaines espèces (N=25/37, **Tableau 1**), les règles s'appliquent également aux habitats retrouvés dans l'aire de déplacement naturel des noyaux de populations où il est interdit « de détruire, altérer ou dégrader les sites de reproduction et les aires de repos. Ces interdictions prennent compte des éléments physiques et biologiques nécessaires à la reproduction et au repos des espèces considérée tout au long de leur cycle de vie ». Même si cet arrêté est une avancée significative dans la loi pour la protection de ce taxon menacé, on peut observer que les espèces les plus protégées ne sont pas forcément celles dont le statut de conservation est le plus préoccupant (e.g. Salamandre noire ; **Tableau 1**).

Tableau 1: Espèces d'amphibiens concernées par l'arrêté du 8 janvier 2021 avec leur statut de conservation en France (UICN 2015)

| Espèce | |
|---|---|
| Alyte accoucheur (<i>Alytes obstetricans</i>) LC | Rainette verte (<i>Hyla arborea</i>) NT |
| Crapaud calamite (<i>Epidalea calamita</i>) LC | Rainette méridionale (<i>Hyla meridionalis</i>) LC |
| Crapaud commun (<i>Bufo bufo</i>) LC | Rainette ibérique (<i>Hyla molleri</i>) VU |
| Crapaud épineux (<i>Bufo spinosus</i>) LC | Rainette corse (<i>Hyla sarda</i>) LC |
| Crapaud vert (<i>Bufo viridis</i>) NT | Salamandre tachetée (<i>Salamandra salamandra</i>) LC |
| Discoglosse corse (<i>Discoglossus montalentii</i>) NT | Salamandre noire (<i>Salamandra atra</i>) VU |
| Discoglosse sarde (<i>Discoglossus sardus</i>) LC | Salamandre de Lanza (<i>Salamandra lanzai</i>) NT |
| Grenouille agile (<i>Rana dalmatina</i>) LC | Sonneur à ventre jaune (<i>Bombina variegata</i>) VU |
| Grenouille commune (<i>Pelophylax kl. esculentus</i>) NT | Calotriton des Pyrénées (<i>Calotriton asper</i>) VU |
| Grenouille des champs (<i>Rana arvalis</i>) EN | Euprocte Corse (<i>Euproctus montanus</i>) LC |
| Grenouille des Pyrénées (<i>Rana pyrenaica</i>) EN | Spéléropès de Strinati (<i>Speleomantes strinati</i>) LC |
| Grenouille de Graf (<i>Pelophylax kl. grafi</i>) NT | Triton alpestre (<i>Ichthyosaura alpestris</i>) LC |
| Grenouille de Lessona (<i>Pelophylax lessonae</i>) NT | Triton crêté (<i>Triturus cristatus</i>) NT |
| Grenouille de Pérez (<i>Pelophylax perezi</i>) NT | Triton marbré (<i>Triturus marmoratus</i>) NT |
| Pélobate brun (<i>Pelobates fuscus</i>) EN | Triton palmé (<i>Lissotriton helveticus</i>) LC |
| Pélobate cultripède (<i>Pelobates cultripes</i>) VU | Triton ponctué (<i>Lissotriton vulgaris</i>) NT |
| Pélodyte ponctué (<i>Pelodytes punctatus</i>) LC | |

Les espèces en gras sont celles dont les habitats sont également protégés ; EN : En Danger, VU : Vulnérable, NT : Quasi menacé, LC : Préoccupation mineure.

Malgré ces statuts de protection, la tendance démographique de 25 espèces d'amphibiens françaises est toujours en baisse (SHF 2021). D'autre part, certaines espèces considérées comme communes telles que la grenouille rousse (*Rana temporaria*) et la grenouille commune (*Pelophylax kl. esculentus*) sont considérées comme « chassables » avec autorisation de chasse du préfet sur une période maximale de 10 mois par an (article R346-11 du code de l'environnement). Alors que d'après l'article 4 de l'arrêté du 8 janvier 2021, il est :

« interdits sur le territoire métropolitain la mutilation, la naturalisation le colportage, la mise en vente, l'achat et l'utilisation commerciale ou non » de ces espèces (legifrance.gouv.fr).

II) Déclin des amphibiens

1) Causes de ce déclin

Plusieurs causes sont responsables du déclin des amphibiens dans le monde. Tout d'abord, l'introduction d'espèces exotiques envahissantes comme les espèces d'ornement (Grenouille taureau, *Lithobates catesbeianus*) ou encore échappées d'élevage (Écrevisse de Louisiane, *Procambarus clarkii*) entraîne une compétition interspécifique pour les ressources, voir une prédation directe (Dejean *et al.* 2012 ; Nunes *et al.* 2019). Cette introduction de nouvelles espèces peut également entraîner l'apparition de maladies émergentes (Chytridiomycose, Ranavirose) pouvant décimer des populations entières (Stuart *et al.* 2004 ; Oficialdegui *et al.* 2019). De plus, et comme c'est également le cas pour de nombreuses espèces, le réchauffement climatique accélère ce déclin en augmentant la fréquence des épisodes de sécheresses et de records caniculaires (Pounds 2001 ; Stuart *et al.* 2004 ; Spinoni *et al.* 2019). Il existe d'autres menaces telles que la destruction d'individus à des fins de consommations, ou la pollution des habitats. La principale menace pesant sur les amphibiens des zones tempérées à haute densité humaine et industrialisées reste la fragmentation des paysages. Celle-ci inclue à la fois destruction des habitats aquatiques et terrestres, isolement et poursuite de l'érosion des habitats résiduels (Stuart 2004 ; Cushman 2006 ; Joly 2009)

Dans une logique de biologie de la conservation, il est indispensable de comprendre ces menaces et leurs mécanismes afin d'essayer d'enrayer le déclin des amphibiens. Par ailleurs, les amphibiens sont d'excellents modèles permettant ainsi d'étudier l'impact sur une biodiversité plus large ou encore pour estimer la qualité des habitats qu'ils occupent. Ils ont été largement utilisés dans les études éco-toxicologiques afin de mettre en évidence des effets induits par différents types de polluants (*e.g.* perturbateurs endocriniens) (Kloas & Lutz 2006). Comme précisé précédemment (§ I.a.), leur peau perméable les rend plus sensibles à l'impact des polluants présents dans l'eau et dans l'air (*e.g.* métaux lourds, pesticides), avec des conséquences directes sur la viabilité des populations et leur succès reproducteur. Finalement le cycle de vie biphasique des amphibiens, comprenant de longs déplacements saisonniers entre

deux milieux contrastés, est un avantage pour étudier l'impact de la fragmentation des paysages sur ces espèces, et par conséquent sur d'autres taxons moins accessibles mais aussi concernés.

a) Fragmentation des paysages

La fragmentation des paysages est la conséquence de deux phénomènes distincts interagissant de façon complexe sur l'habitat et la biodiversité concernée :

- (i) Tout d'abord la perte d'habitat, un phénomène par lequel l'habitat disparaît ou se détériore au fil du temps, avec une réduction des surfaces favorables ;
- (ii) Le morcellement des habitats, ou fragmentation « *per se* », représentant une modification de la structure spatiale des zones favorables résiduelles (**Figure 6**). Pour une surface donnée, plus un modèle est fragmenté plus il comportera un grand nombre d'unités d'habitats (ou taches), sans qu'il y ait une réelle perte surfacique d'habitat (**Figure 6**).

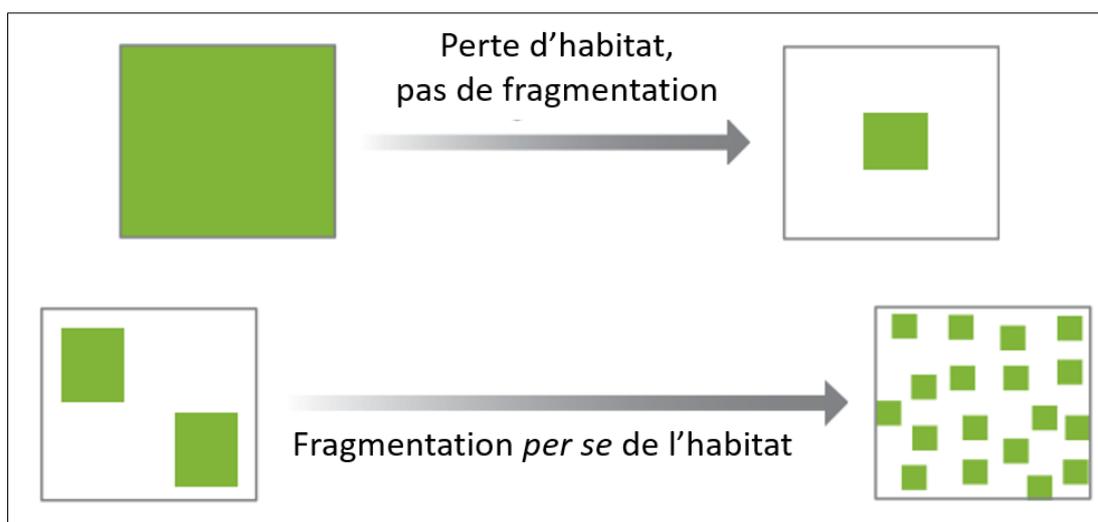


Figure 6 : Représentation de la perte d'habitat et de la fragmentation *per se*, d'après Fahrig 2017.

Contrairement aux idées reçues, la fragmentation *per se* est un phénomène dont les conséquences peuvent être essentiellement positives pour certaines espèces, car elle induit des paysages plus hétérogènes et plus résistants aux extinctions (Fahrig 2017). Au contraire la perte d'habitat associée à la fragmentation du paysage entraîne des répercussions négatives sur la biodiversité. Que les effets soient dus à la perte d'habitat ou à la fragmentation *per se*, il n'en reste pas moins que nombre d'entre elles sont liées à une modification de la connectivité du paysage.

La connectivité paysagère peut être définie comme la capacité du paysage à faciliter les flux biologiques (Taylor *et al.* 1993). Au sein d'un paysage, l'absence de connexion entre habitats favorables (appelés taches d'habitats) entraîne une incapacité d'échange d'individus entre populations, conduisant à leur séparation spatiale voir à leur extinction locale (Rudnick *et al.* 2012). La connectivité d'un paysage s'étudie à travers deux composantes :

- (i) Tout d'abord par la connectivité structurelle, qui est la continuité physique des taches d'habitats dans un paysage. Elle est caractérisée par la structure des taches, la distance entre elles, la largeur des corridors et par les habitats naturels qui les composent (Tischendorf & Fahrig 2000). Ainsi l'étude de la connectivité structurelle passe essentiellement par une approche géométrique du paysage ;
- (ii) Bien qu'une bonne connectivité structurelle soit le prérequis au déplacement des espèces, elle ne garantit pas que ces espèces se déplacent réellement, c'est-à-dire que la connectivité soit fonctionnelle. Une seconde composante appelée connectivité fonctionnelle, prend alors en compte les facteurs liés à la mobilité de chaque organisme (capacité de dispersion) ainsi que de la perception du paysage (Taylor *et al.* 1993 ; Tischendorf & Fahrig 2000 ; Diniz *et al.* 2019). Par exemple, certaines espèces sont plus sensibles à la présence de corridors et d'autres à la taille des taches. De plus la fragmentation du paysage peut avoir un plus grand impact chez certaines espèces en raison de leur faible capacité de déplacement (Uezu *et al.*, 2005). Par conséquent il est important d'intégrer cette composante fonctionnelle à la connectivité structurelle afin d'étudier le réel effet de la fragmentation, dont les deux principales causes sont l'agriculture intensive et l'urbanisation, avec le développement des infrastructures linéaires de transport (Rudnick *et al.* 2012).

b) Agriculture intensive

À travers le monde et depuis l'ère industrielle s'observe une intensification des modifications des paysages liées aux activités humaines. Pour commencer, le changement des pratiques agricoles au cours du XX^e siècle et notamment via les pratiques de remembrement consistant à fusionner de petites parcelles en supprimant leurs limites (chemins creux, haies et bosquets), a provoqué une forte perte d'habitats, une augmentation considérable de la taille des parcelles et une homogénéisation des paysages (Stoate *et al.* 2001). En effet, Lowder *et al.* (2016) montrent que la taille moyenne des parcelles de culture d'une majorité de pays dans le

monde a nettement augmenté au cours du XX^e siècle. Par exemple, aux États-Unis, cette taille varie de 122 ha en 1960 à 178 ha en 2000 et ce constat est encore plus inquiétant pour la France, où la surface moyenne des parcelles est passée de 18 ha en 1960 à 45 ha en 2000 (soit une multiplication par 2,5), traduisant bien le résultat du remembrement (**Figure 7**). L'augmentation continue de la surface des parcelles s'est accompagnée d'une homogénéisation des cultures, avec comme conséquence pour les espèces à faible rayon d'action une fragmentation et une diminution de connectivité entre les taches d'habitats (Wiens, 2009). Le remembrement est un cas de défragmentation *per se* puisque ce processus fusionne des habitats morcelés. De plus, ces aménagements fonciers agricoles et forestiers ont contribué à faciliter le développement du réseau routier car ils permettent d'extraire du cadastre les surfaces nécessaires à la réalisation des projets routiers.



Figure 7 : Évolution du paysage au niveau de la commune de Wolfisheim (67) entre 1950 et 2022. On observe bien une diminution du nombre de parcelles et une augmentation de la taille des parcelles dues au remembrement et à l'apparition de la monoculture, mais également une expansion des zones urbaines avec apparition de nouvelles routes. Source : geoportail.gouv.fr

c) Urbanisation : les infrastructures linéaires de transport

La fragmentation des paysages est également liée à l'urbanisation avec l'expansion des villes et villages, reliés entre eux par des Infrastructures Linéaires de Transport (ILT) : routes, canaux, réseaux ferroviaires ou hautes-tension (Mader 1984 ; Rudnick *et al.* 2012). Au sein de l'urbanisation, ces ILTs sont la principale cause de fragmentation *per se* et de modification de la connectivité du paysage, mais ils entraînent également une destruction directe des habitats, tout comme l'expansion urbaine (Fahrig *et al.* 1995 ; Forman & Alexander 1998 ; Maxwell *et al.* 2016). En France, le réseau routier ne cesse de se développer, avec une augmentation de

16% entre 1990 et 2014. Aujourd'hui, il est le plus conséquent d'Europe avec plus d'un million de kilomètres linéaires (Villemey *et al.* 2018).

Les ILTs impactent par ailleurs directement la faune sauvage en entraînant une hausse de la mortalité (collision, noyade, électrocution). Pour la faune terrestre, la création de ces infrastructures interrompt leurs couloirs préférentiels de dispersion, induisant un isolement relatif des populations de part et d'autre de l'ouvrage et l'apparition de hotspots de mortalité, notamment sur les routes ou les voies ferrées (Fahrig *et al.* 1995 ; Forman & Alexander 1998 ; Corlatti *et al.* 2009). De plus, les ILTs vont ajouter diverses sources de pollution : lumineuse, sonore, et chimique, venant s'ajouter à la pollution agricole déjà présente (Forman & Alexander, 1998 ; Neff *et al.*, 2005 ; Gaston *et al.*, 2018). La surface affectée par la pollution des routes (« road-effect zone », Peaden *et al.*, 2015) est plus vaste dans les régions développées, et couvrirait la quasi-totalité de la surface de l'Europe occidentale et environ 20% de la surface terrestre à l'échelle de notre planète (Ibisch *et al.*, 2016). Outre les pollutions de l'air, la pollution chimique est principalement causée par les eaux de ruissellement des routes, qui contiennent des cocktails de divers composés tels que des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP ; Neff *et al.*, 2005), des métaux lourds (Wik *et al.*, 2008) et des chlorures (provenant du sel de déneigement ; Collins & Russells, 2009 ; Brand *et al.*, 2010). Cette pollution chimique est particulièrement problématique pour les écosystèmes aquatiques et par conséquent pour les zones humides (Forman & Alexander, 1998 ; Spellerberg, 1998).

Pour finir, les ILTs sont généralement bordées de linéaires enherbés : les dépendances vertes ou bandes herbacées. Des études récentes tendent à montrer que dans des paysages fortement modifiés et fragmentés par les ILTs et l'agriculture intensive, ces dépendances vertes peuvent être utilisées par la faune et servir de zones refuges ou de couloir de dispersion (Ruiz-Capillas *et al.* 2013 ; Jumeau *et al.* 2017). Ce sont les seules zones encore enherbées dans le paysage après les labours, et ce jusqu'au retour d'un couvert suffisant plusieurs mois plus tard. Cela est particulièrement le cas dans les régions comme l'Alsace, où la monoculture de maïs et de blé est devenue prédominante (Jumeau 2017 ; Tissier 2017).

2) Conséquences sur le déclin des amphibiens

La fragmentation des paysages induite par l'intensification des pratiques agricoles et de l'urbanisation a pour conséquences la réduction et l'isolement des taches d'habitats (Fahrig 2003, 2017). L'isolement de populations animales et végétales peut entraîner à son tour une diminution de la taille de ces populations ainsi qu'une augmentation de la consanguinité et de ses effets délétères (Fahrig 2003 ; Corlatti *et al.* 2009 ; Rudnick *et al.* 2012). En effet, l'isolement des populations entraîne une diminution des flux de gènes et donc de la diversité génétique au sein de la population pouvant se traduire par une baisse du potentiel adaptatif les rendant plus vulnérables aux changements environnementaux (Frankham *et al.* 2002 ; Corlatti *et al.* 2009). Par ailleurs, cet isolement des populations et l'appauvrissement des milieux amènent les animaux à se déplacer sur de plus longues distances et à traverser les ILTs, augmentant la probabilité de mortalité par collision (Bruinderink & Hazebroek 1996 ; Laist *et al.* 2001 ; Rao & Girish 2007). Chaque année sont observés des pics de mortalité routière pouvant parfois être très localisés (*i.e.* hotpost de mortalité), particulièrement chez des espèces avec des migrations saisonnières comme les amphibiens. Cette hausse de la mortalité va entraîner une diminution des tailles de population et de fait contribuer à l'appauvrissement génétique (Gibbs & Shriver 2005 ; Cushman 2006). Combinées, ces conséquences génétiques et démographiques peuvent aboutir à une diminution de la viabilité des populations (vortex d'extinction, Frankham *et al.* 2002 ; Palomares *et al.* 2012).

Les diverses sources de pollution, qu'elles soient chimiques, sonores ou lumineuses, ont elles aussi un grand impact sur la reproduction et la survie des amphibiens (Brand *et al.* 2010 ; Troïanowski *et al.* 2015 ; Gaston *et al.* 2017 ; Sievers *et al.* 2018 ; Touzot *et al.* 2019). Par exemple il a été montré que les pollutions sonore et lumineuse pouvaient impacter la qualité individuelle et les comportements de reproduction (*e.g.* sélection sexuelle) chez certaines espèces, mais également leur système immunitaire, les rendant moins résistantes aux maladies émergentes (Troïanowski *et al.* 2017 ; Secondi *et al.* 2021 ; Touzot *et al.* 2021). Néanmoins, c'est l'impact de la pollution chimique qui a été le plus étudié jusqu'ici sur les amphibiens.

On trouve dans la littérature un grand nombre d'études qui concerne soit les polluants d'origines agricoles comme les pesticides ainsi que certains engrais, soit les polluants d'origine routière comme les hydrocarbures, les métaux lourds et le sel de déneigement (Egea-Serrano *et al.* 2012). Pour l'ensemble de ces composés, des effets négatifs notables (létaux et sublétaux) ont été mis en évidence chez les amphibiens, parmi lesquels une diminution des taux de survie

et de croissance, une augmentation de l'occurrence de malformations (externes et internes) ainsi qu'une altération des comportements (Snodgrass *et al.* 2008 ; Hayes *et al.* 2010 ; Sievers *et al.* 2019). Ainsi d'après la review de Egea-Serrano *et al.* (2012) qui s'est intéressée à cette thématique chez les amphibiens, 256 études ont montré que la survie était impactée négativement par ces polluants chimiques et 33 études ont observé la présence de malformations chez des individus mis en contact avec des polluants en conditions expérimentales. Ces études ont également distingué des variations inter-polluants. Par exemple les sels de déneigement ont un plus grand effet négatif sur la survie, contrairement aux pesticides et composés azotés. En revanche cette review datant de 2012 ne compte que 3 études sur les métaux lourds, dans lesquelles aucun impact négatif sur la survie n'a pu être mis en évidence, à l'inverse d'autres études parues dans les années 2000 (Lefcort *et al.* 1998 ; James & Little 2003). De plus, pour l'ensemble de ces polluants, des malformations internes et externes ont été observées, entraînant parfois des modifications de comportement (*e.g.* nage des têtards) (Lefcort *et al.* 1998 ; Hayes *et al.* 2010 ; Egea-Serrano *et al.* 2012 ; Sievers *et al.* 2019). Ces modifications pourraient également réduire la vitesse de fuite face à un prédateur (Sievers *et al.* 2018, 2019). Finalement, la réponse à ces polluants chimiques est très variable entre espèces, avec des espèces moins sensibles que d'autres à certains polluants (Egea-Serrano *et al.* 2012). C'est par exemple le cas du Crapaud vert (*Bufo viridis*), qui ferait partie des espèces les plus tolérantes aux concentrations en sel (~15g/L *i.e.* 50 % d'eau de mer, Katz 1973, 1975 ; Katz & Gabbay 1986).

3) Comment limiter les causes et conséquences : le cas particulier des bassins d'orage routiers

Afin de réduire les effets négatifs de la fragmentation des paysages et améliorer la connectivité paysagère, des mesures de réduction sont mises en place. En ce qui concerne les ILTs, ces mesures sont très diversifiées, avec par exemple des « batrachoducs », ou passages à petite faune spécifiques aux amphibiens (Lesbarrères & Fahrig 2012 ; Testud & Miaud 2018). Plus généralement ces passages sont composés d'une clôture empêchant les individus d'accéder aux voies des ILTs, mais indispensable pour les guider jusqu'à un tunnel ou à un pont leur permettant de traverser de manière sécurisée (**Figure 8**). Ils sont supérieurs (au-dessus de l'ILT) ou inférieurs (en dessous de l'ILT) et permettent de limiter les pics de mortalités routières au moment de la migration printanière (Yanes *et al.* 1995 ; Clevenger *et al.* 2001 ; Testud & Miaud

2018).

Ces passages à faunes peuvent être spécifiques ou non, c'est-à-dire dédiés à la faune ou non. Dans ce dernier cas, on parle entre autres de passages mixtes, par exemple un passage hydraulique couplé à une banquette latérale permettant le passage de la petite faune. Afin de s'adapter aux préférences des espèces, les passages pour la grande faune sont distingués des passages pour la petite faune (**Figure 8** ; Carsignol 2005).

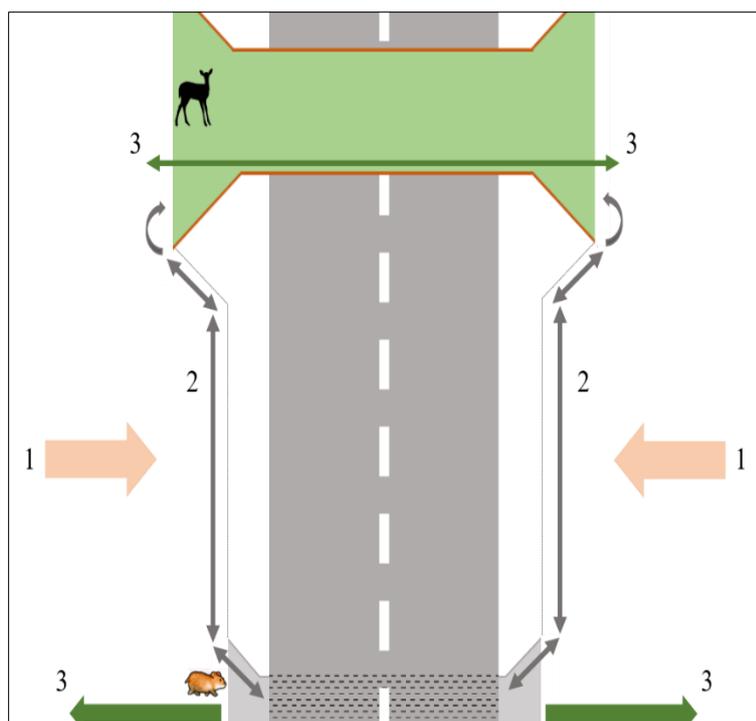


Figure 8 : Schéma d'une route avec présence d'un passage à grande faune supérieur (A) et d'un passage à petite faune inférieur (B). Les animaux arrivent à proximité de la route (1), ils longent la clôture qui les guide jusqu'au passage à faune le plus proche (2) afin de traverser la route en toute sécurité

Si les passages à faune commencent à être connus du grand public, le défi que représente la gestion de l'eau de ruissellement et son impact sur la biodiversité sont quant à eux méconnus. C'est pourtant un des grands défis auxquels font face tous les projets d'aménagement du territoire. Lors de précipitations, les polluants accumulés sur les voies sont emportés par les eaux de ruissellement, qu'il faut alors acheminer et stocker sur un site provisoire pour éviter une submersion de ces voies et une contamination de l'environnement. Ainsi une complexification du réseau hydraulique ces dernières décennies est observée, contenant fossés, conduites, mais aussi et surtout des bassins de gestion et dépollution des eaux. Ces bassins sont qualifiés de bassins d'orage (EPA 2009) et servent à capter, stocker et dépolluer l'eau de ruissellement de la chaussée. Cette dépollution se fait par décantation, permettant par la suite d'évacuer l'eau dépolluée dans l'environnement (**Figure 9**). Or malgré la présence de polluants dans ces bassins, il a été montré qu'ils pouvaient être colonisés par la faune et la flore

(Le Viol *et al.* 2012 ; Hassall & Anderson 2015 ; Jumeau *et al.* 2020). Dans des paysages dégradés et traversés par un réseau routier dense, comme c'est le cas par exemple en Alsace avec une agriculture intensive, différentes espèces d'amphibiens sont présentes dans les bassins d'orage (Jumeau *et al.* 2020). Toutefois, même si ces derniers sont fortement utilisés par les amphibiens, il n'est pas possible d'exclure un éventuel effet de piège écologique, lié ou non à la pollution des eaux (Snodgrass *et al.* 2008 ; Sievers *et al.* 2018). De ce fait afin d'empêcher l'accès aux animaux ces bassins sont souvent clôturés, même si cette mesure s'avère inefficace pour la petite faune (Jumeau *et al.*, 2020).

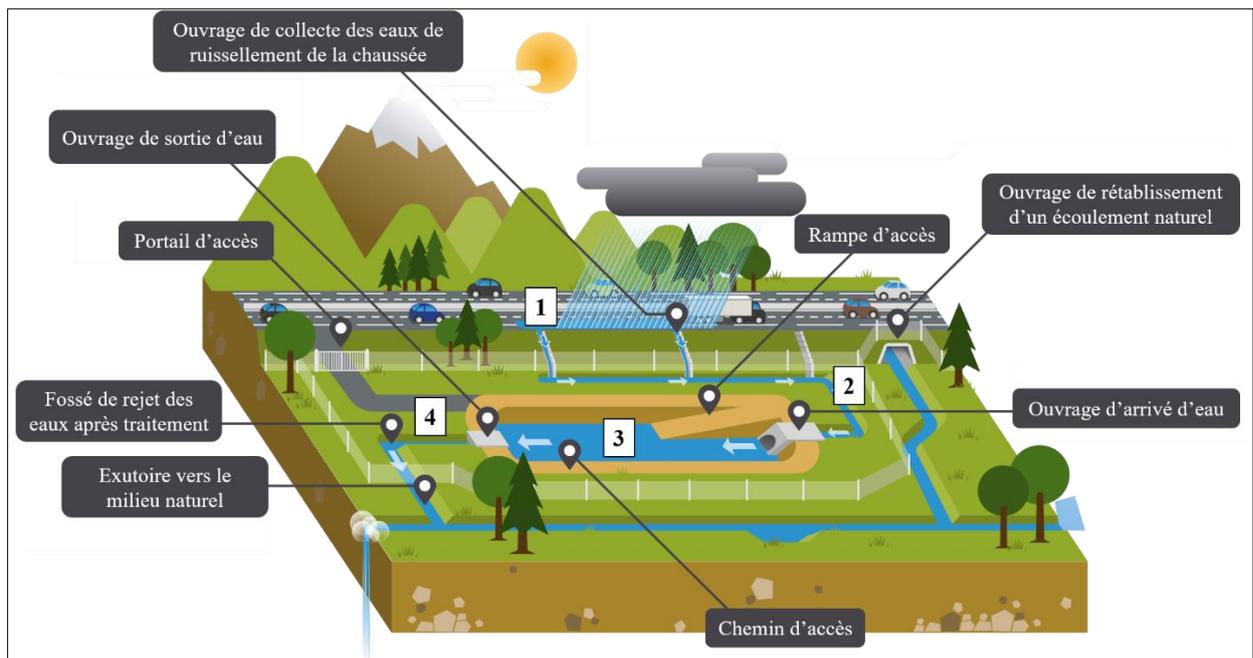


Figure 9 : Schéma d'un bassin d'orage routier, d'après VINCI Autoroutes. (1) L'eau de ruissellement s'écoule sur la chaussée jusqu'aux ouvrages de collecte, (2) l'eau chargée en polluants provenant de la chaussée est amenée jusqu'au bassin, (3) dépollution des polluants plus lourds (e.g. métaux lourds) par décantation, (4) rejet de l'eau dépolluée dans l'environnement.

III) Pièges écologiques

1) Définition

Le terme de « *piège écologique* » apparaît pour la première fois au début des années 70 (Dwernychuk 1972). Cependant, jusque dans les années 2000, il était confondu avec la notion de « *puits* » (Battin 2004). Pour une espèce donnée, un piège écologique est un habitat présentant une forte attractivité, alors que sa mauvaise qualité environnementale entraîne un effet négatif sur la valeur sélective des individus « piégés » (*fitness*, e.g. survie, reproduction ; Schlaepfer *et al.* 2002). En revanche, un puits ne présente pas forcément une forte attractivité,

mais jouera un rôle majeur dans la dynamique de la métapopulation en entraînant une faible croissance, généralement induit par un manque de ressources dans cet habitat. Par conséquent, un piège écologique peut devenir un puits démographique au niveau local si celui-ci impacte négativement la dynamique de la métapopulation (Battin 2004).

Les pièges écologiques sont majoritairement associés à des milieux anthropisés ou à des paysages fortement modifiés par l'homme (Schlaepfer *et al.* 2002 ; Robertson *et al.* 2013). La restauration dans un but de conservation de certains habitats peut également conduire à la formation de pièges écologiques (Severns 2011 ; Robertson *et al.* 2013). En effet aux États-Unis il a été montré que la restauration de zones humides augmentait l'apparition de plantes hôtes, plus facilement détectables par une espèce de papillon (*Lycaena xanthoides*) qui y pondent préférentiellement. Or les zones inondées sont non favorables au développement larvaire de ce papillon, menant ainsi à un piège écologique pour l'espèce (Severns 2011). De plus, la formation de ces pièges peut être due à l'apparition soudaine de changements naturels ou semi-naturels dans l'environnement, comme l'apparition d'espèces exotiques, de nouveaux parasites, de prédateurs ou de polluants (Robertson & Hutto, 2006 ; Robertson *et al.* 2013) (**Figure 10**).

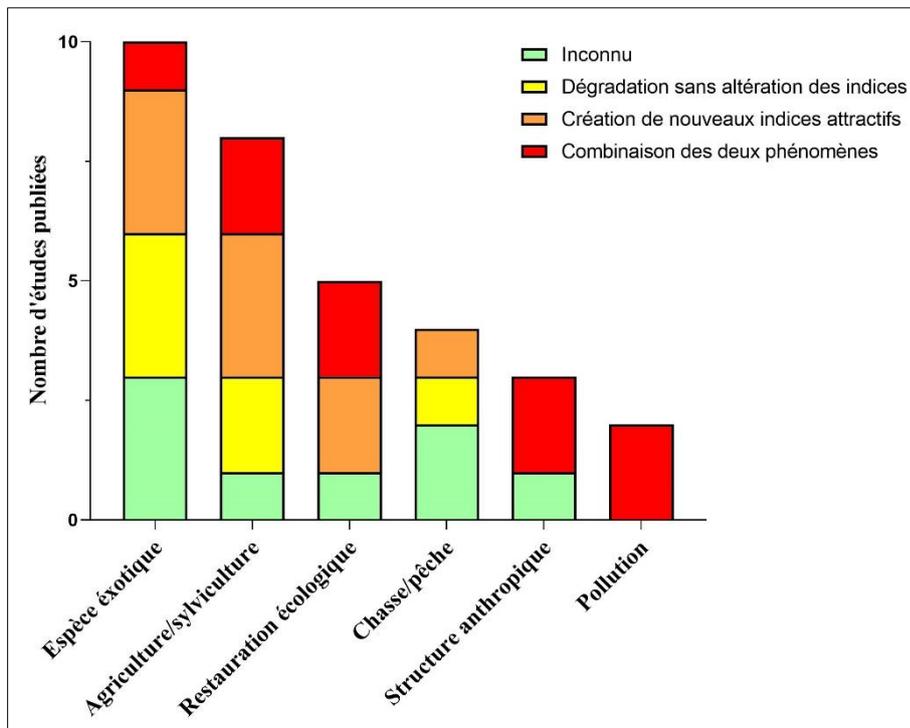


Figure 10 : Nombre d'études publiées mettant en évidence les principales activités anthropiques associées à l'apparition de pièges écologiques. Les barres de couleurs indiquent le nombre d'études distinguant les différents mécanismes généraux responsables de l'apparition de pièges. D'après Robertson et al. 2013.

Un piège écologique est donc un habitat très attractif mais de mauvaise qualité dont certains indices environnementaux « malhonnêtes » émis trompent une majorité d'individus les poussant à le choisir au détriment d'un habitat plus favorable (**Figure 11**) (Schlaepfer *et al.*

2002). Cette préférence résulte d'un phénomène adaptatif car les indices émis permettent généralement d'anticiper l'état futur d'un habitat. De fait, le terme de « *piège évolutif* » est parfois substitué à celui de « *piège écologique* » (Schlaepfer *et al.* 2002). Lors de changements rapides dans le temps, l'individu trompé pourrait ne pas avoir la plasticité phénotypique nécessaire pour évaluer la qualité de l'habitat afin de répondre à une situation nouvelle (Battin 2004). Dans ce contexte, l'habitat joue ce rôle de piège évolutif lorsqu'un organisme est contraint par son passé (évolutif) à faire une erreur de sélection d'habitat alors qu'un habitat plus favorable est présent ailleurs (**Figure 11**). Retrouvés chez de nombreux taxons animaux et végétaux, les pièges écologiques peuvent mener à des extinctions locales (Battin 2004).

2) Qu'en est-il pour les amphibiens ?

L'altération des zones humides naturelles (voir plus haut en I. b.) entraîne une dégradation ou une disparition de sites de reproduction des amphibiens. Cela amène les populations concernées à se reproduire dans des sites d'origine anthropique (*i.e.* site de substitution), comme des mares de carrière, des mares semi-naturelles, des ornières de chantiers ou encore des bassins d'orage routiers (Lesbarrères *et al.* 2010). Ces différents sites ne sont pas tous des pièges écologiques mais certaines de leurs caractéristiques peuvent affecter négativement la reproduction et la survie des amphibiens. Par exemple certaines mares semi-naturelles possèdent une berge avec une pente abrupte, rendant difficile la sortie des amphibiens et empêchant la présence d'une fine lame d'eau chaude en bordure, favorable au développement larvaire. Les mares de carrière ainsi que les ornières de chantiers ont quant à elles tendance à avoir une hydropériode (=durée pendant laquelle de l'eau est présente) courte qui est d'autant plus accentuée/variable avec le réchauffement climatique (Brand & Snodgrass 2010 ; McCarthy & Lathrop 2011 ; Clevenot *et al.* 2018). Des assèchements précoces peuvent se produire chaque année ou seulement lors de grosses canicules dont la fréquence ne cesse d'augmenter d'année en année (Grillakis 2019). Bien que les amphibiens parviennent à se reproduire, ces assèchements affectent le développement et la survie des larves. De plus, les ornières formées par le passage des véhicules sont par nature soumises au passage d'engins et donc à des écrasements d'individus.

Enfin, malgré que l'eau et le sédiment des bassins d'orage routiers soient pollués, la majorité d'entre eux est colonisée chaque année par les amphibiens, et ceci à travers le globe

(Le Viol *et al.* 2012 ; Hassal & Anderson 2015 ; Sievers *et al.* 2018 ; Jumeau *et al.* 2020). Plusieurs études ont montré une faible reproduction et survie dans ces bassins, les classifiant comme des pièges écologiques pour les amphibiens (Snodgrass *et al.* 2008 ; Sievers *et al.* 2018).

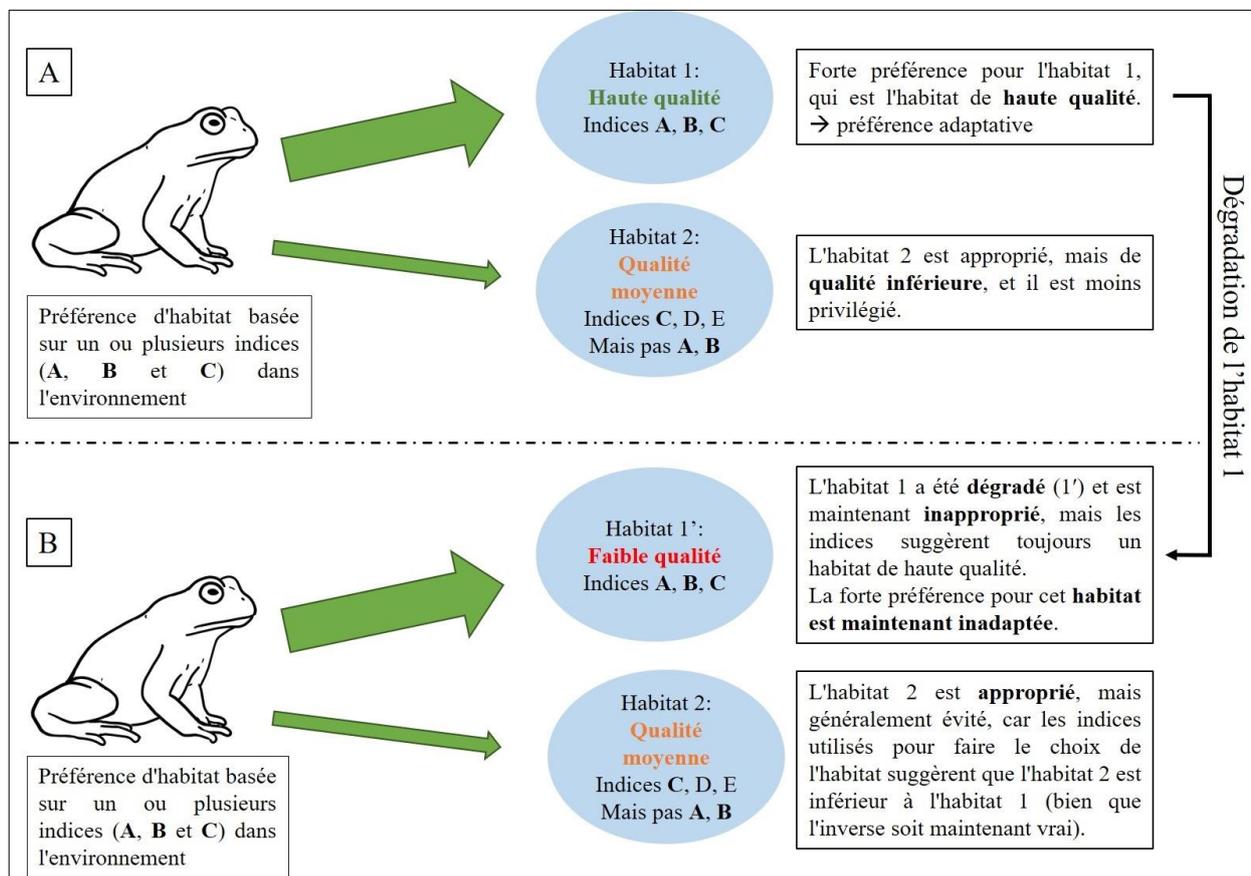


Figure 11 : Schématisation des réponses d'un organisme face à un habitat normal (A) et à un piège écologique (B). Chaque habitat contient un nombre infini d'indices potentiels, dont certains sont utilisés par un organisme pour une décision donnée (ici les indices A, B et C sont utilisés pour la sélection de l'habitat). Un habitat peut être dégradé par des activités humaines et entraîner la création de pièges écologiques. L'habitat 1' présente toujours les indices originaux, induisant l'organisme en erreur et par conséquent à choisir l'habitat comme s'il était toujours de grande qualité.

3) Distinguer les pièges écologiques parmi d'autres sites

a) Attractivité forte

Une forte attractivité est définie comme une préférence pour un habitat, au détriment d'un autre. L'attractivité d'un habitat peut être évaluée au sein d'un paysage hétérogène où plusieurs types d'habitats peuvent être choisis (=tous connectés au point de départ de l'individu) par un individu (=l'individu sélectionne son habitat préférentiel). Il est alors possible d'estimer

le taux d'occupation de chaque type de site afin de déterminer si certains d'entre eux sont favorisés ou non (Schwartz *et al.* 2020).

b) Valeur sélective faible

La valeur sélective (ou « *fitness* ») est par définition la capacité d'un individu à contribuer à la génération suivante, c'est-à-dire sa capacité à transmettre ses gènes (Leimar 1996 ; Brommer *et al.* 2002). Elle est d'une façon simplifiée le produit de la survie et de la fécondité. Néanmoins pour une espèce longévive qui évolue dans un environnement changeant rapidement, cette valeur devient très relative dans le temps. Sa mesure implique de connaître à la fois la survie des jeunes et des adultes, ainsi que pour un individu donné, l'âge de première reproduction et le nombre total de ses descendants qui atteignent à la fois la maturité sexuelle et une reproduction effective.

Cependant, ces variables peuvent être particulièrement difficiles à déterminer, d'autant plus si elles varient dans le temps et l'espace en raison de contraintes environnementales. Chez les amphibiens, plusieurs études se sont intéressées à des paramètres directs de la *fitness* individuelle comme par exemple le nombre d'œufs pondus, le taux d'éclosion, la croissance des larves ou encore leur survie (Petranka *et al.* 1982 ; Galloy & Denoël 2010 ; Leduc *et al.* 2016). Cependant, la majorité de ces études ont été réalisées sur le stade embryonnaire des amphibiens sans vraiment prendre en compte les géniteurs, en conditions contrôlées de laboratoire, et non en conditions naturelles (Rowe & Beebee 2003). En ce qui concerne les études qui se sont penchées sur des paramètres directs de la *fitness* des adultes (*e.g.* taux de survie et de fécondité) la majorité d'entre elles ont été réalisées à l'aide de modèles démographiques utilisant des données de Capture-Marquage-Recapture obtenues sur le terrain (Wagner & Cooper 1963 ; Cayuela *et al.* 2016). L'estimation du taux de fécondité individuelle (*i.e.* nombre d'éclosions viables durant une période donnée) et du nombre d'œufs pondus est un vrai défi chez les amphibiens européens de par leur mode de vie (nocturne et cryptique) ainsi que de par leur relative petite taille, surtout pour les études réalisées en conditions naturelles. C'est pourquoi des index biométriques peuvent être utilisés pour évaluer l'impact de la qualité de l'environnement sur la *fitness* des individus comme : (1) le taux de croissance, une mesure de la vitesse d'augmentation de la taille ou de la masse corporelle au cours du temps ; ou (2) la condition corporelle, dont l'indicateur classique corrélant taille et masse corporelles est un bon

estimateur des réserves énergétiques des individus et par conséquent de leur état de santé (Green 2001 ; Schulte-Hostedde *et al.* 2005). L'asymétrie fluctuante, une autre variable biométrique correspondant à une déviation mineure de la symétrie parfaitement bilatérale des individus, est parfois exploitée (Palmer & Strobeck 1986 ; Leung *et al.* 2000). Elle est utilisée comme biomarqueur de stress développemental, permettant de déterminer la qualité d'un milieu (Clarke 1998 ; Leung & Forbes 1996 ; Lens *et al.* 2002 ; Söderman *et al.* 2007). L'asymétrie fluctuante peut être considérée comme un indicateur de la *fitness* (Leung *et al.* 2000 ; Guo *et al.* 2017), bien que la corrélation entre celles-ci soit encore soumise à débat.

Finalement, aborder la question de piège écologique par la mise en évidence de la forte attractivité d'un milieu et d'une *fitness* faible des individus qui s'y trouvent peut encore être difficile à évaluer.

IV) Problématique de la thèse et acteurs locaux

1) Contexte et objectifs de la thèse

Pendant sa thèse CIFRE (CNRS - Département du Bas-Rhin, aujourd'hui Collectivité européenne d'Alsace = « CeA », 2014-17) en écologie routière, Jonathan Jumeau s'est intéressé à inventorier la petite faune dans différents milieux très artificialisés, associés ou non aux ILT. Parmi ceux-ci, les bassins d'orage routiers départementaux représentaient une grande proportion des zones humides restantes, disponibles pour la faune aquatique. Ces bassins présentaient une grande richesse spécifique ainsi que de fortes abondances en amphibiens. Dans la majorité des bassins d'orage étudiés, les Grenouilles vertes (*Pelophylax spp.*) et le Crapaud vert (*Bufo viridis*) étaient les espèces prédominantes (Jumeau *et al.* 2020). Ces travaux ont également permis de montrer les principaux facteurs influençant ou non la présence de certaines espèces d'amphibiens, démontrant par exemple l'inefficacité des clôtures installées autour des bassins pour en interdire l'accès aux amphibiens (Carsignol & Tekielak 2018 ; Jumeau *et al.* 2020). Cette première approche a amené à la question centrale de ma thèse. En effet compte-tenu de la faible densité des zones humides dans la plaine agricole d'Alsace, s'ils s'avèrent être des pièges écologiques, est-il toujours souhaitable de rendre ces bassins routiers inaccessibles aux amphibiens (Morand & Carsignol 2019), ou *a contrario* considérer l'importance potentielle de ces zones humides artificielles en tant que maillon favorable pour la connectivité des populations d'amphibiens menacées en Alsace ?

La présente thèse s'inscrit donc dans la continuité de celle de Jonathan Jumeau, avec une double finalité : mieux comprendre l'importance écologique des bassins d'orage du département pour certaines espèces d'amphibiens de la plaine d'Alsace, et trouver comment intervenir sur la gestion de ces milieux artificiels pour favoriser leurs populations. Elle a ainsi pour premier objectif de mettre en évidence ou non le rôle de piège écologique des bassins d'orage routiers pour les amphibiens. Dans le cas où ces bassins seraient effectivement des pièges écologiques, le deuxième objectif serait de trouver des solutions efficaces pour cloisonner ces bassins afin de limiter leur colonisation par les amphibiens. Enfin, compte tenu du faible nombre de zones humides dans la plaine d'Alsace, ces bassins d'orage routiers pourraient servir d'habitat de substitution et de sites relais pour certaines espèces d'amphibiens. De fait, il est important de s'intéresser au rôle de ces bassins d'orage dans la connectivité paysagère, mais également de les étudier comme des unités fonctionnelles du paysage en prenant en compte l'utilisation de l'habitat terrestre à proximité.

Cette thèse s'inscrit alors pleinement dans les disciplines de la biologie de la conservation et de l'écologie routière et du paysage, à l'interface entre recherche fondamentale et appliquée, pour finalement mener des actions afin d'obtenir des préconisations pragmatiques et généralisables que les gestionnaires des bassins pourront s'approprier, que ce soit en Alsace sur le terrain d'étude ou dans d'autres régions industrialisées d'Europe et même du monde.

a) Structuration de la thèse

Dans une première partie (Chapitre 1), je me suis intéressé à la qualité des bassins d'orage routiers en termes d'habitat, en testant une différence de *fitness* entre des populations utilisant ces bassins d'orage routiers, et celles utilisant des mares semi-naturelles, *a priori* plus adaptées aux amphibiens et aux espèces étudiées. Dans ce chapitre sont présentées trois études complémentaires réalisées sur deux espèces d'amphibiens (Grenouilles vertes et Crapaud vert), deux études ayant été réalisées sur le terrain et une en conditions contrôlées. La première étude s'est focalisée sur différentes variables biométriques estimatrices de la *fitness* individuelle chez la Grenouille verte (*Pelophylax spp.*). La seconde étude s'est concentrée sur le développement larvaire du Crapaud vert (*Bufo viridis*). La troisième étude, réalisée au laboratoire, a testé l'impact de facteurs caractéristiques des bassins d'orage routiers sur la croissance et la survie larvaire du Crapaud vert.

Dans une seconde partie (Chapitre 2), je me suis intéressé à l'efficacité de mesures de cloisonnement permettant de faire obstacle à différentes espèces d'amphibiens. En effet, si les bassins d'orage s'avéraient être des pièges écologiques, il faudrait mettre en place des mesures de cloisonnement afin de les rendre imperméables aux amphibiens. De plus, ces mesures de cloisonnement pourraient également être utilisées le long des routes afin de stopper et guider les animaux jusqu'aux passages à faune et limiter ainsi la mortalité routière. Dans ce second chapitre, j'expose les résultats de deux études distinctes. La première s'est focalisée sur un type précis de clôture : le grillage métallique à petite maille (6x6 mm) couramment utilisé le long des routes à grande vitesse en Alsace, testé pour différentes espèces d'amphibiens et de micromammifères. La seconde étude s'est intéressée à l'efficacité de clôtures pérennes (béton et tôle métallique) sur différentes espèces d'amphibiens représentatifs des différents modes de locomotion des espèces françaises et européennes. Ces résultats permettront de donner des directives aux aménageurs routiers afin de mettre en place des clôtures réellement efficaces pour stopper la petite faune dont les amphibiens (le long des routes ou autour de bassins d'orage).

Pour finir, dans une troisième partie (Chapitre 3), je me suis intéressé à la problématique de la connectivité et au déplacement des individus de Crapaud vert en phase terrestre. Tout d'abord, j'ai simulé le déplacement des individus en modélisant différents scénarii (avec ou sans bassins d'orage routiers, puis avec la création de nouveaux bassins), en utilisant comme base de référence un jeu d'observations sur le terrain acquis pendant ma thèse. Le but était de montrer le rôle potentiel des bassins d'orage comme sites relais dans la connectivité paysagère, se rajoutant aux sites semi-naturels. Dans la seconde étude, je me suis focalisé sur les déplacements de plusieurs individus de Crapaud vert en phase terrestre par radio télémétrie. Le but était de comprendre comment les crapauds verts utilisent le paysage environnant ces sites particuliers, mais également de mettre en évidence des zones de repos autour des bassins d'orage routiers. Cela afin, par la suite, d'élaborer des mesures concrètes de protection de l'habitat terrestre de cette espèce.

b) Acteurs concernés

Avant d'entrer dans le vif du sujet de la thèse, je souhaite mettre en avant les différents acteurs locaux de la région, travaillant sur la thématique des amphibiens avant le début de ce projet de recherche. En effet, l'association locale BUFO, spécialisée sur les reptiles et amphibiens s'occupe d'études et de suivis dans la région Alsace depuis 1997. Cette association, composée en 2022 de 5 salariées, est très active et est l'association référente PRA (Plan Régional d'Action) de ces taxons en Alsace. C'est donc tout naturellement qu'en début de thèse en 2018, mon équipe est allée à leur rencontre afin de présenter le projet dans le but de mettre en place une collaboration et un partage de connaissances. Malheureusement, cela a été compliqué d'obtenir leur confiance, peut-être que nous étions considérés comme novices sur le sujet ? Ou bien aussi car nos sources de financement étaient parfois les mêmes et donc en concurrence ? En effet, avant notre arrivée BUFO était et est encore responsable de suivi de quelques bassins d'orage routiers. De plus, il est possible qu'ils aient eu certaines appréhensions concernant les résultats et l'utilisation que nous pourrions en faire. En effet, le but de ces associations est de participer à la défense de l'environnement et il est compréhensible qu'elles soient rebutées par le fait de considérer la route et ses environnements comme des habitats potentiels pour la biodiversité. De plus, nos liens étroits avec les aménageurs routiers départementaux et régionaux financeurs en partie du projet (CeA et DREAL-Grand-Est) n'ont pas forcément aidé à cela. Néanmoins et heureusement, après 3 ans d'études, de discussions, nous nous sommes rapprochés et nous pouvons désormais travailler de concert pour éviter les doublons de suivi et également partager les données et nos savoir-faire. Nous avons réussi à gagner leur confiance, vu le travail accompli et la qualité de nos données, mais également par le soutien de la DREAL Grand-Est (Direction Régionale de l'Environnement de l'Aménagement et du Logement) et en particulier de Camille Féminier, référente amphibiens et reptiles. De plus, nous avons également le soutien du CEREMA et plus particulièrement d'Alain Morand, spécialiste des amphibiens travaillant actuellement sur des problèmes liés à la biodiversité et aux infrastructures de transport. C'est donc de concert avec l'ensemble de ces acteurs locaux et régionaux (Grand-Est) que nous pouvons désormais terminer cette thèse qui aura démarré des études qui, je l'espère pourront être maintenues à l'avenir.

B) Méthode générale

I. Zone d'étude : la plaine agricole du Bas-Rhin.

Le département du Bas-Rhin fait partie des 9 départements qui composent la région Grand-Est. Ancien département de la région Alsace, le Bas-Rhin et plus particulièrement la plaine d'Alsace se trouve encerclée par des chaînes montagneuses, avec la Forêt noire à l'Est et le piémont des Vosges à l'Ouest. Il est également bordé à l'Est par le Rhin qui sert de frontière avec l'Allemagne.

Le climat de la plaine d'Alsace est semi-continentale présentant des hivers froids et secs et des étés chauds et orageux. La température moyenne annuelle en plaine est d'environ 11°C avec une variation entre -1°C en hiver et 26°C en été. La plaine d'Alsace étant protégée par les Vosges, elle bénéficie de peu de précipitations et reçoit moins de 700 mm par an. Ces précipitations sont d'ailleurs de plus en plus faibles avec le réchauffement climatique qui induit également des hivers moins froids avec une diminution de la fréquence de gel, et des printemps et étés plus chauds et secs (station météo Strasbourg-Entzheim).

Comme précisé précédemment, la plaine d'Alsace est bordée par le Rhin à l'Est. Avant sa canalisation, l'Alsace comportait un grand nombre de zones humides, permanentes ou temporaires, selon les crues et étiages de ce grand fleuve encore sauvage. C'est au milieu du XIX^e siècle que la canalisation du Rhin a débuté. Celle-ci avait pour but de protéger les populations proches du fleuve avec la création de digues (contre les crues bicentennaires) mais également de créer un lit mineur afin de permettre sa navigation. Cette canalisation a ainsi entraîné la disparition de la moitié des forêts alluviales rhénanes (Alsace Nature 2010).

En plus de cette canalisation, l'agriculture et l'urbanisation intensives de la plaine d'Alsace ont entraîné la disparition des zones humides intérieures restantes, impactant la biodiversité locale. En outre, le département du Bas-Rhin présente un réseau routier particulièrement dense (2 km/km²) avec un total représentant plus de 9 400 kms de route en 2017 (MTES 2022). L'agriculture intensive, l'urbanisation et la construction de routes fait du département du Bas-Rhin l'un des départements les plus fragmentés de notre pays (Chery & Deshayes 2011).

Le département du Bas-Rhin et plus précisément la plaine d'Alsace où se situe la zone d'étude est majoritairement composé de terres agricoles avec peu de zones humides naturelles ou semi-naturelles (Jumeau 2017). En absence de zones humides naturelles ou semi-naturelles à proximité des bassins d'orage, il a été impossible d'estimer une différence d'attractivité entre sites. De ce fait, lorsque le terme de piège écologique est utilisé dans les différentes études de cette thèse, cela se réfère majoritairement à des habitats de faible qualité sans prendre en compte son attractivité.

II. Modèles biologiques

Les Amphibiens ont été choisis comme modèle d'étude de ma thèse pour différentes raisons. Tout d'abord car mon sujet de thèse découle de la thèse de Jonathan Jumeau (soutenue en 2017) et de sa volonté ainsi que de celle de son directeur et maintenant collaborateur, Yves Handrich, de poursuivre sur ce nouveau modèle d'étude pour le DEPE à Strasbourg. Mais également car les amphibiens sont de bons modèles pour étudier l'impact des différentes activités anthropiques. En effet, ils sont largement distribués dans la plupart des écosystèmes, mais ils sont également faciles à échantillonner (*e.g.* capture, prélèvement). De plus, la majorité des espèces d'amphibiens sont fidèles (philopatriques) à leur site de reproduction (Welsh & Ollivier 1998). Il est également facile d'élever des amphibiens au laboratoire ou au moins les maintenir temporairement en captivité (*e.g.* têtards, juvéniles et adultes). Enfin, ils présentent un intérêt majeur en biologie de la conservation car la majorité des espèces est protégée en France et en Europe (voir **Tableau 1** §I.3.).

Comme précisé précédemment et d'après les résultats de Jonathan Jumeau, les deux espèces d'amphibiens choisies comme modèles dans cette thèse, sont les Grenouilles vertes (*Pelophylax spp.*) et le Crapaud vert (*Bufo viridis*). Un focus bien plus marqué a été réalisé sur le Crapaud vert, étant donné son statut de protection régional (« en Danger », IUCN 2014), mais également car les plus grandes populations de l'espèce dans le Bas-Rhin sont rencontrées dans les bassins d'orage routiers.

1) Les Grenouilles vertes (*Pelophylax spp.*)

Le complexe des grenouilles vertes (*Pelophylax spp.* ; **Figure 12**) est un complexe de plusieurs espèces cryptiques. En France, le complexe *Pelophylax* comprend 5 espèces dont la différenciation morphologique est difficilement réalisable, voire impossible sur le terrain (Patrelle *et al.* 2011). En revanche, il est possible de différencier ces espèces en couplant les critères morphologiques à des enregistrement acoustiques (Wycherley *et al.* 2002). Néanmoins ces méthodes ne sont pas fiables car ces espèces sont capable de s'hybrider (Pagano *et al.* 2003 ; Plötner *et al.* 2008). De ce fait, la méthode d'identification la plus fiable reste l'approche génétique (Percsy & Percsy 2013). En Alsace, trois espèces de grenouilles vertes sont présentes naturellement : la grenouille verte de Lessona (*Pelophylax lessonae*) ; la grenouille rieuse (*Pelophylax ridibundus*) ; et la grenouille verte commune (*Pelophylax* kl. *esculentus*), cette dernière étant issue de l'hybridation entre les 2 autres espèces. D'après la liste rouge des amphibiens de France (UICN 2015), *P. lessonae* et *P. kl. esculentus* sont considérées « quasi menacées » alors que *P. ridibundus* est considérée en « préoccupation mineure ».

N'ayant pas réalisé d'analyses génétiques sur ce complexe dans le cadre de mes travaux, *Pelophylax spp.* est alors désigné par « grenouilles vertes » dans ce document de thèse.



Figure 12 : Grenouille verte (*Pelophylax spp.*) en phase terrestre, photo Antoine Coquis©

2) Le Crapaud vert (*Bufo viridis*)

Le Crapaud vert (*Bufo viridis* ; **Figure 13**) est un amphibien de taille moyenne (~10 cm) dont la répartition mondiale s'étend de la France à l'Ouest à la Russie à l'Est en passant par des îles du Danemark à l'Estonie au Nord et à la Grèce au Sud (**Figure 14**) (AmphibiaWeb 2022). De par cette vaste répartition mondiale, l'UICN le catégorise comme espèce à « préoccupation mineure » au niveau mondiale et européen. En revanche au niveau national (France), il est catégorisé comme espèce « quasi menacée » et même, au niveau régional (Grand-Est), « en danger d'extinction » (UICN 2015). En effet, en France continentale, le Crapaud vert n'est présent que dans la région Grand-Est (Alsace et Lorraine), cette région représentant sa limite Ouest de répartition mondiale. Par conséquent, comme la plupart des espèces en marge de répartition, ce sont dans ces zones que les populations sont les plus en déclin.



Figure 13 : Crapaud vert (*Bufo viridis*) en phase terrestre, photo Antonin Conan©

La répartition française du Crapaud vert, mis à part la Corse, est cantonnée à 3 départements : la Moselle, le Haut-Rhin, et le Bas-Rhin où les plus importantes populations sont retrouvées à proximité de Strasbourg (Berna *et al.* 2021).

Le Crapaud vert est une espèce pionnière qui affectionne les jeunes milieux aquatiques dépourvus de végétation, avec une faible profondeur d'eau (Sinsch *et al.* 1999). Avant la canalisation du Rhin au XIX^e siècle, le Crapaud vert se reproduisait dans des sites créés à la suite d'épisodes de crue du Rhin (Michel 2013). Ces crues permettaient la création de zones humides pionnières favorables à la reproduction de l'espèce. Aujourd'hui, la canalisation du Rhin et des autres cours d'eau ne permet plus la création de ces milieux temporaires. Le Crapaud vert est donc contraint de coloniser des sites de substitution, comme les mares de compensations

créées spécifiquement pour l'espèce, des mares de carrières, ou encore des bassins de rétention, routiers ou non (Michel 2013 ; Berna *et al.* 2021).

Actif au printemps, le Crapaud vert présente un pic de reproduction en avril après les premières pluies lorsque la température est clémente (Baumgart 2003). Les individus adultes peuvent être retrouvés en phase aquatique de fin mars à début juillet. Durant cette période il est possible d'observer des amplexus et des pontes au fond de l'eau.



Figure 14 : Répartition mondiale du Crapaud vert (*Bufo viridis*), d'après AmphibiaWeb.org

Chapitre 1 : Les bassins d'orage routiers : des habitats de reproduction pour les amphibiens ?

Étude 1 : Les bassins d'orage routiers peuvent-ils être exploités avec succès par la Grenouille verte européenne (*Pelophylax spp.*) ?

Cette étude a fait l'objet d'une publication publiée en mai 2021 dans la revue
« Urban Ecosystems ».

<https://doi.org/10.1007/s11252-021-01129-z>

Résumé :

Dans cette première étude réalisée uniquement chez la Grenouille verte, nous avons capturé 709 individus dans 9 mares semi-naturelles (MSN) et 25 bassins d'orage routiers (BO) du Bas-Rhin. À l'aide de mesures biométriques (taille, masse, longueur des avant-bras et tibias), nous avons estimé la condition corporelle et l'asymétrie fluctuante de ces individus adultes, subadultes et juvéniles. Les résultats ont montré l'absence de différences significatives entre les MSN et les BO pour la plupart des variables testées, à part une condition corporelle plus faible dans les BO pour les juvéniles, et une taille et une masse plus grande des adultes dans les BO. De plus, nous avons mis en évidence la présence de pièges physiques dans les BO, représentés par des « déshuileurs », dans lequel les individus adultes pouvaient rester bloqués après de fortes variations du niveau de l'eau du BO. De plus, la condition corporelle des individus adultes était plus faible lorsque les BO comportaient un déshuileur.

Ces résultats ne nous permettent pas de dire que les BO sont des habitats adaptés au développement des jeunes de grenouille verte mais ils pourraient l'être pour les adultes dans un paysage très modifié comme le Bas-Rhin avec peu de zones humides. Notons également que des améliorations techniques des « déshuileurs » devraient être envisagées, afin de limiter la mortalité des individus piégés, qui pourraient vraisemblablement impacter les populations d'amphibiens colonisant ces bassins.



Can road stormwater ponds be successfully exploited by the European green frog (*Pelophylax sp.*)?

Antonin Conan^{1,2} · Jonathan Jumeau² · Nathan Dehaut^{1,2} · Manfred Enstipp¹ · Jean-Yves Georges¹ · Yves Handrich¹

Accepted: 10 May 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021, corrected publication 2021

Abstract

Stormwater ponds (“SWPs”) are artificial roadside structures, conceived to retain and clean polluted runoff water, before its release to the environment. SWPs were not designed as suitable habitats for wildlife. However, SWPs in Europe are frequently used as breeding sites by amphibians, especially by the European green frog (*Pelophylax sp.*). Yet, the potential long-term effects of pollutants within SWPs on the populations of this species are unknown. In this study, we investigated the suitability of SWPs as a habitat for European green frogs living in Alsace, NE France, a region with a highly modified landscape that mainly consists of croplands with few natural wetlands remaining. We compared various biological indicators of individual health in 709 green frogs belonging to different life history stages, living in 9 semi-natural ponds (SNPs) and in 25 SWPs. There were no differences between these two pond types for most of the indicators investigated. However, juveniles had a lower body condition (−124%) in SWPs, while adults were 8.3% larger and 41.4% heavier in SWPs. Based on these results, we suggest that SWPs are not a suitable habitat for the development of European green frogs (i.e. juveniles), but may serve as a substitute habitat for adults in a highly modified landscape with few natural wetlands remaining. SWPs may especially act as relay sites, allowing frogs to colonize relict wetlands.

Keywords Amphibians · Fitness · Ecological source · Ecological trap · Road ecology

Introduction

During the twentieth century, wetland areas have decreased globally by at least 64%, making them the most threatened habitats (Davidson 2014; Hassall and Anderson 2015). Wetlands are destructed directly through urbanization and agricultural practices (Fischer and Lindenmayer 2007; Van der Ree et al. 2015; Metcalfe et al. 2018) but also indirectly through chemical pollution of water and soil (e.g. agriculture & road traffic; Mander and Mitsch 2009; Van der Ree et al. 2015; Maxwell et al. 2016). For instance, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from domestic heating emissions and heavy metals from road traffic contaminate wetlands

(Finlayson-Pitts and Pitts 1997; Alam et al. 2018). Nowadays, urban planning uses infrastructures such as stormwater ponds (SWPs, also referred to as retention ponds) to reduce the pollution impacts from road water runoff to the environment (EPA 2009). In fact, SWPs are designed to collect, regulate, store and clean up runoff water, before its release to the environment (EPA 2009). Although the water in SWPs is polluted, especially by PAHs, heavy metals and salt (Gallagher et al. 2014; Snodgrass et al. 2017), some studies have shown that SWPs are frequently colonized by fauna and that amphibians in particular inhabit them (Scher et al. 2004; Brand and Snodgrass 2010; Le Viol et al. 2012; Hassall and Anderson 2015; Jumeau et al. 2020). Apart from studies indicating a low tadpole survival in SWPs (Dorchin and Shanas 2010; Sievers et al. 2018), overall, little is known about the suitability of these sites for amphibian populations.

All amphibians share a common bimodal life cycle, consisting of seasonally alternating terrestrial and aquatic phases. This complex life cycle exposes amphibians to different environmental stressors throughout the year. After the winter, they move from their terrestrial wintering area to their aquatic breeding site, causing mass migrations that often lead to massive roadkill (Cushman 2006; Joly 2019). However,

Antonin Conan and Jonathan Jumeau are co-first authors.

✉ Antonin Conan
antonin.conan@iphc.cnrs.fr

¹ Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

² Conseil Départemental du Bas-Rhin, Place du Quartier Blanc, Cedex 9, 67964 Strasbourg, France

roadkill is certainly not the only threat these amphibians face. Especially in developed and industrialized regions, amphibians encounter numerous threats. One of the biggest contributors to amphibian declines is human land use that leads to habitat destruction and the isolation of populations (Gibbons et al. 2000; Stuart et al. 2004; Catenazzi 2015). Amphibians are also impacted by the introduction of invasive species that compete with local species (Gibbons et al. 2000; Falaschi et al. 2020) and that might lead to disease proliferation (Gibbons et al. 2000; Stuart et al. 2004; Duffus and Cunningham 2010; Kik et al. 2011). Emerging viral and fungal pathogens affect amphibians worldwide (Price et al. 2014; Catenazzi 2015). Moreover, amphibians, like most animal and plant species, are strongly impacted by global warming (Gibbons et al. 2000; Falaschi et al. 2020) and pollution (Salice 2012; Dirzo et al. 2014; Catenazzi 2015). Given their permeable skin, amphibians are especially vulnerable to pollutants present in the water (Wilbur 1980; Miaud et al. 1999; Quaranta et al. 2009). Elevated concentrations of PAHs and heavy metals have been reported to directly and indirectly impact amphibians across various temporal scales. For instance, aforementioned pollutants have been shown to cause disorders during embryonic development (Bryer et al. 2006; Brand et al. 2010), body malformations that result in a greater fluctuating asymmetry (Guo et al. 2017) and, ultimately, reduce survival (Dorchin and Shanas 2010; Gallagher et al. 2014). Thus, the SWPs, containing polluted water, may negatively affect amphibian reproduction, which is of great concern for one of the most threatened vertebrate taxa in the world (Stuart et al. 2004).

Amphibian reproduction and population trends can be affected by factors other than pollution. For example, aquatic vegetation (e.g. macrophytes and algae) can have a positive effect by providing ideal breeding sites and shelter for amphibians, and by supplying additional food for their larvae. Predation by fish and interspecific competition may have negative effects on the entire amphibian community (Hamer and Parris 2011; Martins et al. 2013; Oertli and Parris 2019). Additionally, different abiotic characteristics of the ponds that amphibians use, regardless if they are semi-natural or artificial, may affect their suitability for amphibians (Sievers et al. 2019). For example, the presence of gently sloping areas (<30°) seems to be most favourable for amphibians (Lesbarrères and Lodé 2002). In artificial ponds (e.g. SWPs), the presence of specific structures, such as oil removers, found on the SWP banks, where they skim the surface water and remove oil and other organic matter, have recently been implicated to create death traps for amphibians (Jumeau, personal communication). Finally, beside the pond itself, the surrounding landscape is of great importance for amphibians, not only during their movement to/from the breeding pond, but also after reproduction, since most amphibians overwinter on land. For instance, amphibian movements can be disrupted in highly modified landscapes that are mainly composed of croplands and roads. Moreover, species requirements differ, so that

the quality rating of the landscape surrounding the breeding sites depends on the ecological niche and habitat use of the species in question (Indermaur et al. 2009). A number of important functions have to be provided by the landscape surrounding the breeding site. Firstly, the provision of refuge areas to avoid predators but also for thermoregulation (microclimate; Schwarzkopf and Alford 1996; Seebacher and Alford 2002). A sufficient prey availability is essential for survival and, especially, successful breeding (Waelti and Reyer 2007), particularly if the access to alternative ponds, located in more favourable habitats, is reduced because of environmental degradation and fragmentation (Cushman 2006). In such altered landscapes, natural and semi-natural ponds have almost disappeared, increasing isolation of the few breeding sites and, thus, decreasing amphibian population viability (Joly 2019; Cayuela et al. 2020).

Research objectives

The current investigation is part of a long-term study on the ecological role and importance of stormwater ponds for amphibian conservation. Here, we investigated the suitability of SWPs as a habitat for amphibians. Whereas previous studies mainly focused on population and community level characteristics (e.g. species richness; Le Viol et al. 2012; Jumeau et al. 2020), we used a qualitative approach by assessing individual health criteria (Pulliam 1988; Runge et al. 2006; Furrer and Pasinelli 2016). In our study, we compared fitness indices of European green frogs (*Pelophylax sp.*) living in SWPs with fitness indices of frogs living in semi-natural ponds (SNPs), the latter being the control group. Fitness was assessed using two commonly used indicators of fitness: (1) the body condition index (BCI), which refers to the size-corrected body mass of an animal and has been used as a proxy of individual energy reserves and fitness in many species (e.g. amphibians, reptiles, birds and mammals; Green 2001; Schulte-Hostedde et al. 2005) and (2) the fluctuating asymmetry index (FA), which reflects minor deviations from a perfect bilateral symmetry of animals (Palmer and Strobeck 1986; Leung et al. 2000). FA is used as an indicator of developmental stability (Guo et al. 2017; see also Breno et al. 2013 for mammals), past exposure to stressors, and fitness in amphibians (Costa and Nomura 2016; Guo et al. 2017; Zhelev et al. 2019). Taking into account previous studies concerning SWPs (Snodgrass et al. 2008; Dorchin and Shanas 2010; Sievers 2017), we predicted that individuals found in SWPs should have a lower health index (i.e. body condition) than those found in SNPs. We then investigated the environmental parameters associated with individual SWPs (e.g. biotic/pollutant/conception/landscape; Table 1) and linked them with the indicators of individual frog fitness. We predicted that environmental parameters of individual SWPs would affect the fitness of green frogs.

Table 1 Environmental parameters of SWPs used to test for potential effects on fitness indicators of male European green frogs (*Pelophylax sp.*)

| Conception of SWPs | Water pollutants | Immediate landscape (500 m radius) | Distant landscape (5000 m radius) | Biotic elements |
|---------------------------|------------------|------------------------------------|---|-------------------------------|
| Age (year) | Nitrogen (mg/l) | Presence of crop field | Surface area of crop fields (m ²) | Green frog abundance |
| Presence of oil remover | Chlorine (mg/l) | Presence of forest | Surface area of forests (m ²) | Presence of algae |
| Nearest road distance (m) | Copper (mg/l) | Presence of hedges | Surface area of grassland (m ²) | Presence of aerial vegetation |
| Presence of slope < 30° | | Presence of a road | Surface area of highway network (m ²) | Amphibian species richness |
| Volume (m ³) | | Presence of wetland | Surface of wetland (m ²) | |
| | | | Surface area of notable wetland (m ²) | |

Materials and methods

Study area and sites

The study was carried out during the summer of 2019 in the agricultural plain of Bas-Rhin, Alsace, NE of France (as described in Jumeau, 2020). This area consists of an extensive agricultural landscape, where 87 stormwater ponds (SWPs) and 41 semi-natural ponds (SNPs) have been identified and geolocated using data from the French National Geographic Institute (<https://www.geoportail.gouv.fr>). All SWPs were artificial ponds, surrounded by fences to exclude large fauna and in 80% of the cases also small fauna (e.g. rodents), while all SNPs had no fences. However, most of the small fauna fences were in poor condition, enabling small fauna to enter SWPs. Only ponds with safe access, relatively shallow depth and a sparse surrounding vegetation (enabling field prospection by foot) were considered in the present study.

Hence, 25 SWPs and 9 SNPs were included in the current study (Fig. 1). Among the 25 SWPs, 5 were composed of two basins (one for water-infiltration and one for water-retention). In the case of dual ponds, we only captured individuals from the retention basin, which contains water throughout the year. Furthermore, 9 out of 25 SWPs contained a specific structure to skim oil from the road water run off (oil remover). It consists of a concrete drainage, positioned at a ~45° angle, covered with a metal grid that skims the water surface, once it has reached the lower rim of the structure. However, amphibians may be carried inside this structure (depending on the nature of the grid) with the water flow and become trapped. Potential effects of these structures on frog biometrics/body condition were investigated.

Study animals

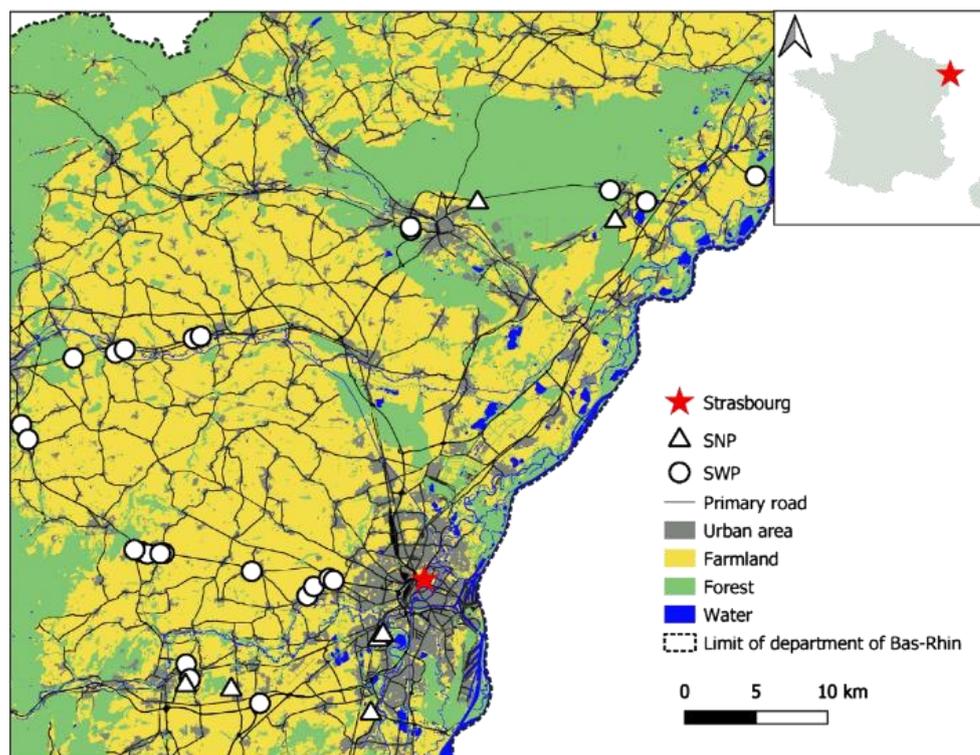
We used the European green frog as our model species, which is the most abundant species encountered in the SWPs of the study area (Jumeau et al. 2020). In Alsace, all species of the *Pelophylax* complex are locally classified as ‘Least Concern’ on the Alsacian Red List (*Pelophylax kl. esculentus*,

Pelophylax ridibundus), with the exception of *Pelophylax lessonae*, classified as ‘Near Threatened’ (BUFO 2014).

From June to August 2019, green frogs were collected by hand during nocturnal patrols of the above-mentioned 25 SWPs and 9 SNPs. All visits to SWPs and SNPs were conducted at random and mean visiting date (11/07/2019) did not differ between pond type. Individual frogs were located by listening for singing males and approached using headlights, to allow hand capture with telescopic nylon nets. Captures were simultaneously conducted by two to three persons, each person having a bucket to store the individuals until the time of body measurements. To minimize the impact of our study on amphibians, a maximum of 30 individuals were captured per site and each site was sampled only once. This protocol limited the disturbance but also avoided the potential recapture of individuals.

All individuals captured in a given water pond were placed in a plastic bag and weighed. The sex of adult frogs was determined by the presence of nuptial pads and vocal sacs in adult males (Duellman and Trueb 1994). For the immatures (i.e. <25 g), we distinguished two groups according to size: sub-adults (body length ≥ 34 mm) and juveniles (body length < 34 mm, see Results). We did not determine the exact species, to avoid identification mistakes between species of the *Pelophylax* complex, which are hard to identify in the field (Patrelle et al. 2011). Body mass (BM) was measured with a spring balance (± 0.3 g, Pesola®, Schindellegi, Switzerland) for individuals ≥ 25 g (thereafter referred to as adults i.e. sexually mature; Kyriakopoulou-Sklavounou and Loubourdis 1990) and with a precision scale (± 0.01 g, Aroma-Zone®, France) for juveniles and sub-adults (< 25 g; i.e. sexually immature). Body length measurements were conducted using an electronic calliper (0–150 ± 0.03 mm, Tesa technology®, Renens, Switzerland). We measured body length from the snout to the tip of the ischium (thereafter referred to as SVL for Snout-Vent Length) and the length of the left and right forearms and tibias. After the measurements, individuals were kept shortly in a second bucket, before being released at the exact location of their capture.

Fig. 1 Study area and pond locations



To prevent the spreading of pathogens such as *Batrachochytrium sp.*, we used single-use gloves for all handlings, that were replaced between sites. Boots, nets and buckets were disinfected with a Virkon® solution between sites (Miaud 2014). All handling procedures were authorized by the “Arrêté Préfectoral n° 2019-DREAL-EBP-0030”.

Fitness indicators

We used two indices of individual fitness. (1) A body condition index (BCI) was calculated following Green (2001), using the individual residuals of the linear regressions between $\ln(\text{BM})$ and $\ln(\text{SVL})$ for each group (adult females, adult males, sub-adults and juveniles). Fluctuating asymmetry (FA) was calculated for the length of forearms and tibias, according to Palmer and Strobeck (1986): $= \frac{\text{abs}(C_l - C_r)}{\text{mean}(C_l)}, C_r$, where “abs” is the absolute difference between C_l and C_r , and C_l and C_r are the length of the left and right forearms or tibias, respectively. In addition to these two indices, we also calculated the sex-ratio (SR) for each site as the number of males divided by the total number of males and females collected.

Environmental parameters of stormwater ponds

We used 23 environmental parameters, based on the landscape surrounding the pond (i.e. pond conception, biotic conditions and pollution levels; Table 1), to investigate

potential relationships with fitness indicators. Unfortunately, because of the lack of data concerning pollution levels, such analysis was not possible for the SNPs. For the SWPs pollutants, we only retained concentrations of dissolved nitrogen, chlorine and copper in our characterization, since they were the only pollution parameters that had been consistently recorded in most of the SWPs (14 ponds for nitrogen and copper, 15 ponds for chlorine; Jumeau et al. 2020). Consequently, environmental parameters were investigated in 17 out of 25 SWPs. The surrounding landscape of each of the 17 SWPs was characterised in terms of landscape elements based on the “Coopération pour l’Information Géographique en Alsace” database (with a precision of 1:10000, CIGAL 2018). The presence and surface area of crop fields, forests, grasslands, and wetlands, were calculated within a 500 m radius (hereafter referred to as ‘nearby environment’) and within a 5000 m radius (referred to as ‘distant environment’) around each SWP (Alex Smith and Green 2005), using geographical information system software (QGIS v3.10, Development Team, 2020). For the wetland elements, we distinguished important wetlands from ordinary wetlands based on the presence of an exceptional biodiversity in important wetlands (Agence de l’Eau Rhin-Meuse, DREAL 2016). Due to strong statistical dependencies between parameters of the nearby environment, only the presence/absence of each element was used for these parameters. Some landscape variables such as moorlands and orchards were not included in our analysis

because they were not present within the 5000 m radius for many SWPs.

Statistical analyses

Sexual dimorphism in body length (SVL) and body mass (BM) in each of our 34 study sites (SWPs and SNPs) was tested using a Wilcoxon test. An analysis of variance (ANOVA), based on Linear Mixed Models (LMM) with site as random factor, was used for comparing SVL, BM, BCI and the two FA indices (forearms and tibias) between SWPs and SNPs for each individual group (males/females/sub-adults/juveniles). To obtain a Gaussian distribution, a BoxCox transformation was applied to FA indices. The relationships between SWP environmental parameters and SVL, BM, BCI and FA indices were tested in males only, using Linear Model (LM) based ANOVAs ($n = 17$ SWPs), since males were the only group that was present in sufficiently large numbers ($n \geq 6$) at all ponds. Each environmental parameter for the SWPs was standardized before analysis. Collinear environmental parameters were identified and removed using Spearman tests. All statistical analyses were conducted using R (v3.5.3, RStudio v1.2.1335, R Core Team, 2020) and all figures were plotted with GraphPad Prism 8.2.1 (San Diego, California, USA). Each model was selected by a BIC bidirectional elimination procedure. Results are shown as mean \pm SEM with a statistical significance threshold of 5% (* for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$). The GLM estimates are indicated as “ β ”.

Results

A total of 709 individuals was captured in 25 SWPs ($N = 509$ individuals) and 9 SNPs ($N = 200$ individuals). A rank-frequency histogram of individual body length (see suppl. figure 1) and body mass showed a clear separation within our immatures (i.e. < 25 g), allowing us to distinguish two groups of immatures: sub-adults (body length ≥ 34 mm) and juveniles (body length < 34 mm). The sampled population was composed of 393 males, 127 females, 112 sub-adults, and 77 juveniles. On average, 20.3 ± 1.5 individuals were captured per site (range for males: 0 to 30; females: 0 to 14; sub-adults: 0 to 13; juveniles: 0 to 21). Since vocalizing males were easier to locate, the sex ratio of captured individuals was biased towards males. However, this sampling bias was identical for both pond types.

Body length, body condition and fluctuating asymmetry

There was a significant sexual dimorphism for body length and body mass of adult frogs in both SWPs and SNPs.

Females were, on average, about 10% longer and 40% heavier than males (body length: SWPs: $W = 4750$, $p < 0.01$ and SNPs: $W = 5778$, $p < 0.01$; body mass: SWPs: $W = 4463.5$, $p < 0.01$ and SNPs: $W = 5778$, $p < 0.01$; Table 2, Fig. 2A, B).

Adult individuals from SWPs were significantly larger (+6.6% for the males $\chi^2 = 5.76$, $p < 0.05$, +12% for females $\chi^2 = 3.98$, $p > 0.05$) and heavier (+27.5% for the males $\chi^2 = 6.04$, $p < 0.05$, +40.8% for females $\chi^2 = 5.18$, $p < 0.05$) than individuals from SNPs (Table 3, Fig. 2, B). Conversely, juveniles were smaller in the SWPs when compared with the SNPs (-10.4% , $\chi^2 = 5.12$, $p < 0.05$; Table 3), while body mass did not differ between pond types (Table 3). Lastly, the size and body mass of the sub-adult frogs did not differ between pond types ($p > 0.05$ Table 3).

Because of this sexual dimorphism in body length and body mass, the body condition index (BCI) was calculated for each sex and group, separately. Our analysis showed a significantly lower BCI in juveniles from SWPs, when compared with individuals from SNPs (-124% $\chi^2 = 5.97$, $p = 0.01$; Table 3). By contrast, there were no significant differences in BCI for the other groups (males, females, sub-adults) between SWPs and SNPs ($p > 0.05$). In addition, there were no significant differences in fluctuating asymmetry between individuals from SNPs and SWPs for any of the investigated groups ($p > 0.05$; Table 2).

Relationship between environmental parameters of SWPs and male green frog biometrics

Despite the high variability for the concentration of the different pollutants analysed at the SWPs (coefficient of variability $> 40\%$), we found no significant relationship between any of the pollutants at SWPs included in the analysis (dissolved nitrogen, chlorine, copper) and the biometric variables recorded in adult male green frogs ($p > 0.05$). Model analysis showed that adult male biometrics were correlated with landscape parameters, whereby larger frogs were found in SWPs surrounded by a greater proportion of cropland and forested areas within a 5000 m radius ($\beta = 4.92$, $p < 0.05$; $\beta = 4.12$, $p < 0.05$). By contrast, smaller frogs were found in SWPs surrounded by a greater proportion of important wetlands on the same spatial scale ($\beta = -2.93$, $p < 0.05$). Adult male body condition index (BCI) at the SWP was negatively correlated with the surface area of grassland fields ($\beta = 1.2^{E-2}$, $p < 0.01$) within a 5000 m radius. The FA based on forearm-length was negatively correlated with the surface area of grassland and important wetlands within a 5000 m radius (Table 4). By contrast, the FA based on Tibia-length was not related to any of the characteristics of the SWPs tested in this study, as the BIC selection did not retain any relevant variables (i.e. FA tibias-1; Table 4). Finally, male BCI was lower (-286%) in SWPs equipped with an oil remover, when compared with

Table 2 Biometric measurements (means±SEM) for four different groups of European green frogs, captured in SWPs and SNPs

| | | Males | Females | Sub-adults | Juveniles |
|----------------|------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| SWPs (n=25) | SVL (mm) | 70.0 ± 0.6 | 77.6 ± 1.6 | 50.2 ± 0.7 | 25.1 ± 0.4 |
| | BM (g) | 44.7 ± 1.2 | 64.1 ± 4.2 | 15.1 ± 0.7 | 1.9 ± 0.1 |
| | BCI ^(E-3) | 1.3 ± 2.5 | 8.7 ± 5.1 | 4.2 ± 4.5 | -9.2 ± 5.0 |
| | AF Tibias ^(E-3) | 13 ± 0.7 | 12 ± 1.3 | 13 ± 1.2 | 21 ± 2.2 |
| | AF Forearms ^(E-3) | 31 ± 1.6 | 32 ± 2.9 | 34 ± 3.6 | 53 ± 4.9 |
| SNPs (n=9) | SVL (mm) | 65.2 ± 0.6 | 68.8 ± 2.4 | 50.6 ± 0.8 | 27.9 ± 1.1 |
| | BM (g) | 34.1 ± 1.0 | 47.3 ± 6.3 | 15.9 ± 0.8 | 2.4 ± 0.3 |
| | BCI ^(E-3) | -0.8 ± 2.8 | -7.3 ± 4.9 | -7.5 ± 5.9 | 38 ± 10 |
| | AF Tibias ^(E-3) | 14 ± 1.1 | 13 ± 1.8 | 12 ± 1.5 | 16 ± 3.5 |
| | AF Forearms ^(E-3) | 33 ± 2.6 | 34 ± 4.9 | 34 ± 3.9 | 33 ± 4.7 |

SWPs without such a device ($F = 12.8$, $d = 1$, $p < 0.01$; Table 4).

Discussion

Stormwater ponds are designed to remove pollutants from road runoff waters and the latest designs often include additional elements to achieve this, such as oil removers. As such, SWPs are likely more polluted than the surrounding areas. Accordingly, our initial hypothesis was that SWPs are not a suitable habitat for wildlife, including the European green frog. Our results show that adult green frogs captured at SWPs were larger and heavier, but not in a better body condition, than those captured at SNPs. Juveniles, captured at SWPs, were smaller and their body condition was lower than in juveniles captured at SNPs. Hence, our results only partially support our original hypothesis.

We caught significantly more males than females at both pond types. Such an unbalanced sex ratio during capture has

been reported previously for green frogs (Loman and Madsen 2010; Green 2013) and also for other amphibian species (Wells 1977; Loman and Madsen 2010; Grayson et al. 2012; Green 2013). A possible explanation might be that male amphibians actively search for females, while females typically hide after spawning (Wells 1977). Accordingly, males are more conspicuous (also given their vocal behaviour) and more susceptible to capture, when compared with females. Apparently, the situation at SWPs does not differ in that respect from natural ponds.

Body size

Body size is a strong driver of reproduction, leading to sexual dimorphism in many taxa (Masello and Quillfeldt 2003; Baird et al. 2007; Whitman 2008). This is the case in amphibians, where reproduction is explosive, with females laying hundreds, if not thousands of eggs in one time. Consequently, most amphibians show sexual dimorphism, with females being larger than males, as is the case for green frogs (Shine

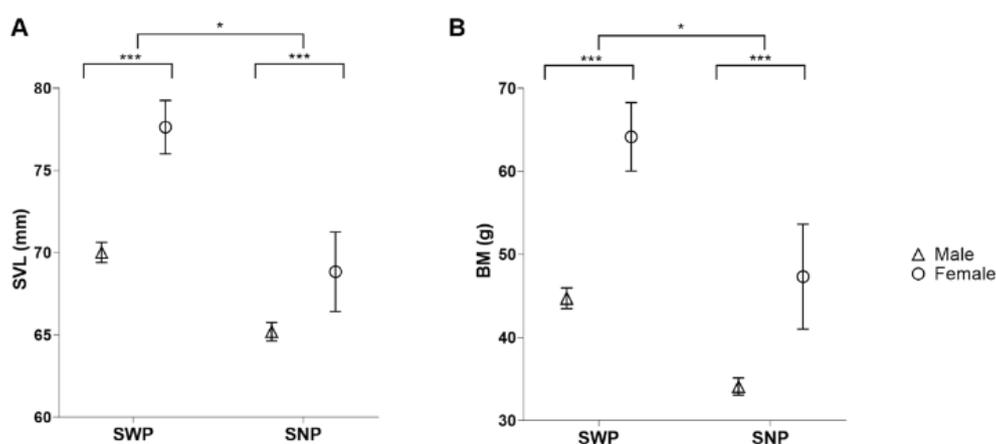


Fig. 2 Comparison (means±SEM) of body length (Snout Vent Length, SVL; **A**) and body mass (BM; **B**) between adult male (triangles) and adult female (circles) European green frogs (*Pelophylax* sp.) captured in SWPs ($N_{\text{♂}} = 250$; $N_{\text{♀}} = 58$) and SNPs ($N_{\text{♂}} = 107$; $N_{\text{♀}} = 27$). Females were larger

and heavier than males in both pond types (ANOVA, *** $P < 0.001$). Individuals caught at SWPs were larger and heavier than individuals caught in SNPs (Wilcoxon test, * $P < 0.05$)

Table 3 Statistical comparisons for biometric measurements of European green frogs (*Pelophylax sp.*) captured in SWPs versus SNPs

| Measure | Males (n=357) | | | Females (n=85) | | | Sub-adults (n=112) | | | Juveniles (n=77) | | |
|-------------|---------------|----|--------------|----------------|----|--------------|--------------------|----|------|------------------|----|-------------|
| | χ^2 | df | p | χ^2 | df | p | χ^2 | df | p | χ^2 | df | p |
| SVL | 5.76 | 1 | 0.016 | 3.98 | 1 | 0.046 | 0.15 | 1 | 0.69 | 5.12 | 1 | 0.02 |
| BM | 6.04 | 1 | 0.014 | 5.18 | 1 | 0.022 | 0.43 | 1 | 0.51 | 3.04 | 1 | 0.08 |
| BCI | 0.05 | 1 | 0.81 | 1.75 | 1 | 0.18 | 0.94 | 1 | 0.33 | 5.97 | 1 | 0.01 |
| FA Tibias | 0.25 | 1 | 0.61 | 0.11 | 1 | 0.73 | 0.69 | 1 | 0.41 | 0.74 | 1 | 0.39 |
| FA forearms | 0.37 | 1 | 0.54 | 0.18 | 1 | 0.66 | 4E-4 | 1 | 0.98 | 1.86 | 1 | 0.17 |

Results of ANOVA on LMM with site as a random factor. Significant differences ($p < 0.05$) between SWPs and SNPs are indicated in bold

1979). Our results on adult body size show that female European green frogs were on average 8.3% larger and 41.4% heavier than males, which is consistent with previously reported values (Shine 1979). Females were larger and heavier in SWPs than in SNPs, leading to an even more pronounced female-biased dimorphism in SWPs. While this might seem counterintuitive, a larger size at the SWPs might be related to a greater food availability for individuals. Sievers et al. (2018) found that the tadpoles of frogs inhabiting more polluted stormwater wetlands survived less well but also reached metamorphosis earlier and at a larger size than at less polluted sites. They attributed the larger tadpole size to a greater food availability for surviving individuals, due to the combined effects of a higher mortality (density-dependent effects; Berven and Gill 1983; Semlitsch et al. 1988) and eutrophication. Presumably, individuals that are larger during metamorphosis will become larger adults, as has been found for a number of salamander and frog species (Berven and Gill 1983; Semlitsch et al. 1988). However, the larger body size of adult frogs captured at the SWPs, despite their similar body condition with adults from the SNPs, might have also been caused by

a difference in age. Hence, the larger individuals captured at the SWPs may have been older than the smaller individuals captured at the SNPs. The skeletochronology approach could be used to test this hypothesis (Guarino et al. 1995). Older populations at the SWPs may result from a potentially lower mortality at such artificial sites, due to a reduced predation pressure, either because of negative effects of road density on predator numbers and activity (i.e. ‘predation release hypothesis’; Downing et al. 2015) or because of predator exclusion via fences. The latter may limit the entrance of some amphibian predators, such as mustelids (Parris 2006; Otero et al. 2018) or fish that might be introduced by other species. Similarly, fences might limit frogs to disperse from the SWPs, resulting in a longer residence time, which might lead to older populations at SWPs, when compared with SNPs. Behavioural studies are needed to assess the capabilities of green frogs to pass fences surrounding SWPs.

Last but not least, the differences in body size we found between green frogs captured at SNPs and at SWPs may also be related to a potential species difference. The European green frog complex (the *Pelophylax* complex) includes

Table 4 Statistical outputs from Linear Model Analysis testing for relationships between male frog biometric variables and environmental parameters at SWPs

| Dependant variable | LM | | | |
|--------------------|---------------------------------|----------------------|---------|-----|
| | Parameter | Estimate (β) | SE | P |
| SVL | (intercept) | 73.98 | 1.55 | *** |
| | Surface crops 5000 m | 4.92 | 2.01 | * |
| | Surface forest 5000 m | 4.12 | 1.72 | * |
| | Surface notable wetlands 5000 m | -2.93 | 0.97 | * |
| BCI | (intercept) | 8.1E-03 | 4.1E-03 | ns |
| | Presence of an oil remover | -2.3E-02 | 3.2E-03 | ** |
| | Surface grassland 5000 m | -1.2E-02 | 6.3E-03 | ** |
| FA forearms | (intercept) | 2.9E-02 | 1.3E-03 | *** |
| | Surface grassland 5000 m | -3.6E-03 | 1.4E-03 | * |
| | Surface notable wetlands 5000 m | -4.5E-03 | 1.4E-03 | ** |
| FA tibias~1 | | | | |

ns = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

different species (*Pelophylax kl. esculentus*, *Pelophylax ridibundus*, and *Pelophylax lessonae*), which are hard to differentiate in the field (Patrelle et al. 2011). For instance, *Pelophylax lessonae* can be morphologically smaller than the two other species and is more frequently found in (semi-)natural environments than the other two species (Pagano et al. 2001). Accordingly, frogs captured in SNPs in our study may have been specimens of the smaller *Pelophylax lessonae*. Unfortunately, we could not conduct any genetic or further morphological analyses, which would have allowed a precise determination.

Body condition and fluctuating asymmetry

Despite the above-mentioned differences in body size and body mass between green frogs captured at SWPs and at SNPs, we found no differences in body condition or in fluctuating asymmetry between green frogs (adult males/females and sub-adults) captured at both pond types. Yet, juveniles captured at SWPs had a lower BCI and were also smaller than those captured at SNPs. A smaller body size and a lower body condition in juveniles of the SWPs suggest that they underwent an earlier metamorphosis and/or were smaller at metamorphosis. An earlier metamorphosis of frogs at SWPs is supported by results from Snodgrass et al. (2008) and Dorchin and Shanas (2010), that concern *Anaxyrus americanus* and *Bufo viridis*, respectively.

If we neglect the possibility that frogs collected at both pond types belonged to different species of the green frog complex (see above) and apart from potential differences in population age, the similar BCI observed in sub-adults and adults at SWPs and SNPs might also be explained by the following scenarios: (1) Juveniles that encountered potentially lower trophic conditions at SWPs and that survived to become sub-adults and adults were able to compensate for this. (2) Alternatively, while trophic conditions between pond types differed for juveniles, this was not the case for adults and sub-adults.

Body condition (BCI) is the most commonly used proxy of individual energetic reserves and fitness (Green 2001; Schulte-Hostedde et al. 2005). The lower BCI of juveniles that developed at the SWPs (embryonic development), and the similarity of the BCI observed in adult and sub-adult individuals caught at the SWPs and the SNPs, suggests that the artificial nature of SWPs did not affect the trophic conditions experienced after metamorphosis, but rather affected embryonic development. Previous studies have found a relationship between pollutant levels (e.g. heavy metals and pesticides) and body mass in amphibians, where a higher pollutant level is associated with a lower body mass (Egea-Serrano et al. 2012) and, consequently, lead to a reduced BCI. In our study, pollutant levels were not measured for all SWPs sites and not at all for the SNPs sites. However, our assumption was that

pollutant levels should be lower at the SNPs than at the SWPs. Despite this, we found no relationship between pollutant levels and biometric measurements (BCI, FA). This could mean that any potential effects of pollutants investigated in this study on adult and sub-adult European green frogs might have been similar in both pond types. Given the relatively low pollutant level and/or the specific combination of pollutants, it is possible that they had no measurable effect on the biometrics of collected frogs. Alternatively, it is also possible that individuals that were exposed to a greater (pollutant) stress level and, therefore, might have shown a lower BCI and a higher AF index, did not survive and were, consequently, not captured. However, during our study, we did not find any dead individuals. The pollutant issue is further complicated by species differences concerning the sensitivity to pollution (Katz 1975) and further studies are urgently needed to address this issue.

Fluctuating asymmetry (FA) has been proposed as a good indicator of past stressful periods and of individual fitness in amphibians (Costa and Nomura 2016; Guo et al. 2017; Zhelev et al. 2019). FA has, thus, been used to compare environmental quality of different habitats used by amphibians (e.g. Guillot et al. 2016; Sievers 2017). Guillot et al. (2016) compared the FA in common toads (*Bufo bufo*) that were captured in farmland areas and in forested areas, while Sievers (2017) investigated FA in the common eastern froglet (*Crinia signifera*), living in different wetland habitats. Sievers (2017) reported significant differences in FAs (forearms and tibias) between individuals captured in habitats of contrasting quality, whereas Guillot et al. (2016) only reported differences using forearm FA (Fig. 3). In our study, FA calculated from forearms was higher than the FA calculated from tibias.

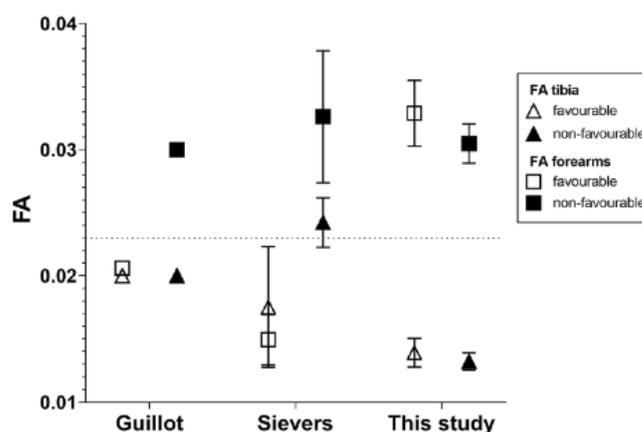


Fig. 3 Fluctuating asymmetry (FA) based on forearm (squares) and tibia (triangles) measurements in amphibian species inhabiting contrasting environments (favourable in white and non-favourable in black) in agricultural areas (common toad, Guillot et al. 2016), wetlands (common eastern froglet, Sievers 2017) and road landscapes (European green frog, this study). The horizontal dashed line indicates a hypothetical threshold of FA common for all 3 studies and emphasizes the difficulties associated with using FA indices in interspecific studies

However, we did not find differences between individuals captured at SWPs and at SNPs. Differences in FA between forearms and tibias may be explained by the difficulty to accurately measure forearm length in amphibians, given its considerably shorter length, when compared with the length of the tibia (e.g. in juveniles, forearm versus tibia length is on average 5.5 ± 0.07 mm and 12.9 ± 0.3 mm, respectively). In addition, interpretation of FA also depends on the threshold value used to assign environmental quality for amphibians. Accordingly, we strongly encourage colleagues to carefully consider FAs based on forearm length, because measuring the forearms of living amphibians can lead to inaccurate measurements (Alford et al. 1999). Considering the limits of using forearm FA, the measurements must be replicated to estimate a measurement error (Alford et al. 1999; Sievers 2017). In addition, when a measurement concerns a short structure (e.g. forearm), the measurement error of the instrument (e.g. electronic calliper) must also be taken into account. Therefore, the use of a calliper to measure the forearms to obtain the FA is risky. A better approach might be to take an X-ray of the animal, to allow an a posteriori measurement on a computer (Breno et al. 2013).

The FA investigation of our study could not demonstrate a difference in developmental conditions for European green frogs at the two pond types investigated (Fig. 3). However, our investigation concerning the BCI, clearly indicates such a difference (Table 3). There is a wide spectrum of tools available to assess individual health in amphibians. For example, corticosterone levels in the blood have been used to investigate potential stress effects associated with habitat fragmentation and temperature increase in common toads (Janin et al. 2011; Brischoux et al. 2018). Hematological parameters, such as leucocyte count and haemoglobin concentration have also been used for health assessment in the context of pollution effects on amphibians (Zhelev et al. 2018). While such parameters provide a clear answer when assessing individual health status, blood sampling requires skills, training and specific ethical authorisations. By contrast, biometric measurements are relatively easy to obtain.

Linking stormwater pond design and surrounding landscape with adult male biometrics

When investigating the relationship between various environmental parameters and adult frog biometrics, our model did not retain any pollutant variables. Hence, with respect to the pollutants included in our analysis and the considered sampling period, we found no negative impact of SWP water on adult green frog biometrics. The most likely explanation is that all pollutant concentrations ($\text{Cu} = 8.1 \pm 1.02$ $\mu\text{g/l}$, $N = 0.05 \pm 0.01$ mg/l, $\text{Cl} = 9.7 \pm 1.8$ mg/l) were well below reported sub-lethal concentrations for amphibians ($\text{Cu} = 31.6$ mg/

l, $N = 20$ mg/l, $\text{Cl} = 1721.4$ mg/l; Jumeau et al. 2020). Hence, with respect to the pollutants investigated in our analysis, this confirms that SWPs and SNPs are not highly contrasted environments for European green frogs.

By contrast, we found a strong correlation between adult male green frog biometrics and landscape parameters. Frogs were larger in SWPs surrounded by a greater proportion of cropland and forests within a 5000 m radius. When SWPs were surrounded by a greater proportion of important wetlands, frogs were smaller. A size increase might be explained by the absence of alternative habitats such as wetlands, as suggested by the negative relationship between the size of individuals (SVL) and surrounding wetland surface area. The mechanism behind this might be that in the absence of sufficiently large wetlands, older individuals might stay at SWPs, rather than abandoning them and moving to nearby wetlands. A further mechanism that could be verified experimentally might be the increasing input of agricultural fertilizers into the environment (N,P,K), which are known to favour the proliferation of aquatic vegetation (Taziki et al. 2015). Accordingly, eutrophication at SWPs surrounded by croplands might increase food availability to green frog larval stages. The quantity of proteins ingested (both vegetable and animal sources) has been shown to affect the growth rate and survival of tadpoles in several amphibian species (Martinez et al. 1993, 1996; Martins et al. 2013) and possibly also affects adult size. While, the effect of food availability on tadpole body-size has been shown, it would be interesting to use a semi-controlled approach (e.g. mesocosm), to investigate this effect throughout the different life history stages of individuals. Such an investigation might also be possible in the field, using capture-mark-recapture methods (Miaud et al. 1999).

Apart from the link between the surrounding landscape of SWPs and male green frog biometrics, we found that individuals caught at SWPs that were equipped with an oil remover had a body condition ~ 3 times lower than frogs caught at SWPs lacking such a device. We believe that in SWPs equipped with an oil remover some frogs are washed through the metal grid during an overflow and become trapped inside the concrete drainage when the water level falls below the rim of the skimmer. Hence, trapped frogs might only be able to escape during the subsequent overflow, which might occur within a few days, weeks or months (Jumeau, personal communication). These stochastic events obviously depend on the weather and the season. Unable to feed when trapped inside the concrete drainage, the effect on frog body condition is obvious.

Unfortunately, for the SNPs, a statistical analysis investigating the potential effects of the surrounding landscape on frog biometrics was not possible because of a too small number of animals in each category.

Are SWPs a suitable habitat for the European green frog?

In our study, the results obtained from juveniles are in line with previous studies. A number of studies argued that SWPs are poor quality habitats for amphibian development (i.e. embryonic development), leading to small size and a poor body condition in this group (Bishop et al. 2000; Brand and Snodgrass 2010; Dorchin and Shanas 2010; Sievers 2017). However, our results obtained from sub-adults and adults contrast with results from the juveniles. The lack of a difference between pond types with respect to body condition and fluctuating asymmetry in adult and sub-adult frogs does not support our original hypothesis of SWPs being an unsuitable habitat for these groups, nor would they appear to be less favourable than SNPs.

A number of factors might have contributed to the differences we found between juvenile and adult/sub-adult green frogs. First, the hatching place of sub-adult and adult green frogs caught during the study is uncertain so that animals might have moved more recently to the SWPs. Most green frogs spend nearly all their adult life in the vicinity of the pond where they hatched (Peter 2001), for example at a neighbouring pond, except if pond access has been altered (e.g. landscape fragmentation), as is the case for most of the SWPs in our study. Hence, we do not know if the adult/sub-adult green frogs caught at the SWPs originated from there. By contrast, for the juveniles it is certain that they spent their entire developmental period at the capture site because in some individuals the tail had not been fully resorbed. This emphasizes the need to investigate the suitability of SWPs for green frogs, by comparing, in situ, growth and survival rates of tadpoles from SWPs and SNPs.

Second, our sampling might have coincided with a non-representative year, with less pollution from the roads in the water of the SWPs than typical for the study area of Bas-Rhin. According to the European Environmental Agency, an upgrading of combustion engines and an improvement in anti-pollution technology has occurred during the last 20 years (EEA 2020). However, at the same time, agricultural pollution has continued to increase (Zabel et al. 2019). These developments were confirmed in a recent study conducted between 2015 and 2016 on 82 SWPs in the Bas-Rhin area (Jumeau et al. 2020). That study measured more than 20 different pollutants and found that their concentrations in these SWPs were below established sub-lethal thresholds for amphibians (Jumeau et al. 2020). In this context, the protocols used in most studies investigating the effects of pollutants in a habitat on amphibians do not reflect the actual conditions of a site in situ but are mostly conducted within the laboratory (Bishop et al. 2000; Brand and Snodgrass 2010; Dorchin and Shanas 2010). Studying the condition of individuals (e.g. BCI reflecting fitness) at a particular site, should better reflect the

effects of the concerned environment on amphibians. Indeed, SWPs are not only structures that retain road pollutants. Instead, a complex set of factors, existing at these SWPs and their synergistic or opposing interactions can lead to positive or negative effects on the individuals that live at these sites.

Our study focused on the European green frog, a taxonomic complex that is ubiquitous and presumably relatively tolerant with respect to pollution (Zhelev et al. 2015). However, green frogs were not the only amphibian species present at our study SWPs but European green toads (*Bufo viridis*) could also be found (Jumeau et al. 2020). The reason for the overrepresentation of these two species at the SWPs is likely linked to the attractiveness of these sites for these species (e.g. nearest site to the wintering habitat; presence of first singing males), rather than to the intrinsic ecological quality of SWPs in a disturbed landscape. Because amphibian species may respond differently to a given stressor (Katz 1975, 1981; Otero et al. 2018), a way to solve and prioritise the question of the intrinsic quality of the SWPs for amphibians requires further consideration, especially because it may also concern the most endangered amphibian species in the area, the European green toad. Finally, we suggest that future studies should address questions concerning the health status of amphibians at SWPs more directly and investigate whether individuals at these sites (presumably more polluted and eutrophic) are more susceptible to disease and parasite load. Internal (e.g. trematodes; Johnson et al. 2007) and external parasites (e.g. leeches; Schalk et al. 2002) might affect the health of numerous amphibian species at SWPs.

To conclude, in a landscape highly fragmented by roads and agricultural fields, where natural wetlands have almost vanished, stormwater ponds (SWPs) could be considered as suitable substitute habitats for adult and sub-adult European green frogs. However, potential physical traps, such as oil removers, have to be modified, to prevent trapping and, potentially, killing amphibians. By contrast, our results for juveniles, known to have hatched at the SWPs investigated, suggest that SWPs are less suitable for the early development of green frogs. It is therefore most likely, that the adult and sub-adult green frogs captured at the SWPs originated from different, more favorable sites. Since a healthy and sufficiently large juvenile population is crucial for population survival, the use of SWPs as habitat will likely not support a viable green frog population. The major function of SWPs for green frogs might be to act as relay sites, allowing frogs to recolonize relict wetlands. The development of specific management measures could also help to improve the quality of SWPs for amphibians. For example, the regular drainage of such ponds during the non-breeding season and the removal of polluted sediment might be an important measure in this context. While further research is clearly needed, a conservation strategy that will preserve

existing wetlands and restore former wetlands will be most beneficial to many amphibian species.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11252-021-01129-z>.

Acknowledgements We thank all the students who participated in this study and two anonymous reviewers for their valuable comments.

Code availability The codes used with R software during the current study are available from the corresponding author upon request.

Author contributions All authors approve this version of the manuscript for publication. They agree to be accountable for the aspects of the work that they conducted, and will ensure that any questions related to the accuracy or integrity of any part of their work are appropriately investigated and resolved. AC, JJ, & YH conceived the study and designed the methods; AC & ND collected the data; AC & JJ analysed the data; AC drafted the manuscript with contributions from JJ, ND, ME, JYG & YH.

Funding This study was conducted within the framework of the CERISE project and was funded by the French Minister of Ecology (DREAL Grand-Est), the Region Grand-Est, and the Conseil Départemental du Bas-Rhin (CD67). The funders had no role in any aspect of the study and agree to its publication.

Data availability The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon request.

Declarations

Ethics approval All experimental protocols for this study complied with national legislation and were approved by the appropriate authorities: “Arrêté Préfectoral n° 2019-DREAL-EBP-0030”.

Consent to participate All authors participated in the writing of this manuscript.

Consent for publication All authors have approved the submission to ‘Urban Ecosystems’.

Conflicts of interest/Competing interests None of the authors of this manuscript has any potentially competing interests.

References

- Agence de l’Eau Rhin-Meuse, DREAL (2016) Programme de mesures du district Rhin. Nancy Oliveto Erviti, Urbaniste-Juriste, pp 1–163
- Alam MZ, Anwar AHMF, Heitz A, Sarker DC (2018) Improving stormwater quality at source using catch basin inserts. *J Environ Manag* 228:393–404. Academic Press
- Alex Smith M, Green DM (2005) Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28:110–128. John Wiley & Sons, Ltd.
- Alford R, Bradfield K, Richards S (1999) Measuring and analyzing developmental instability as a tool for monitoring frog populations. Declines and disappearances of Australian frogs. *Environment Australia*, Canberra, pp 34–43
- Baird TA, Hranitz JM, Timanus DK, Schwartz AM (2007) Behavioral attributes influence annual mating success more than morphological traits in male collared lizards. *Behav Ecol* 18:1146–1154
- Berven KA, Gill DE (1983) Interpreting geographic variation in life-history traits. *Am Zool* 23:85–97. Oxford Academic
- Bishop CA, Struger J, Shirose LJ, Dunn L, Campbell GD (2000) Contamination and wildlife communities in Stormwater detention ponds in Guelph and the greater Toronto area, Ontario, 1997 and 1998 part II — contamination and biological effects of contamination. *Water Qual Res J* 35:437–474. IWA Publishing
- Brand AB, Snodgrass JW (2010) Value of artificial habitats for amphibian reproduction in altered landscapes. *Conserv Biol* 24:295–301. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111)
- Brand AB, Snodgrass JW, Gallagher MT, Casey RE, Van Meter R (2010) Lethal and sublethal effects of embryonic and larval exposure of *Hyla versicolor* to stormwater pond sediments. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:325–331. Springer
- Breno M, Bots J, De Schaepe drijver L, Van Dongen S (2013) Fluctuating asymmetry as risk marker for stress and structural defects in a toxicologic experiment. *Birth Defects Res B Dev. Reprod. Toxicol.* 98: 310–317
- Brischoux F, Lourdaï O, Boissinot A, Angelier F (2018) Influence of temperature, size and confinement on testosterone and corticosterone levels in breeding male spined toads (*Bufo spinosus*). *Gen Comp Endocrinol* 269:75–80. Academic Press
- Bryer PJ, Elliott JN, Willingham EJ (2006) The effects of coal tar based pavement sealer on amphibian development and metamorphosis. *Ecotoxicology* 15:241–247
- BUFO (2014) La Liste rouge des Amphibiens menacés en Alsace. BUFO, ODONAT. Document numérique
- Catenazzi A (2015) State of the world’s amphibians. *Ann Rev Environ Resour* 40:91–119
- Cayucla H, Valenzuela-Sánchez A, Teulier L, Martínez-Solano Í, Léna JP, Merilä J, Muths E, Shine R, Quay L, Denoël M, Clobert J, Schmidt BR (2020) Determinants and consequences of dispersal in vertebrates with complex life cycles: a review of pond-breeding amphibians. *Quart Rev Biol* 95:1–36. The University of Chicago Press/Chicago, IL
- Costa RN, Nomura F (2016) Measuring the impacts of roundup original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. *Hydrobiologia* 765:85–96. Springer International Publishing
- Cushman SA (2006) Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biol Conserv* 128:231–240. Elsevier BV, 128, 231, 240
- Davidson NC (2014) How much wetland has the world lost? Long-term and recent trends in global wetland area. *Mar Freshw Res* 65:934. CSIRO
- Dirzo R, Young HS, Galetti M, Ceballos G, Isaac NJB, Collen B (2014) Defaunation in the Anthropocene. *Science (New York, N.Y.)* 345: 401–6. American Association for the Advancement of Science
- Dorchin A, Shanas U (2010) Assessment of pollution in road runoff using a *Bufo viridis* biological assay. *Environ Pollut* 158:3626–3633. Elsevier
- Downing RJ, Rytwinski T, Fahrig L (2015) Positive effects of roads on small mammals: a test of the predation release hypothesis. *Ecol Res* 30:651–662. Springer-Verlag Tokyo
- Duellman WE, Trueb L (1994) *Biology of amphibians*. JHU Press
- Duffus ALJ, Cunningham AA (2010) Major disease threats to European amphibians. *Herpetol J* 20:117–127. British Herpetological Society
- EEA (2020) Monitoring CO2 emissions from passenger cars and vans. Page EEA Report
- Egea-Serrano A, Relyea RA, Tejedo M, Torralva M (2012) Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecol Evol* 2:1382–1397
- EPA (2009) Stormwater wet pond and wetland management guidebook. EPA 833-B-09-001. EPA, Washington, D.C., U

- Falaschi M, Melotto A, Manenti R, Ficetola GF (2020) Invasive species and amphibian conservation. *Herpetologica* 76:216–227. Herpetologist's League Inc.
- Finlayson-Pitts BJ, Pitts JN (1997) Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* 276:1045–1052. American Association for the Advancement of Science
- Fischer J, Lindenmayer DB (2007) Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Glob Ecol Biogeogr* 16(3):265–280
- Furrer RD, Pasinelli G (2016) Empirical evidence for source-sink populations: a review on occurrence, assessments and implications. *Biol Rev* 91:782–795
- Gallagher MT, Snodgrass JW, Brand AB, Casey RE, Lev SM, Van Meter RJ (2014) The role of pollutant accumulation in determining the use of stormwater ponds by amphibians. *Wetl Ecol Manag* 22:551–564. Springer Netherlands
- Gibbons JW et al (2000) The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. American Institute of Biological Sciences
- Grayson KL, De Lisle SP, Jackson JE, Black SJ, Crespi EJ (2012) Behavioral and physiological female responses to male sex ratio bias in a pond-breeding amphibian. *Front Zool* 9:24. BioMed Central
- Green AJ (2001) Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82:1473–1483. Ecological Society of America
- Green DM (2013) Sex ratio and breeding population size in Fowler's toad, *Anaxyrus* (= *Bufo*) *fowleri*. *Copeia* 2013:647–652. American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH)
- Guarino FM, Angelini F, Cammarota M (1995) A skeletochronological analysis of three syntopic amphibian species from southern Italy. *Amphibia-Reptilia* 16:297–302
- Guillot H, Boissinot A, Angelier F, Lourdais O, Bonnet X, Brischoux F (2016) Landscape influences the morphology of male common toads (*Bufo bufo*). *Agric Ecosyst Environ* 233:106–110. Elsevier B.V
- Guo R, Zhang W, Ai S, Ren L, Zhang Y (2017) Fluctuating asymmetry rather than oxidative stress in *Bufo raddei* can be an accurate indicator of environmental pollution induced by heavy metals. *Environ Monit Assess* 189. Springer International Publishing
- Hamer AJ, Parris KM (2011) Local and landscape determinants of amphibian communities in urban ponds. *Ecol Appl* 21:378–390. John Wiley & Sons, Ltd.
- Hassall C, Anderson S (2015) Stormwater ponds can contain comparable biodiversity to unmanaged wetlands in urban areas. *Hydrobiologia* 745:137–149. Springer International Publishing
- Indermaur L, Winzeler T, Schmidt BR, Tockner K, Schaub M (2009) Differential resource selection within shared habitat types across spatial scales in sympatric toads. *Ecology* 90:3430–3444
- Janin A, Léna JP, Joly P (2011) Beyond occurrence: body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. *Biol Conserv* 144:1008–1016
- Johnson PTJ, Chase JM, Dosch KL, Hartson RB, Gross JA, Larson DJ, Sutherland DR, Carpenter SR (2007) Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15781–15786. National Academy of Sciences
- Joly P (2019) Behavior in a changing landscape: using movement ecology to inform the conservation of pond-breeding amphibians. *Front Ecol Evol* 7:155
- Jumeau J, Lopez J, Morand A, Petrod L, Burel F, Handrich Y (2020) Factors driving the distribution of an amphibian community in stormwater ponds: a study case in the agricultural plain of Bas-Rhin, France. *Eur J Wildlife Res* 66:33. Springer
- Katz U (1975) NaCl adaptation in *Rana ridibunda* and a comparison with the euryhaline toad *Bufo viridis*. *J Exp Biol* 63:763–773. The Company of Biologists Ltd.
- Katz U (1981) The effect of salt adaptation and amiloride on the in vivo acid-base status of the euryhaline toad *Bufo viridis*. *J Exp Biol* 93:93–99. The Company of Biologists Ltd.
- Kik M, Martel A, Sluijs AS van der, Pasmans F, Wohlsein P, Gröne A, Rijks JM (2011) Ranavirus-associated mass mortality in wild amphibians, the Netherlands, 2010: a first report. *Vet J* 190:284–286. W.B. Saunders
- Kyriakopoulou-Sklavounou P, Loumbourdis N (1990) Annual ovarian cycle in the frog, *Rana ridibunda*, in northern Greece. *J Herpetol* 24:185. JSTOR
- Le Viol I, Chiron F, Julliard R, Kerbirou C (2012) More amphibians than expected in highway stormwater ponds. *Ecol Eng* 47:146–154
- Lesbarrères D, Lodé T (2002) Influence de facteurs environnementaux sur la reproduction de *Rana dalmatina* (Anura, Ranidae): implications pour sa conservation. *Bulletin de la Société herpétologique de France* 104:62–71
- Leung B, Forbes MR, Houle D (2000) Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: comparing efficacy of analyses involving multiple traits. *Am Nat* 155:101–115
- Loman J, Madsen T (2010) Sex ratio of breeding common toads (*Bufo bufo*)—influence of survival and skipped breeding. *Amphibia-Reptilia* 31:509–524. Brill
- Mander Ü, Mitsch WJ (2009) Pollution control by wetlands. *Ecol Eng* 35:153–158
- Martinez IP, Herráez MP, Álvarez R (1993) Optimal level of dietary protein for *Rana perezi* Seoane larvae. *Aquac Res* 24:271–278
- Martinez IP, Álvarez R, Herráez MP (1996) Growth and metamorphosis of *Rana perezi* larvae in culture: effects of larval density. *Aquaculture* 142:163–170. Elsevier
- Martins FM, Oom MM, Rebelo R, Rosa GM (2013) Differential effects of dietary protein on early life-history and morphological traits in natterjack toad (*Epidalea calamita*) tadpoles reared in captivity. *Zoo Biol* 32:457–462. John Wiley & Sons, Ltd.
- Masello JF, Quillfeldt P (2003) Body size, body condition and ornamental feathers of burrowing parrots: variation between years and sexes, assortative mating and influences on breeding success. *Emu* 103:149–161. Taylor & Francis
- Maxwell SL, Fuller RA, Brooks TM, Watson JEM (2016) Biodiversity: The ravages of guns, nets and bulldozers. Nature Publishing Group
- Metcalfe CD, Nagabhatla N, Fitzgerald SK (2018) Multifunctional wetlands: pollution abatement by natural and constructed wetlands, pp 1–14
- Miaud C (2014) Protocole d'hygiène pour le contrôle des maladies des amphibiens dans la nature à destination des opérateurs de terrain
- Miaud C, Guyétant R, Elmberg J (1999) Variations in life-history traits in the common frog *Rana temporaria* (Amphibia: Anura): a literature review and new data from the French Alps. *J Zool* 249:61–73. Wiley
- Oertli B, Parris KM (2019) Review: toward management of urban ponds for freshwater biodiversity. *Ecosphere* 10. Wiley-Blackwell
- Otero MA, Pollo FE, Grenat PR, Salas NE, Martino AL (2018) Differential effects on life history traits and body size of two anuran species inhabiting an environment related to fluorite mine. *Ecol Indic* 93:36–44. Elsevier B.V
- Pagano A, Crochet PA, Graf J-D, Joly P, Lode T (2001) Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Glob Ecol Biogeogr* 10:433–441. John Wiley & Sons, Ltd.
- Palmer AR, Strobeck C (1986) Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annu Rev Ecol Syst* 17:391–421
- Parris KM (2006) Urban amphibian assemblages as metacommunities. *J Anim Ecol* 75:757–764
- Patrelle C, Ohst T, Picard D, Pagano A, Sourice S, Dallay M-G, Plötner J (2011) A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs. *Mol Ecol Resour* 11:200–205. John Wiley & Sons, Ltd.

- Peter A-KH (2001) Dispersal rates and distances in adult water frogs, *Rana lessonae*, *R. ridibunda*, and their Hybridogenetic Associate *R. esculenta*. Allen Press Herpetologists' League
- Price SJ, Garner TWJ, Nichols RA, Balloux F, Ayres C, Mora-Cabello de Alba A, Bosch J (2014) Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. *Curr Biol* 24:2586–2591
- Pulliam HR (1988) Sources, sinks, and population regulation. *Am Naturalist* 132:652–661. University of Chicago Press
- Quaranta A, Bellantuono V, Cassano G, Lippe C (2009) Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS One* 4:e7699
- Runge JP, Runge MC, Nichols JD (2006) The role of local populations within a landscape context: defining and classifying sources and sinks. *Am Nat* 167:925–938
- Salice CJ (2012) Multiple stressors and amphibians: contributions of adverse health effects and altered Hydroperiod to population decline and extinction. *J Herpetol* 46:675–681
- Schalk G, Forbes MR, Weatherhead PJ (2002) Developmental plasticity and growth rates of green frog (*Rana clamitans*) embryos and tadpoles in relation to a leech (*Macrobdella decora*) predator. *Copeia* 2002:445–449
- Scher O, Chavaren P, Despreaux M, Thiéry A (2004) Highway stormwater detention ponds. *Arch Sci* 57:121–130
- Schulte-Hostedde AI, Zinner B, Millar JS, Hickling GJ (2005) Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. *Ecology* 86:155–163
- Schwarzkopf L, Alford RA (1996) Desiccation and shelter-site use in a tropical amphibian: comparing toads with physical models. *Funct Ecol* 10:193. JSTOR
- Seebacher F, Alford RA (2002) Shelter microhabitats determine body temperature and dehydration rates of a terrestrial amphibian (*Bufo marinus*). *J Herpetol* 36:69. JSTOR
- Semlitsch RD, Scott DE, Pechmann JHK (1988) Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 69:184–192. John Wiley & Sons, Ltd.
- Shine R (1979) Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia* 1979:297. JSTOR
- Sievers M (2017) Sand quarry wetlands provide high-quality habitat for native amphibians. *Web Ecol* 17:19–27
- Sievers M, Parris KM, Swearer SE, Hale R (2018) Stormwater wetlands can function as ecological traps for urban frogs. *Ecol Appl* 28:1106–1115. John Wiley & Sons, Ltd.
- Sievers M, Hale R, Swearer SE, Parris KM (2019) Frog occupancy of polluted wetlands in urban landscapes. *Conserv Biol* 33:389–402. Blackwell Publishing Inc
- Snodgrass JW, Casey RE, Joseph D, Simon JA (2008) Microcosm investigations of stormwater pond sediment toxicity to embryonic and larval amphibians: variation in sensitivity among species. *Environ Pollut* 154:291–297
- Snodgrass JW, Moore J, Lev SM, Casey RE, Ownby DR, Flora RF, Izzo G (2017) Influence of modern Stormwater management practices on transport of road salt to surface waters. *Environ Sci Technol* 51:4165–4172. American Chemical Society
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science (New York, N.Y.)* 306:1783–6. American Association for the Advancement of Science
- Taziki M, Ahmadzadeh H, Murry MA, Lyon SR (2015) Nitrate and nitrite removal from wastewater using algae. Bentham Science Publishers
- Van der Ree R, Smith DJ, Daniel J, Grilo C (2015) Handbook of road ecology. John Wiley & Sons, Oxford
- Waelti MO, Reyer H-U (2007) Food supply modifies the trade-off between past and future reproduction in a sexual parasite–host system (*Rana esculenta*, *Rana lessonae*). *Oecologia* 152:415–424. Springer
- Wells KD (1977) The social behaviour of anuran amphibians. *Anim Behav* 25:666–693
- Whitman DW (2008) The significance of body size in the Orthoptera: a review. *J Orthoptera Res* 17:117–134. Pensoft Publishers, 17, 117, 134
- Wilbur HM (1980) Complex life cycles. *Annu Rev Ecol Syst* 11:67–93
- Zabel F, Delzeit R, Schneider JM, Seppelt R, Mauser W, Václavík T (2019) Global impacts of future cropland expansion and intensification on agricultural markets and biodiversity. *Nature Communications*
- Zhelev ZM, Popgeorgiev GS, Arnaudov AD, Georgieva KN, Mehterov NH (2015) Fluctuating asymmetry in *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as a response to anthropogenic pollution in South Bulgaria. *Arch Biol Sci* 67:1009–1023
- Zhelev Z, Tsonev S, Georgieva K, Arnaudova D (2018) Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in southern Bulgaria and its importance in assessing environmental state: haematological parameters. *Environ Sci Pollut Res* 25:7884–7895. Springer Verlag
- Zhelev ZM, Tsonev S V., Angelov M V (2019) Fluctuating asymmetry in *Pelophylax ridibundus* meristic morphological traits and their importance in assessing environmental health. *Ecol Indic* 107. Elsevier B.V

Discussion de l'étude 1 :

Cette étude portant sur les grenouilles vertes, un modèle amphibien qui n'avait pas été envisagé initialement dans le cadre de mes travaux de thèse, a cependant l'avantage de soulever plusieurs questions quant à la problématique générale de cette thèse ; elle constitue une approche préliminaire. Nous souhaitions initialement réaliser l'ensemble de nos études sur le Crapaud vert, mais des problèmes d'autorisations de capture nous ont obligé à utiliser une espèce de substitution, moins menacée. En effet, les autorisations nécessaires pour initier notre expérimentation sur le Crapaud vert (dossier envoyé à la DREAL Grand-Est en décembre 2018) ont été obtenues trop tard par rapport à sa période de reproduction, le 31 juillet 2019. À cette date, le pic de reproduction du Crapaud vert était terminé depuis plus d'un mois. Compte tenu de l'investissement mis en place dans la réalisation du protocole ainsi que ma motivation pour aller sur le terrain et y encadrer des stagiaires déjà sélectionnés, nous avons choisi une espèce sans statut de protection particulier et présente aussi bien dans les bassins d'orage routiers (BO) que dans les mares semi-naturelle (MSN). De par leur caractère ubiquiste, les grenouilles vertes (*Pelophylax spp.*) étaient le bon compromis même s'il a été impossible d'identifier avec précision le nom d'espèce des individus capturés pendant l'étude. De plus, inconvénient classique chez les amphibiens, les mâles chanteurs sont beaucoup plus faciles à détecter et par conséquent à capturer, ce qui a également induit un biais dans le sex-ratio de nos échantillons.

Malgré ce changement d'espèce cible, cette première étude nous a permis de prendre nos marques dans ces sites particuliers, parfois profonds. Initialement, nous avons identifié 87 bassins d'orage routiers et 41 mares semi-naturelles pouvant être inclus dans l'étude, mais leurs configurations ne nous ont pas permis de réaliser suffisamment de captures (aucun accès à l'eau, trop de végétation, pente abrupte...). De plus, certains sites étaient privés et les demandes d'accès n'ont pas toutes abouties à temps. De ce fait, nous nous sommes retrouvés avec un nombre de sites déséquilibré avec 25 BO contre 9 MSN.

Concernant les résultats obtenus, ils nous ont permis d'aiguiller nos études suivantes qui ont pu enfin être réalisées sur notre modèle cible, le Crapaud vert. En effet, dans cette première étude nous avons mis en évidence que les juvéniles de l'année, nés sur place avec certitude, présentaient une condition corporelle plus faible dans les BO. Il est donc possible que les individus soient impactés durant le développement larvaire. De ce fait, nous nous sommes ensuite particulièrement intéressés au développement larvaire sur le Crapaud vert dans les études 2 et 3 de cette thèse.

Étude 2 : Les bassins d'orage routiers en tant que site de reproduction des amphibiens : une étude de cas sur les têtards du Crapaud vert

Cette étude a fait l'objet d'une publication publiée en septembre 2022 dans la revue
« *Environmental Science and Pollution Research* ».

<https://doi.org/10.1007/s11356-022-22991-0>

Une altération du succès reproducteur est bien évidemment une des premières causes possibles d'impact d'un milieu artificialisé en tant que piège écologique. Dans l'étude précédente, nous avons mis en évidence que les juvéniles de grenouilles vertes avaient une condition corporelle plus faible dans les bassins d'orage routiers (BO) que dans les mares semi-naturelles (MSN), nous sommes partis de l'hypothèse que ce problème allait également concerner le développement larvaire chez le Crapaud vert.

Résumé de l'étude 2 :

Dans cette deuxième étude, nous nous sommes intéressés au développement larvaire d'une espèce en danger d'extinction au niveau régional et dont les plus grandes populations du Bas-Rhin sont retrouvées dans les bassins d'orage routiers : le Crapaud vert (*Bufo viridis*). Pour ce faire, nous avons étudié le développement larvaire *in situ* dans des enclos flottants présentant les conditions les plus proches des bassins étudiés tout en excluant la majorité des prédateurs vertébrés et invertébrés (poissons/larves d'insectes). Nous avons déposé 2 enclos flottants par site sur 8 MSN et 8 BO où la reproduction de Crapaud vert était connue. Dans chaque enclos, nous avons déposé 30 têtards fraîchement éclos provenant du site étudié. Les têtards étaient comptabilisés et mesurés 2 fois par semaine tout au long de leur développement. Par ailleurs, différentes caractéristiques de chaque site (végétation, pente, exposition, superficie, etc.) ont été récoltées ; ainsi que des prélèvements d'eau et de sédiment, afin d'analyser la présence et la concentration de différents polluants. Les résultats n'ont pas montré de différences significatives de croissance entre les MSN et BO. La survie larvaire était en revanche quasiment nulle dans les BO (0,63%) contre 21,11% pour les MSN. Les analyses statistiques ne nous ont pas permis de préciser les variables impactant la survie des têtards dans les BO mais nous avons pu déterminer que les BO ne se différenciaient des MSN que par un

sédiment 5 fois plus pollué (pas de différence significative pour la pollution de l'eau en revanche). Par ailleurs, nous avons découvert de façon inopinée la présence systématique d'une espèce de sangsues *Helobdella stagnalis* (*Hs*) dans les BO, celle-ci n'ayant jamais été observée, après vérification, dans les MSN. Ces premiers résultats ont donc démontré que les BO (au moins ceux utilisés dans cette étude) ne sont pas des sites adaptés pour la reproduction du Crapaud vert, et pourraient être considérés comme des pièges écologiques. En revanche, seules des investigations complémentaires pourraient nous permettre de vérifier le rôle clef de l'une ou l'autre de ces deux caractéristiques pour expliquer cet effet radical sur le succès reproducteur du Crapaud vert.



Stormwater ponds as an amphibian breeding site: a case study with European green toad tadpoles

Antonin Conan^{1,2} · Nathan Dehaut² · Manfred Enstipp¹ · Yves Handrich¹ · Jonathan Jumeau²

Received: 18 March 2022 / Accepted: 7 September 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Stormwater ponds (SWPs) are built to collect and retain polluted runoff water from roads. Consequently, they are not perceived as suitable habitat for wetland species, such as many amphibians. However, given the drastic decline of wetland areas, SWPs may serve as a habitat for protected amphibian species, such as the European green toad (*Bufo viridis*). The latter species is frequently found inside these artificial ponds, but their reproductive success is unknown. We assessed the suitability of SWPs as breeding habitat for European green toads by monitoring 8 SWPs and 8 semi-natural ponds (SNPs), which served as control sites. At each site, two groups of 30 tadpoles, originating at that site, were held inside two floating enclosures that contained sediment from the respective pond. During bi-weekly monitoring, tadpoles were counted and measured, allowing to estimate growth and mortality rates. A variety of biotic and abiotic factors were studied to determine the causes of potential differences in growth and mortality rates between the two pond types. While growth rate did not differ between pond types, mortality rates were significantly greater in SWPs than in SNPs. The extremely low survival rate observed in SWPs might be explained by the considerably greater pollutant concentration in their sediment and/or by the presence of leeches, which were found exclusively inside SWPs. Implementation of management measures, such as regular draining/dredging during winter, might help to lower the pollutant concentration in the sediment and reduce the density of leeches inside SWPs, improving their suitability as habitat for amphibians.

Keywords Habitat quality · Pollution · Road ecology · Reproduction · Population sink

Introduction

Wetland areas are in decline worldwide and have experienced a loss of 64–71% since 1900 (Davidson 2014). Wetlands provide habitat for a great number of species (Zedler, 2003), and their decline leads to the loss of many taxa (Bolund and Hunhammar, 1999), contributing heavily to the global loss of biodiversity. The main threats to wetlands are the canalization of rivers/streams, intensive agriculture, and roads. The latter impacts wetlands in various ways: via (1) direct destruction (Van der Ree et al. 2011),

(2) vehicle-wildlife collisions (De Redon et al. 2015), and (3) habitat degradation through fragmentation and the emission of pollution, originating from the construction sites and traffic (Van der Ree et al. 2011), such as light (Gaston and Holt 2018), noise (Forman and Alexander 1998) and chemical pollution (Neff et al. 2005). The latter is caused by road runoff water, which contains a cocktail of chemicals, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs; Neff et al. 2005), heavy metals (Wik et al., 2008), and chlorides (from salt used during the winter; Collins and Russells 2009; Brand et al. 2010). This chemical pollution is especially problematic for aquatic ecosystems and, consequently, wetland areas (Forman and Alexander 1998; Spellerberg 1998).

To reduce/avoid the pollution of areas adjacent to road infrastructure by runoff water, road stormwater ponds have been built (EPA 2009; Le Viol et al. 2009). They are designed to prevent chronic pollution, as well as exceptional pollution events. Stormwater ponds (SWPs) at first retain the runoff water and then slowly release the surface skimmed water to the environment (EPA 2009). However, this will not

Responsible Editor: Philippe Garrigues

✉ Antonin Conan
Antonin.conan@iphc.cnrs.fr

¹ CNRS, IPHC UMR 7178, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

² Collectivité Européenne d'Alsace, CERISE, Place du Quartier Blanc, 67964, Cedex 9 Strasbourg, France

remove all pollution, so that the water that remains inside SWPs is still considered as being polluted (Snodgrass et al. 2008). Despite this, SWPs are host to a wide variety of wetland taxa that include invertebrates, fish, amphibians, reptiles, and birds (Bishop et al. 2000; Le Viol et al. 2009; Ackley and Meylan 2010), some of which are rare and protected species (Le Viol et al. 2012; Jumeau et al. 2020). The biodiversity present in SWPs is even comparable with that of natural wetlands, both in terms of community structure and species richness (Hassall and Anderson 2015; Hill et al. 2017). Amphibians are regularly observed inside SWPs (Scher and Thiéry, 2005; Le Viol et al. 2012), which are particularly attractive for pioneer species, such as green toads (*Bufo viridis*) and Natterjack toads (*Epidalea calamita*), especially upon construction (Sinsch et al. 2007; Jumeau et al. 2020).

The presence of large numbers of amphibians inside SWPs has led to the suggestion that SWPs may serve as useful habitats to restore landscape connectivity, especially in highly fragmented landscapes (Le Viol et al. 2009). However, the suitability of SWPs for amphibian habitat is unclear, since, for example, chemical pollution levels inside SWPs may prevent successful reproduction and may even be detrimental to adult survival. In such a case, SWPs may act as population sinks, and their role as an ecological trap has also been suggested (Battin 2004; Sievers et al. 2018). Assessing habitat suitability requires to study the parameters characteristic for the population inside the habitat and linking these with biotic (e.g., presence of vegetation) and abiotic factors (e.g., depth, bank slope, pollutants) (Holzer 2014; Hill et al. 2017; Kaczmarek et al. 2019; Henderson et al. 2021; Wik et al. 2008). Biotic factors, such as the presence of vegetation, which provides organic matter and shelter but also shade, might affect the growth and survival of tadpoles (positively by providing food; Cabrera-Guzmán et al. 2013; or negatively by inhibiting basking and decreasing water temperature; Wylie 1981; Browne and Edwards 2003). The presence of predators, like fish (Kats et al. 1988) and odonates (McCollum and Leimberger 1997), might also affect growth and survival of tadpoles beyond predation events, by inducing stress (Maher et al. 2013). Considering abiotic factors, the effects of pollutants in SWP sediment and water on amphibians have been studied under controlled conditions in the laboratory. At high pollutant concentrations, growth rates of tadpoles were increased (Brand et al. 2010; Leduc et al. 2016), while malformations and mortality also occurred, disrupting the reproductive success of adults (MacDonald et al. 2000; Brand et al. 2010; Dorchin and Shanas 2010; Wagner and Lötters 2013; Sievers et al. 2019). Unfortunately, these laboratory studies focused on individual pollutants and did not consider a potential “cocktail” effect of pollutants and possible interactions with biotic variables of the pond ecosystem (Snodgrass et al. 2008; Dorchin and

Shanas 2010; Sievers et al. 2018). Hence, in addition to laboratory studies, in situ investigations might be particularly suited to assess the habitat quality for a target species (Sinsch et al., 2007). Assessing the pollution effects on life history traits, such as the growth and survival rates of tadpoles (Stearns 1989; Maerz et al. 2005; Rittenhouse 2011) or on biometric variables of adults (e.g., body condition and fluctuating asymmetry in the meristic morphological traits; Conan et al. 2021; Zhelev et al. 2021) in situ is, therefore, of great importance.

In the agricultural plain of the Bas-Rhin (Alsace, France), two amphibian species are predominately found in SWPs: the European green frog (*Pelophylax* spp.; Conan et al. 2021) and the European green toad (*Bufo viridis*; Jumeau et al. 2020). The latter is a pioneer species which prefers barren and humid sites with little or no vegetation. Its natural breeding sites in the Alsace plain, along the Rhine River, have disappeared with river channeling (Michel 2013). Today, remaining breeding sites are either semi-natural ponds or SWPs (Michel 2013). Several hundred green toads, classified as endangered in France and the Alsace region (IUCN 2021), are found each year in the SWPs of the Bas-Rhin plain (Michel et al. 2017; Berna et al. 2018, 2021; Jumeau et al. 2020). However, little is known about the viability of these populations.

Research objectives

The present study investigates the growth rate and survival of European green toad tadpoles (*Bufo viridis*) in situ, contrasting roadside stormwater ponds (SWPs) with semi-natural ponds (SNPs) that served as control sites. We hypothesized that (1) tadpoles will grow faster in the polluted SWPs, but survival rate will be lower than in semi-natural ponds; (2) differences in growth and survival rate between pond types are associated with specific characteristics at these sites (i.e., biotic and/or abiotic factors). To test these hypotheses, we placed tadpoles into floating enclosures inside SWPs and SNPs and measured growth and survival rates until tadpoles underwent metamorphosis.

Materials and methods

Study area and pond sites

The study was carried out in the agricultural plain of Bas-Rhin, Alsace, NE of France (for details see: Jumeau et al. 2020 and Conan et al. 2021) during the spring and summer of 2020. With the complete damming of the Rhine River during the twentieth century, the natural spawning habitat for European green toads perished in Alsace, and the species

is currently confined to breed in semi-natural ponds (SNPs). We use these spawning sites in SNPs as controls for the SWPs, since they are physically separated from road infrastructure and their polluted runoff water (including quarry ponds and off-road retention basins), as well as from ponds created specifically for green toads. Sites with a known or suspected occurrence of green toads were prospected between May 4th and 26th, 2020. Out of 35 prospected sites (15 SWPs and 20 SNPs), 16 sites (8 SWPs and 8 SNPs) were selected based on the abundance of eggs and/or tadpoles and were monitored throughout the study (Fig. 1). All selected SWPs were artificial ponds with a concrete slope averaging $31.8 \pm 0.9^\circ$ (values are means \pm SEM) and an average depth of 91.3 ± 6.4 cm. All SNPs had a clay slope averaging $28.8 \pm 6.7^\circ$ and an average depth of 36.9 ± 57 cm. Light conditions were similar at all sites with a full exposure to the sun.

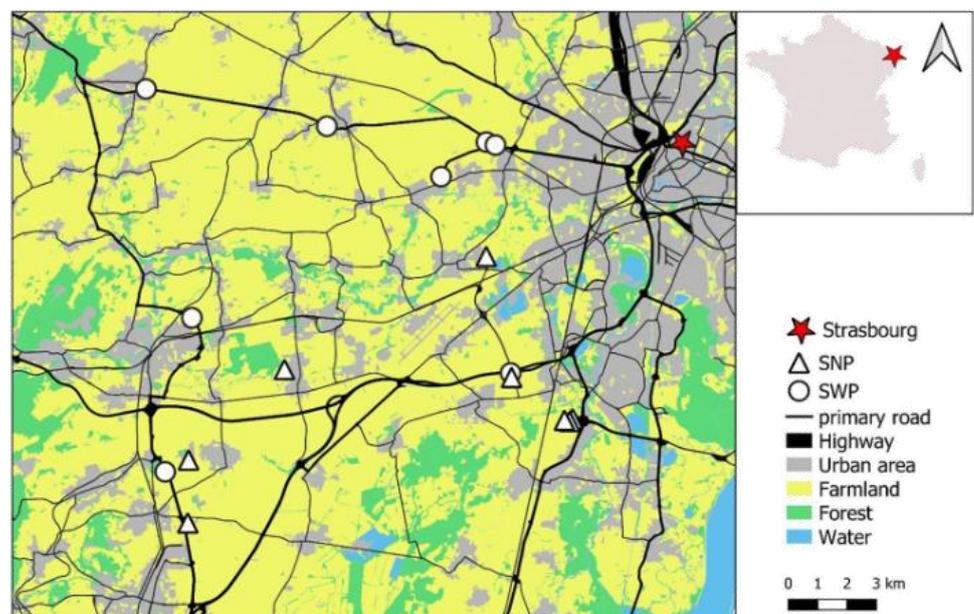
At each site, biotic variables (e.g., presence of vegetation, such as helophytes, hydrophytes, and algae; presence of fish and invertebrates, such as odonates and leeches) and design characteristics (e.g., type and dimensions of the slope, water depth) were measured using methods adapted from Jumeau et al. (2020). The pond design and biotic factors were evaluated visually during the first visit of each site and were supplemented with information from road managers. The presence of targeted animals (fish, Odonata and *Helobdella stagnalis* leeches) was monitored throughout the study. While the present leech species is not a known predator or parasite of amphibians, we found several individuals attached to adult toads and to the surface of our enclosures at site and decided to include leech presence in our evaluation. Acidity and water temperature of all ponds were measured

bi-weekly with a pH meter/thermometer throughout tadpole monitoring (pH55 digital, Milwaukee®, Brookfield, USA; calibrated before each measurement day). The turbidity (turbid or clear) was also evaluated bi-weekly by a visual check (ability/inability to see the pond bottom). Between the 25th of June and the 15th of July 2020, water and sediment of all sites were sampled for pollutant analysis (e.g., hydrocarbons, heavy metals, salt). All chemical analyses were conducted by “Eurofins Scientific France” (Benfeld, France).

Experimental design

Between May 13th and June 1st, 2020, tadpoles were caught with fine-mesh nets during daylight hours. Only stage 2 individuals were selected (i.e., presence of a spiracle but absence of hindlimbs, see the definition for developmental stages in Fig. 2). For each site, 60 individuals originating from that site were moved into 2 floating enclosures (a box with wire mesh sides and a float; volume: 44 L; size: $55.5 \times 39.5 \times 29.5$ cm; Fig. 3; 30 tadpoles per enclosure), which was attached to shoreline vegetation or man-made structures. This setting allowed us to study the growth and survival of tadpoles in situ, while preventing the escape/predation of individuals (Cabrera-Guzmán et al. 2013; Yagi and Green 2016). The chosen mesh (1 mm) allowed for water exchange, while excluding fish and invertebrate predators (Fig. 3). Sediment collected simultaneously at the capture site was added to the bottom of the enclosures to provide tadpoles with the same substrate as found outside the enclosures. The tadpoles were added once the sediment had settled down into the bottom of the enclosure (after approximately 5 min). Such manipulation should not have led to

Fig. 1 Location of monitored sites



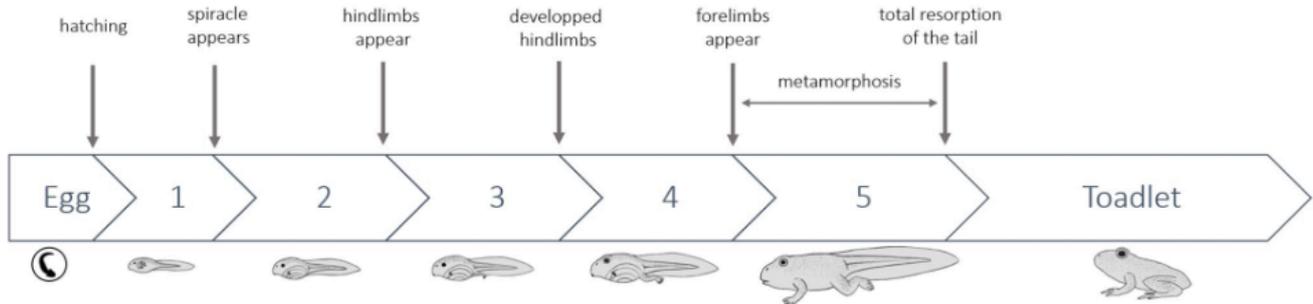


Fig. 2 Definition of the five developmental stages of amphibian tadpoles (according to Miaud and Muratet 2018). Stage 1: directly after hatching; stage 2: after the spiracle appears; stage 3: after the hindlimbs appear; stage 4: when the hindlimbs are well developed;

stage 5: after the forelimbs appear; stage toadlet: when the individual is fully metamorphosed with a total resorption of the tail and begins its terrestrial life

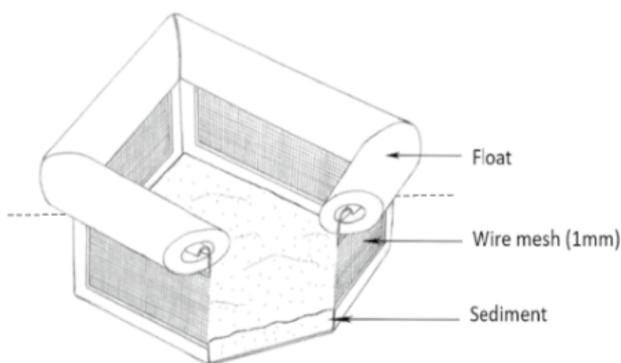


Fig. 3 Schematic view of the floating enclosure. Dimensions, height below the float line (indicated with a dashed line): 18.5 cm, long side: 55.5 cm, short side 39.5 cm, height of sediment: 2 cm; volume of free water above the sediment: 40 L; the dotted line represents the water surface

a resuspension of sediment pollutants into the water. As Walaszek (2018) showed, only a physico-chemical change (e.g., pH) allows a resuspension of these pollutants into the water, when pollutants, especially metals, are retained in the sediment by sorption.

Twice a week (May 13th to August 31st, 2020), tadpoles were briefly removed from the enclosures and placed in a small plastic tank that had a 30-cm ruler (with 1-mm gradations) taped to its bottom. This ruler served as a measuring scale, used to determine tadpole size from pictures taken with a digital camera (Tough 5, Olympus, Tokyo, Japan). We used ImageJ software (v1.52a, Development Team 2020), to measure tadpole size (from the snout to the base of the tail). Survival rate was calculated from the number of remaining tadpoles during each check-up. Since it was impossible for tadpoles to escape the enclosures, and we also observed that cadavers of dead tadpoles decomposed rapidly and/or were eaten by their conspecifics, any disappearance from an enclosure was treated as a case of mortality. When tadpoles

reached stage 5 (all four legs well developed, see Fig. 2), a float (a piece of wood) was added to the enclosures, which allowed tadpoles to leave the water and avoid drowning. At that point of the study, the water depth at enclosure sites was well below the top of the enclosures (Fig. 3), preventing escape. During the bi-weekly check-ups, fully metamorphosed individuals (end of stage 5, fully resorbed tail) were released after a picture was taken, while the less developed tadpoles were returned to the enclosures. These individuals (fully metamorphosed/released and less developed tadpoles) were considered as “survivors” in our analyses. To investigate survival rate, remaining individuals inside the enclosures at all sites were monitored until they had fully metamorphosed. Considering the investigation of growth rate, tadpoles were measured until the first individuals reached stage 5, because size decreases thereafter (Miaud and Muratet, 2018). The average monitoring time for each site was 53.8 ± 4.3 days (28 monitoring sessions).

To avoid the spread of pathogens between sites, we applied the “Miaud protocol” (Miaud, 2014), using Virkon® (DUPONT, Wilmington, USA) to disinfect all equipment, including the rubber boots, before visiting a site. The present study was authorized by the Ministère de la Transition Ecologique and the Prefecture of Bas-Rhin (2019-DREAL-EBP-0030).

Statistical analyses

We used a mixed linear model (LMM; with an a posteriori Box-Cox transformation of size to obtain a Gaussian distribution), to compare tadpole size between SWPs and SNPs throughout the study period, using replicate and site as random effects (using packages “nmlm” and “lme4” in R; Pinheiro and Bates 2000; Bates et al. 2015). Environmental parameters (biotic/abiotic) were included as covariates to test for a relationship with potential differences in tadpole size. Collinear environmental parameters were identified

using a principal component analysis (PCA) and removed with Spearman tests, before running the LMM. The most parsimonious model was selected by a BIC-bidirectional elimination procedure.

The comparison of survival rate was based on the Kaplan–Meier survival analysis and a log-rank test between SWPs and SNPs using the number of dead individuals at each session (Mantel 1966). Thereafter, as for tadpole size, a LMM was used to identify environmental parameters that might explain potential differences in survival rate between pond types.

Given the small number of replicates in our study (i.e., 8 SWPs and 8 SNPs), no significant relationship between any of the biotic/abiotic factors and tadpole growth/survival was found with the modelling approach. Hence, we decided to at least determine the specific characteristics of the abiotic and biotic environments of SWPs and SNPs. To this end, we conducted a factorial analysis of the mixed data (FAMD), which allows to test a data set containing both quantitative and qualitative variables; Fig. 5; Table 1), using packages “factoextra” and FactoMineR in R; Lê et al. (2008); Kasambara and Mundt (2017).

Table 1 Chemical variables measured in ponds

| Group | Variables | SWP | | | SNP | | | |
|---|--|-----------------|--------------|--------|-------|-------|-------|------|
| | | Mean | Min | Max | Mean | Min | Max | |
| Water quality | Turbidity | Turbid | | | Clear | | | |
| | pH | 8.7 | 8.1 | 10.6 | 8.4 | 7.9 | 8.8 | |
| | Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | 165.8 | 114.0 | 320.0 | 383.9 | 174.0 | 526.0 | |
| | Salinity (mg/L) | 191.3 | 100.0 | 360.0 | 321.4 | 150.0 | 530.0 | |
| Sediment quality | Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | 228.9 | 127.0 | 314.0 | 311.6 | 84.0 | 532.0 | |
| Pollutant concentration in water (mg/L) | Suspended materials | 69.1 | 5.6 | 240.0 | 260.1 | 5.6 | 830.0 | |
| | Arsenic | 5.5 | 5.0 | 9.0 | 9.7 | 5.0 | 27.4 | |
| | Cadmium | 2.1 | 1.0 | 10.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| | Chromium | 5.4 | 5.0 | 8.1 | 7.7 | 5.0 | 16.9 | |
| | Copper | 12.6 | 5.0 | 43.4 | 9.1 | 5.0 | 21.7 | |
| | Mercury | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | |
| | Nickel | 6.4 | 5.0 | 16.5 | 7.9 | 5.0 | 17.7 | |
| | Phosphorus | 0.3 | 0.1 | 1.1 | 0.6 | 0.1 | 2.1 | |
| | Lead | 5.7 | 2.0 | 27.2 | 6.2 | 2.0 | 26.1 | |
| | Zinc | 85.4 | 12.3 | 476.0 | 34.9 | 8.6 | 92.0 | |
| | Sum 7 PCB | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | |
| | PAH | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.30 | 0.2 | 0.9 | |
| | Pollutant concentration inside sediment (mg/kg DM ¹) | Arsenic | 9.6 | 6.6 | 11.9 | 7.9 | 1.8 | 16.6 |
| | | Cadmium | 0.6** | 0.4 | 0.9 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| Chromium | | 35.7* | 24.8 | 50.0 | 23.5 | 15.0 | 45.3 | |
| Copper | | 132.1*** | 71.9 | 182.0 | 13.8 | 5.0 | 21.8 | |
| Mercury | | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | |
| Nickel | | 28.6** | 18.8 | 36.9 | 18.8 | 12.3 | 24.5 | |
| Phosphorus | | 1185.9 | 787.0 | 1430.0 | 469.9 | 212.0 | 595.0 | |
| Lead | | 37.3*** | 20.4 | 44.6 | 11.7 | 5.0 | 26.8 | |
| Zinc | | 846.0*** | 96.3 | 2530.0 | 46.3 | 16.5 | 79.0 | |
| Sum 7 PCB ² | | 0.006 | 0.006 | 0.006 | 0.006 | 0.006 | 0.006 | |
| PAH ³ | 2.9 | 1.0 | 5.3 | 0.2 | 0.03 | 0.6 | | |

Factors with a sufficiently large sample size that were retained after AFMD analysis are highlighted in bold

The chemical analysis was conducted by “Eurofins Scientific France” (Benfeld, France), which specializes in chemical pollutant analysis

Values in bold differ significantly between pond types; results obtained with a Wilcoxon test (* for $p < 0.05$, ** for $p < 0.001$ and *** for $p < 0.0001$)

¹Dry Mass

²Polychlorinated biphenyls; presented is the total concentration of 7 PCBs tested (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, and 180)

³Polycyclic aromatic hydrocarbon

Finally, we used the Wilcoxon test to compare pollutant concentrations in the water and the sediment between SWPs and SNPs.

Statistical analyses were conducted using R (v3.6.1, Rstudio v1.2.5033, R Core Team 2022) and GraphPad Prism 8.2.1 (San Diego, CA, USA). All results are presented as mean values \pm SEM with a statistical significance threshold of 5%.

Results

We used a total of 960 tadpoles for the study, which were split into groups of 30 per enclosure; each of the 16 sites (8 SWPs and 8 SNPs) received two enclosures.

Hypothesis 1

Size

Tadpole body size did not differ between SWPs and SNPs during the monitored period (from stage 2 until the start of metamorphosis/stage 5, after 31.6 ± 2.5 days of monitoring; $\chi^2=0.22$, $d=1$, $p=0.64$; Fig. 4A). In addition, the average developmental duration until reaching stage 5 was nearly

identical in tadpoles of the SWPs (32.3 ± 1.7 days) and the SNPs (31.0 ± 3.1 days).

Survival

The survival ratio was extremely low in the SWPs (0.63%; 3/480 survivors) and differed significantly from that in the SNPs (21.11%; 103/480 survivors; $\chi^2=96.55$, $d=1$, $p<0.001$; Fig. 4B). Moreover, we observed that the mortality levelled off in SNPs from day 35 onward (i.e., when the majority of tadpoles had reached stage 5), while in the SWPs mortality continued to increase (Fig. 4B).

Hypothesis 2

Our factor analysis (FAMD) found considerable differences in environmental factors prevailing at the two pond types. SWPs were characterized by turbid water, the presence of algae and leeches (*Helobdella stagnalis*, which managed to move into the enclosures), the absence of helophytes and a greater depth than found in the SNPs (~2.5-fold; Fig. 5B). By contrast, in the SNPs water was clear; algae and leeches were absent; while helophytes were abundant. While our LMM analysis could not determine which environmental factor(s) was/were responsible for the difference in tadpole

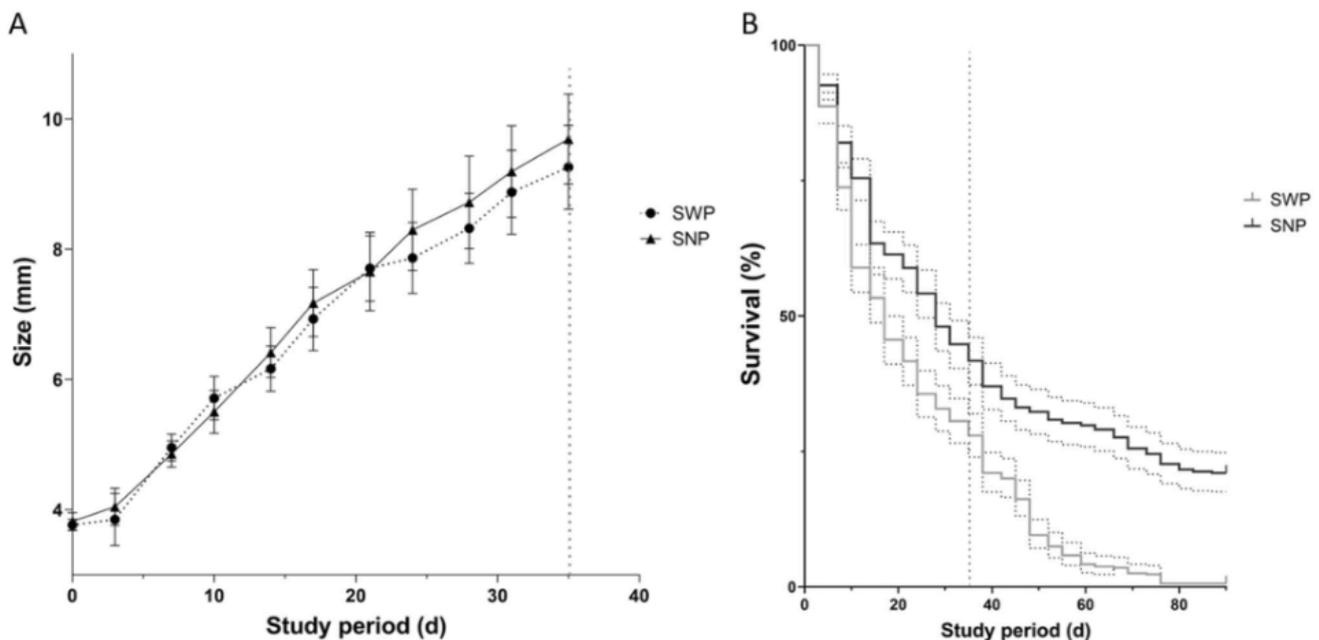


Fig. 4 **A** Body size development (snout to base of the tail) of European green toad tadpoles during the study period (35 days). Measurements were discontinued at the start of stage 5 (vertical dash line) because of the typical size reduction during metamorphosis. However, the study period continued for survival analysis. Body size of tadpoles did not differ between SWPs (black circles and dashed line)

and SNPs (black triangle and solid line; $\chi^2=0.22$, $d=1$, $p=0.64$); **(B)** the Kaplan–Meier survival curve showed a lower survival of tadpoles in SWPs (gray line) than in SNPs (black line; $\chi^2=96.55$, $d=1$, $p<0.001$) throughout the study period. The vertical dashed gray line in A and B represents the time when the first tadpoles reached stage 5 (at ~35 days)

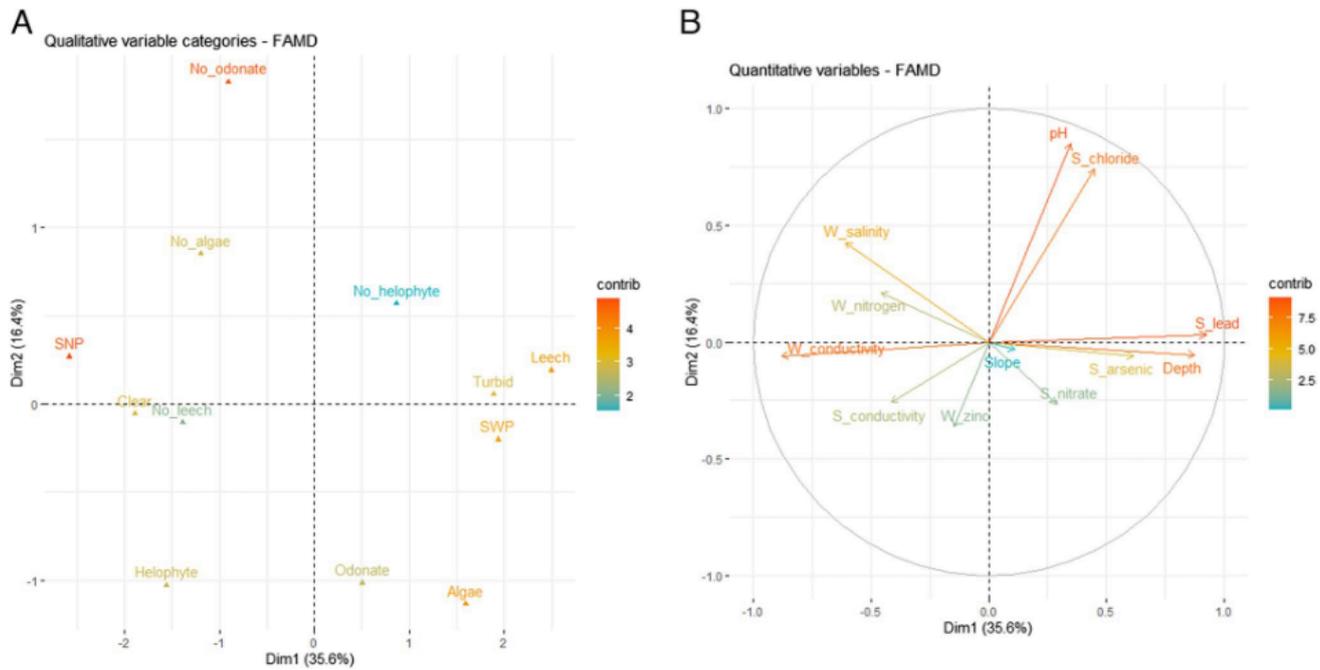


Fig. 5 Factor analysis of mixed data (FAMD) for factors recorded to characterize monitored sites (SWPs and SNPs). Red factors are well represented by the FAMD. Factors that appear close to each other are considered as being correlated. Categorical factors are indicated in

panel A, while panel B shows numerical factors. SWPs were characterized by the presence of algae and leeches, a greater depth, and a high lead concentration in the sediment, while water conductivity was greater at the SNPs

survival rate between pond types, the FAMD clearly could identify environmental differences.

Pollutant levels in the water did not differ between SWPs and SNPs ($p > 0.05$; Table 1) However, the concentrations of nitrogen, cadmium, chromium, copper, nickel, zinc and lead in the bottom sediment of the ponds were significantly higher in SWPs (on average by 377%) than in SNPs ($p < 0.05$; Table 1).

Discussion

The majority of studies focusing on amphibian larval development have been conducted under controlled conditions in the laboratory (Snodgrass et al. 2008; Dorchin and Shanas 2010; Sievers et al. 2018). By contrast, the in situ approach has rarely been used with amphibians, particularly for the larval stages (Govindarajulu and Anholt 2016). This is rather unfortunate, since this approach allows to consider the impact of other factors, like the abiotic (e.g., temperature, pollution) and/or biotic (e.g., predation) environment, on the development and survival of individuals. We believe that both approaches can complement each other to provide a clearer picture. Hence, we used the in situ approach to study how breeding in roadside stormwater ponds (SWPs) may impact the larval development and survival in an endangered species, the European green toad.

Our study shows the important consequences that breeding inside SWPs has for green toads. Tadpoles inside these ponds had virtually no chance to survive until completion of metamorphosis (survival ratio: 0.63%). Hence, our results support our first hypothesis that tadpole survival is lower at SWPs, when compared with SNPs (Fig. 4B). This is also in agreement with previous studies that reported lower survival rates of tadpoles in experimental set-ups that reconstructed SWP conditions in the laboratory (e.g., mesocosms; Snodgrass et al. 2008; Dorchin and Shanas 2010; Sievers et al. 2018). The near absence of any reproductive success in the SWPs of our study suggests that they might act as a population sink for green toads. By contrast, more than half the European green toad population of the study area is currently found in SWPs, and the population seems to be increasing (Berna et al., 2021). Hence, some of the factors that led to the low survival rate in our study might be different in other SWPs that were not investigated and/or these factors might vary over time within SWPs, so that conditions are better in some years than others, leading to differences in reproductive success.

We also found that tadpole body size throughout the study period did not differ between SWPs and SNPs (Fig. 4A). This contrasts with the suggestion voiced in the literature, that a higher mortality during larval development will lead to an increased growth rate in surviving individuals (reduced food competition at a lower

tadpole density) and, consequently, a larger body-size of individuals at a given developmental stage (Gillespie 2002; Browne et al. 2003). However, one should take into account that inherent differences in growth rate between individuals might also exist. The absence of differences in growth rate between individuals within the SWPs and SNPs we found in our study might also be the consequence of differences in food availability between pond types. For example, Martins and colleagues suggested that nutrients required for tadpole development (e.g., plant protein from algae) are less available inside SWPs than in natural ponds (Martins et al. 2013). Unfortunately, we did not measure food availability and our experimental enclosures might have exacerbated such potential differences by altering the movement of suspended algae. Though, the latter is rather unlikely given the used netting mesh size and would have affected both pond types the same. There has also been the suggestion that pollutants positively affect growth rate, so that growth rate is accelerated at polluted sites (Brand et al. 2010; Leduc et al. 2016). Again, we did not find evidence for this in our study. However, the mechanisms of such growth accelerations are complex, and they may also be the result of evolutionary changes that take place over multiple generations. Unfortunately, we could not investigate individual size differences at metamorphosis, since only three individuals out of 480 survived until metamorphosis in the SWPs.

We found no differences in the concentrations of a number of common pollutants in the water of SWPs and SNPs (Table 1). This is also true for salt, a classic pollutant, found in the vicinity of roads in Alsace, where it is used during winter to keep roads free of ice. By contrast, pollutant concentrations in the sediment were significantly higher in SWPs when compared with those found in the SNPs (Table 1). This concerned particularly six elements (Cd, Cr, Cu, Ni, Zn, Pb), whose accumulation inside the sediment of SWPs was on average five times that of SNP sediment. The lower pollutant concentrations in the water of SWPs, when compared with concentrations found in the sediment, highlight the effectiveness of SWPs in cleaning road runoff water through the double principle of water clarification and settlement (EPA 2009). However, this questions the relevance of ex situ studies focusing on the effects of pollution on amphibian larval development using only water samples from SWPs, rather than also including sediment (see Dorchin and Shanas 2010). Nevertheless, a number of effects on larval development were found in the study by Dorchin and Shanas (2010): slowed growth and development, malformations, and behavioral changes in the green toad. Since runoff water was collected at different periods in that study (including a first runoff, when the pond surface may have not been skimmed sufficiently yet) pollutant levels in the water were higher than in the current study.

A negative impact of sediment pollution on the tadpole survival of various other amphibian species has been demonstrated, e.g., *Anaxyrus americanus* or *Lithobates pipiens* (Snodgrass et al. 2008; Gallagher et al. 2014; Leduc et al. 2016). However, in all these studies, sediment pollution was always associated with alterations in growth rate and body size, which contrasts with our findings. This raises the question which other factor(s), specific to SWPs, might have led to the great mortality of tadpoles that we observed?

One further difference between the SWPs and SNPs that we found, apart from sediment pollution levels, was the presence of leeches (*Helobdella stagnalis*) in the SWPs, while they were absent in the SNPs. However, to the best of our knowledge, there is no report in the literature of this leech species acting as a parasite or predator for tadpoles of green toads or any other amphibian species. However, this leech species has been found attached to adult frogs and newts (Zimić 2015; Stark et al. 2017) and the impact of other leech species on amphibian larvae (i.e., increased mortality) has been demonstrated (Berven and Boltz 2001). It is also noteworthy that we observed these leeches (*Helobdella stagnalis*) attached to several adult European green toads during our regular pond visits (with typically up to 20 leeches per adult). Unfortunately, little is known about *Helobdella stagnalis* and their prevalence in the SWPs, especially in relation to season, year of pond construction, and frequency of their drainage. Such factors might explain the observed increase in the local European green toad population during the first years after SWP construction (when leeches are not yet present) and may also explain the persistence of a sizeable local population (frequent drainage will reduce leech prevalence) (Michel et al. 2017).

The Kaplan–Meier survival curve shows that tadpole mortality in SWPs continued to increase during metamorphosis, while it started to level off in SNPs. This might be explained by the following three, non-exclusive, considerations: (1) Leech predation might have intensified during tadpole metamorphosis, since the resorption of the tail might have decreased their capacity to escape, making them more susceptible to leech predation. (2) The intensification of leech predation might have also been the consequence of the relative increase in the number of leeches (i.e., a change in the ratio of the numbers of leeches versus surviving tadpoles). (3) Finally, we cannot rule out a greater vulnerability of tadpoles to the effects of pollutants during metamorphosis. Effects of metals (e.g., Cd, Cu, Pb) on thyroid hormones of amphibians have been demonstrated and might impact the metamorphosis of individuals that were exposed to these pollutants during development (Thambirajah et al. 2019; Zhang et al. 2019).

To further evaluate the potential impact of these leeches on tadpole survival and their possible impact on adults, a dedicated study under controlled conditions is of great

importance. It is equally important to study the potential effects of dredging frequency on tadpole survival, as dredging will reduce sediment contamination and also the prevalence of *Helobdella stagnalis*. Complete drainage and dredging of SWPs may facilitate their return to an initial state, i.e., a site void of vegetation (pioneer site) and pollution, similar to the state of the SNPs. However, such pond management could change the composition of current amphibian communities, leading to a disappearance of vegetation-friendly species and a colonization through pioneer species, such as the European green toad (Jumeau et al., 2020). Finally, dredging of existing SWPs may have the same effect as the creation of new SWPs: the appearance of favorable reproduction sites, leading to a better survival of larvae and, consequently, an increase of recruitment into the population for several years, before the return of pollutants and parasites/predators.

Lastly, while our finding of a strong reduction in larval survival inside SWPs supports the notion that, in the long term, these artificial ponds might become a population sink for green toads, it is important to note that SWPs currently represent more than half of all known breeding sites of this species in the Bas-Rhin Department (Alsace, France). We, therefore, suggest that management measures are of great importance for these ponds (e.g., regular dredging outside the amphibian breeding period) to maintain their suitability for toad reproduction and to avoid extinction.

Conclusions

Our study found that tadpole survival of European green toads in artificial stormwater ponds is low, so that in the long run, these sites might become a population sink for this species in Bas-Rhin, unless specific monitoring and management of sediment quality is implemented. The survival of tadpoles in SWPs we recorded in our study is too low to ensure maintenance of a healthy population. Further studies under controlled conditions are required to isolate the factor(s) (e.g., sediment pollution, presence of leeches) responsible for such low tadpole survival in SWPs, so that meaningful management measures can be implemented (e.g., frequent sediment removal). In addition, it would be interesting to extend this study to adult toads, so that the survival rates of each age class can be determined. The latter is a pre-requisite for assessing the demographic trends of European green toads in Bas-Rhin. This is of great relevance, since the majority of breeding sites in that region, as in many other industrialized regions and alluvial plains, is currently located in roadside stormwater ponds.

Author contribution All the authors approved this version of the manuscript for publication. They agreed to be accountable for the aspects of

the work that they conducted and will ensure that any questions related to the accuracy or integrity of any part of their work are appropriately investigated and resolved. AC, YH, and JJ conceived the study and designed the methods; AC and ND collected the data; AC and JJ analyzed the data; AC drafted the manuscript with contribution from JJ, ME, ND, and YH.

Funding This study was conducted within the framework of the CERISE project and was funded by the French Minister of Ecology (DREAL Grand-Est), the Region Grand-Est, and the European collectivity of Alsace (CeA). The funders had no role in any aspect of the study and agreed to its publication.

Data availability The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon request.

Declarations

Ethical approval All experimental protocols for this study complied with national legislation and were approved by the appropriate authorities: "Arrêté Préfectoral n° 2019-DREAL-EBP-0030".

Consent to participate All the authors participated in the writing of this manuscript.

Consent for publication All the authors have approved the submission to "Environmental Science and Pollution Research."

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Ackley JW, Meylan PA (2010) Watersnake Eden: use of stormwater retention ponds by mangrove salt marsh snakes (*Nerodia clarkii compressicauda*) in urban Florida. *Herpetol Conserv Biol* 5:17–22
- Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48
- Battin J (2004) When good animals love bad habitats: ecological traps and the conservation of animal populations. *Conserv Biol* 18:1482–1491
- Berna A, Gosselin F, Thiriet J, Vacher J-P (2018) Evolution de la population du Crapaud vert en Alsace, p 16
- Berna A, Fizesan A, Gosselin F, Thiriet J (2021) Plan Régional d'Actions Crapaud vert; Action n°3: Suivre les indicateurs d'évolution des populations des habitats et de leur état de conservation, Rapport 2020:16
- Berven KA, Boltz RS (2001) Interactive effects of leech (*Desseroberdella picta*) infection on wood frog (*Rana sylvatica*) tadpole fitness traits. *Copeia* 2001:907–915
- Bishop CA, Struger J, Shiroye LJ, Dunn L, Campbell GD (2000) Contamination and wildlife communities in stormwater detention ponds in Guelph and the Greater Toronto Area, Ontario, 1997 and 1998 part II — contamination and biological effects of contamination. *Water Qual Res J* 35:437–474
- Bolund P, Hunhammar S (1999) Ecosystem services in urban areas. *Ecol Econ* 29:293–301
- Brand AB, Snodgrass JW, Gallagher MT, Casey RE, Van Meter R (2010) Lethal and sublethal effects of embryonic and larval exposure of *Hyla versicolor* to stormwater pond sediments. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:325–331

- Browne RK, Edwards DL (2003) The effect of temperature on the growth and development of the endangered green and golden bell frog (*Litoria aurea*). *J Therm Biol* 28:295–299
- Browne R, Pomeroy M, Hamer A (2003) High density effects on the growth, development and survival of *Litoria aurea* tadpoles. *Aquaculture* 215:109–121
- Cabrera-Guzmán E, Crossland MR, Shine R (2013) Competing tadpoles: Australian native frogs affect invasive cane toads (*Rhinella marina*) in natural waterbodies. *Austral Ecol* 38:896–904
- Collins SJ, Russell RW (2009) Toxicity of road salt to Nova Scotia amphibians. *Environ Pollut* 157:320–324
- Conan A, Jumeau J, Dehaut N, Enstipp M, Georges J-Y, Handrich Y (2021) Can road stormwater ponds be successfully exploited by the European green frog (*Pelophylax sp.*)? *Urban Ecosystems* 2021:1–13
- Davidson NC (2014) How much wetland has the world lost? Long-term and recent trends in global wetland area. *Mar Freshw Res* 65:934
- de Redon L, Le Viol I, Jiguet F, Machon N, Scher O, Kerbiriou C (2015) Road network in an agrarian landscape: potential habitat, corridor or barrier for small mammals? *Acta Oecol* 62:58–65
- Dorchin A, Shanas U (2010) Assessment of pollution in road runoff using a *Bufo viridis* biological assay. *Environ Pollut* 158:3626–3633
- EPA (2009) Stormwater wet pond and wetland management guidebook. EPA 833-B-09-001. EPA, Washington, D.C., U
- Forman RTT, Alexander LE (1998) Roads and their major ecological effects. *Annu Rev Ecol Syst* 29:207–238
- Gallagher MT, Snodgrass JW, Brand AB, Casey RE, Lev SM, Van Meter RJ (2014) The role of pollutant accumulation in determining the use of stormwater ponds by amphibians. *Wetlands Ecol Manage* 22:551–564
- Gaston KJ, Holt LA (2018) Nature, extent and ecological implications of night-time light from road vehicles. *J Appl Ecol* 55:2296–2307
- Gillespie GR (2002) Impacts of sediment loads, tadpole density, and food type on the growth and development of tadpoles of the spotted tree frog *Litoria spenceri*: an in-stream experiment. *Biol Cons* 106:141–150
- Govindarajulu PP, Anholt BR (2016) Interaction between biotic and abiotic factors determines tadpole survival rate under natural conditions. *Ecoscience* 2006, 13:413–421
- Hassall C, Anderson S (2015) Stormwater ponds can contain comparable biodiversity to unmanaged wetlands in urban areas. *Hydrobiologia* 745:137–149
- Henderson KA, Murdock JN, Lizotte RE (2021) Water depth influences algal distribution and productivity in shallow agricultural lakes. *Ecology* 14:e2319
- Hill MJ, Biggs J, Thornhill I, Briers RA, Gledhill DG, White JC, Wood PJ, Hassall C (2017) Urban ponds as an aquatic biodiversity resource in modified landscapes. *Glob Change Biol* 23:986–999
- Holzer KA (2014) Amphibian use of constructed and remnant wetlands in an urban landscape. *Urban Ecosystems* 17:955–968
- IUCN (2021) IUCN red list of threatened species, Summary Statistics <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>. Accessed on 13.12.2021
- Jumeau J, Lopez J, Morand A, Petrod L, Burel F, Handrich Y (2020) Factors driving the distribution of an amphibian community in stormwater ponds: a study case in the agricultural plain of Bas-Rhin. *France European Journal of Wildlife Research* 66:33
- Kaczmarek M, Szala K, Kloskowski J (2019) Early onset of breeding season in the green toad *Bufo viridis* in Western Poland. *Herpetozoa* 32:109
- Kassambara A, Mundt F (2017) Package ‘factoextra’ R topics documented, p 84
- Kats LB, Petranksa JW, Sih A (1988) Antipredator Defenses and the Persistence of Amphibian Larvae With Fishes. *Ecology* 69:1865–1870
- Lê S, Josse J, Husson F (2008) FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J Stat Softw* 25:1–18
- Le Viol I, Mocq J, Julliard R, Kerbiriou C (2009) The contribution of motorway stormwater retention ponds to the biodiversity of aquatic macroinvertebrates. *Biol Cons* 142:3163–3171
- Le Viol I, Chiron F, Julliard R, Kerbiriou C (2012) More amphibians than expected in highway stormwater ponds. *Ecol Eng* 47:146–154
- Leduc J, Echaubard P, Trudeau V, Lesbarrères D (2016) Copper and nickel effects on survival and growth of northern leopard frog (*Lithobates pipiens*) tadpoles in field-collected smelting effluent water. *Environ Toxicol Chem* 35:687–694
- MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA (2000) Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol* 39:20–31
- Maerz JC, Brown CJ, Chapin CT, Blossey B (2005) Can secondary compounds of an invasive plant affect larval amphibians? *Funct Ecol* 19:970–975
- Maher JM, Werner EE, Denver RJ (2013) Stress hormones mediate predator-induced phenotypic plasticity in amphibian tadpoles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280:20123075
- Mantel N (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 50:163–170
- Martins FMS, Oom M, do M, Rebelo R, Rosa GM (2013) Differential effects of dietary protein on early life-history and morphological traits in natterjack toad (*Epidalea calamita*) tadpoles reared in captivity. *Zoo Biol* 32:457–462
- McCollum SA, Leimberger JD (1997) Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia* 1997 109:4 109:615–621
- Miaud C, Muratet J (2018) Identifier les œufs et les larves des amphibiens de France. *Quae ed*
- Miaud C (2014) Protocole d’hygiène pour le contrôle des maladies des amphibiens dans la nature à destination des opérateurs de terrain, p 7
- Michel V (2013) Le Crapaud vert (*Bufo viridis*) en Alsace: statut, menaces et plan régional d’actions. *Ciconia* 37:72–80
- Michel V, Gosselin F, Fizesan A (2017) Convention pluriannuelle d’objectifs : Suivi des populations de crapaud vert, *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) dans le Bas-Rhin, p 79
- Neff JM, Stout SA, Gunster DG (2005) Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: identifying sources and ecological hazard. *Integr Environ Assess Manag* 1:22
- Pinheiro JC, Bates DM (2000) Linear mixed-effects models: basic concepts and examples. *Mixed-effects models in S and S-Plus*, pp 3–56
- van der Ree R, Jaeger JAG, van der Grift E, Clevenger A (2011) Effects of roads and traffic on wildlife populations and landscape function: road ecology is moving toward larger scales. *Ecol Soc* 16:48
- Rittenhouse TAG (2011) Anuran larval habitat quality when reed canary grass is present in wetlands. *J Herpetol* 45:491–496. <https://doi.org/10.1670/10-216.1>
- Scher O, Thiéry A (2005) Odonata, Amphibia and environmental characteristics in motorway stormwater retention ponds (Southern France). *Hydrobiologia* 551:237–251
- Sievers M, Parris KM, Swearer SE, Hale R (2018) Stormwater wetlands can function as ecological traps for urban frogs. *Ecol Appl* 28:1106–1115
- Sievers M, Hale R, Parris KM, Melvin SD, Lanctôt CM, Swearer SE (2019) November 25. Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: a meta-analysis. *Sci Total Environ*, p 693
- Sinsch U, Leskovar C, Drobig A, König A, Grosse W-R (2007) Life-history traits in green toad (*Bufo viridis*) populations: indicators of habitat quality. *Can J Zool* 85:665–673

- Snodgrass JW, Casey RE, Joseph D, Simon JA (2008) Microcosm investigations of stormwater pond sediment toxicity to embryonic and larval amphibians: variation in sensitivity among species. *Environ Pollut* 154:291–297
- Spellerberg IF (1998) Ecological effects of roads and traffic: a literature review. *Glob Ecol Biogeogr Lett* 7:317–333
- Stark T, Brouwer D, Ploeg R, Lenders T (2017) First record of phoresy or possible parasitism of the fresh water leech *Helobdella stagnalis* (Linnaeus, 1758) (*Rhynchobdellida: Glossiphoniidae*) on *Lissotriton helveticus* (Razoumowsky, 1789) (Caudata: *Salamandridae*) in the Netherlands. *Herpetology Notes* 10:717–719
- Stearns SC (1989) Trade-offs in life-history evolution. *Funct Ecol* 3:259
- Thambirajah AA, Koide EM, Imbery JJ, Helbing CC (2019) Contaminant and environmental influences on thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. *Frontiers in Endocrinology*, vol 10
- Wagner N, Lötters S (2013) Effects of water contamination on site selection by amphibians: experiences from an arena approach with European frogs and newts. *Arch Environ Contam Toxicol* 65:98–104
- Walaszek M (2018) Dynamique des flux de micropolluants et mécanismes de dépollution des rejets pluviaux urbains stricts à travers une technique alternative : approche multi-échelles par des méthodes expérimentale et numérique. PhD Dissertation, Université de Strasbourg, p 388
- Wik A, Lycken J, Dave G (2008) Sediment quality assessment of road runoff detention systems in Sweden and the potential contribution of tire wear. *Water Air Soil Pollut* 194:301–314
- Wylie SR (1981) Effects of basking on the biology of the canyon treefrog. PhD Dissertation, Arizona State University, *Hyla arenicolor* Cope, p 121
- Yagi KT, Green DM (2016) Mechanisms of density-dependent growth and survival in tadpoles of Fowler's toad. *Anaxyrus Fowleri: Volume Vs Abundance Copeia* 104:942–951
- Zedler JB (2003) Wetlands at your service: reducing impacts of agriculture at the watershed scale. *Front Ecol Environ* 1:65–72
- Zhang YF, Xu HM, Yu F, Yang HY, Jia DD, Li PF (2019) Comparison the sensitivity of amphibian metamorphosis assays with NF 48 stage and NF 51 stage *Xenopus laevis* tadpoles. *Toxicol Mech Methods* 29:421–427
- Zhelev Z, Mollov I, Tsonev S (2021) Fluctuating asymmetry in meristic morphological traits of *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) (Anura: Bufonidae): application for assessing environmental quality of two semi-natural habitats in Plovdiv city, Bulgaria. *Acta Zool Bulg* 73:401–407
- Zimić A (2015) Commensalism, predation or parasitism: first report of the leech *Helobdella stagnalis* Linnaeus, 1758 on yellow-bellied toad, *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758). *Ecologica Montenegrina* 2:62–63

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Discussion de l'étude 2 :

Afin de mettre en évidence un potentiel impact négatif des bassins d'orage sur le développement des têtards du Crapaud vert, nous avons décidé d'entreprendre une étude *in situ*, en comparant les performances obtenues avec ceux mesurés sur les sites considérées les plus favorables à leur reproduction et présents sur le même secteur.

Ainsi nos enclos flottants nous ont permis d'étudier le développement larvaire du Crapaud vert dans des conditions les plus naturelles possibles, tout en nous affranchissant au maximum de l'impact des prédateurs classiques des têtards d'amphibiens, que sont les macro-invertébrés et les poissons. Ces enclos nous ont permis d'être la première étude qui s'est focalisé sur l'impact réel des bassins d'orage routiers sur le succès reproducteur d'une espèce d'amphibien en prenant en compte l'ensemble des variables caractérisant ces sites (biotique et abiotique). Il est vrai que de réaliser des études dans le milieu naturel a ses propres limites, comme par exemple les risques imposés par la météo. En effet lors de cette étude, nous avons été confrontés à un printemps anormalement sec. De ce fait, beaucoup de mares semi-naturelles n'étaient pas en eau lors de la reproduction, et deux d'entre elle ont vu leur niveau baisser rapidement durant l'étude, ce qui nous a pousser à surcreuser la mare afin d'éviter la perte des têtards étudiés, mais également des milliers de têtards présents sur le site. Ces épisodes de sécheresse sont de plus en plus fréquents et intenses (Fink *et al.* 2004 ; Vautard *et al.* 2007). On l'observe également cette année 2022, avec plus de la moitié des sites étudiés qui étaient asséchés au mois de mai, comprenant même des bassins d'orage dits de rétention qui ne sont habituellement jamais à sec (du moins dans notre département du Bas-Rhin). De plus, cette première étude s'étant déroulée en 2020, nous avons été très impactés par les mesures sanitaires du gouvernement. En effet, le CNRS et l'Université de Strasbourg nous avaient interdit d'aller sur le terrain. Mais heureusement que nous étions et nous sommes toujours en collaboration étroite avec la Collectivité européenne d'Alsace (CeA) qui elle n'avait pas les mêmes restrictions que nous. C'est donc avec l'aide de collègues de la CeA que nous avons pu mettre en place et commencer cette étude qui s'est poursuivie jusqu'après le confinement. Cette étude me tenait à cœur et était à mon sens indispensable pour ma thèse, la voir être reportée d'un an était pour moi inconcevable.

Les résultats obtenus lors de cette étude confirment que le développement larvaire est très largement compromis dans les bassins d'orage routiers avec une survie quasiment nulle, alors que la vitesse de croissance ne semblait pas avoir été impactée. Ces résultats ne nous

permettent pas d'affirmer que la pollution est responsable de cette survie nulle, ce qui est l'hypothèse privilégiée dans les études sur les BO (Snodgrass et al. 2008; Gallagher et al. 2014; Leduc et al. 2016). En revanche, la découverte inopinée d'une espèce de sangsues (*Helobdella stagnalis*) présente uniquement dans les bassins d'orage routiers, nous questionne sur son éventuel impact sur le développement larvaire des têtards de Crapaud vert. En effet, nous avons observé plusieurs individus de cette espèce attachés sur l'épiderme des crapauds adultes et des têtards, confirmant ainsi des observations allant dans ce sens entre *Helobdella stagnalis* et d'autres espèces d'amphibiens adultes (le sonneur à ventre jaune : Zimic 2015 ; le triton palmé : Stark et al 2017). Néanmoins, aucune étude n'a prouvé pour le moment un comportement de parasitisme de cette espèce sur des amphibiens. *Helobdella stagnalis* est peu étudiée et d'après la littérature elle serait une sangsue prédatrice d'invertébrés (larve de chironome et petits escargots) (Learner & Potter 1974).

Nous n'avons trouvé par ailleurs, auprès de spécialistes Européens des Hirudinea, aucune information permettant de faire une hypothèse sur sa prévalence dans les bassins d'orage, comme par exemple : (i) éliminée dans les MSN par des prédateurs non-présents dans les BO ? (ii) plus tolérantes à la pollution ? (iii) moins grandes diversification/abondance des ressources alimentaire de cette sangsue dans les BO ? (iv) mortalité des sangsues liée à des assèchements dans les MSN ?

Quoi qu'il en soit, les résultats partiels de cette étude nous ont amenés à nous intéresser de plus près à ces deux variables candidates pour expliquer la mortalité larvaire du Crapaud vert dans les BO : la pollution du sédiment et/ou la présence de cette espèce de sangsue. Pour ce faire, nous avons mis en place une étude en conditions contrôlées afin d'analyser le rôle spécifique de ces deux variables.

Étude 3 : Mortalité importante des têtards de Crapaud vert dans les bassins d'orage routiers : un problème de pollution et/ou de présence d'un nouveau prédateur ?

Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de préparation.

Dans l'étude précédente, nous avons montré que la survie larvaire dans les bassins d'orage routiers (BO) était quasiment nulle. De plus, nous avons caractérisé les bassins d'orage routiers par la présence d'un sédiment 5 fois plus concentré en certains polluants que dans les mares semi-naturelles (MSN), ainsi que la présence systématique d'une espèce de sangsues *Helobdella stagnalis* (*Hs*) qui n'a jamais été observée dans les MSN étudiées. Nous avons donc mis en place une étude de laboratoire, en conditions contrôlées avec répliques, afin de mettre en évidence le rôle spécifique ou additif de ces deux variables sur la survie larvaire du Crapaud vert.

Résumé de l'étude 3 :

Afin de comprendre le rôle respectif de deux facteurs censés impacter le développement larvaire des têtards du Crapaud vert dans les BO, i.e. la pollution du sédiment et la présence de la sangsue *Hs*, des pontes ont été prélevées dans une mare semi-naturelle et ont été incubées au laboratoire. Après éclosion les têtards ont été élevés au laboratoire selon quatre conditions croisées, afin de suivre en détail leur développement, leur survie et leur comportement. Chaque condition comprenait chacune 3 répliques avec 40 têtards par réplique. La première condition « *contrôle* » était composée d'un « sédiment propre » (acheté en animalerie) et d'une « eau propre » (eau potable du réseau préalablement oxygénée) ; la seconde condition « *Hs* » était composée d'un sédiment propre, d'une eau propre et de sangsues *Hs* (N=20 sangsues par répliques) ; la troisième condition « *sédiment* » était composée d'une eau propre et d'un « sédiment pollué » (prélevé dans les BO utilisés pour l'étude 2) ; et la dernière condition « *Hs+Sédiment* » était composée d'une eau propre, d'un sédiment pollué et de sangsues *Hs* (N identique à la condition « *Hs* »). Les têtards ont été comptabilisés et mesurés 3 fois par semaine. Nous avons étudié aussi sur les têtards leur comportement de nage lors de tests de vitesse et le métabolisme de repos des individus fraîchement métamorphosés, via la calorimétrie indirecte. Ces 2 dernières expériences se sont focalisées uniquement sur les conditions « *contrôle* » et « *sédiment* ». Enfin, le comportement des sangsues ainsi que des évènements éventuels

d'accrochage sur les têtards ont été répertoriés et photographiés. Les résultats des taux de survie ont montré que seule la présence de sangsues impactait la survie larvaire, les sangsues ayant présenté des comportements directs de prédation : capture active et consommation complète de la proie. En revanche, la présence de sédiment pollué n'a eu aucun impact sur la survie larvaire. À noter que la croissance était plus rapide dans la condition « *sédiment* ». Pour finir, nous n'avons montré aucune différence significative de vitesse de nage ni de métabolisme entre la condition « *contrôle* » et « *sédiment* ».

Ces résultats confrontés à ceux de la première étude *in situ* avec les têtards de Crapaud vert nous permettent de conclure les points suivants : (1) les bassins d'orage routiers peuvent être considérés comme des piège écologiques pour le Crapaud vert, dans la mesure où les chances de succès de reproduction sont infimes ; (2) que c'est surtout la conséquence d'une espèce de sangsues rencontrées exclusivement dans les BO qui seraient un prédateur actif des têtards.

High mortality of European green toad tadpoles in road stormwater ponds: a problem of pollution or the presence of a new predator?

Antonin Conan^{1,2*}; Astolfo Mata¹; Eloïse Lenormand^{3,4}; Alexandre Zahariev¹; Manfred Enstipp; Jonathan Jumeau^{2**}; Yves Handrich^{1**}

¹ University of Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

² Collectivité européenne d'Alsace, CERISE, Place du Quartier Blanc, 67964 Strasbourg, Cedex 9, France

³ University of Strasbourg, CNRS, ENGEES, ICube, UMR 7357, F-67000 Strasbourg, France

⁴ University of Strasbourg, CNRS, LIVE, UMR 7362, F-67000 Strasbourg, France

* Corresponding author:

** These authors contributed equally and are co-last authors.

Antonin.conan@iphc.cnrs.fr

Abstract

In a previous *in situ* study, we found that the survival of European green toad (*Bufo viridis*) tadpoles was almost null in SWP and that it was impacted by the presence of pollutants in the sediment or the presence of a leech species (*Helobdella stagnalis*; *Hs*).

We set up a controlled study to keep and grow tadpoles under four cross-over conditions to monitor their development, survival and behavior in detail. Each condition consisted of 3 replicates with 40 tadpoles per replicate. The first ‘control’ condition consisted of ‘clean sediment’ and ‘clean water’ (oxygenated tap water); the second ‘leech’ condition consisted of clean sediment, clean water and *Hs* leeches (N=20 leeches per replicate); the third ‘SWP sediment’ condition was composed of clean water and ‘polluted sediment’ (collected from the BO used in Study 2); and the last ‘SWP sediment + leech’ condition was composed of clean water, polluted sediment and *Hs* leeches (N identical to the ‘leech’ condition). Tadpoles were counted and measured 3 times per week. We also studied their swimming behavior during speed tests and the resting metabolism (standard metabolic rate at 21°C) of freshly metamorphosed individuals, via indirect calorimetry. These last two experiments focused only on the ‘control’ and ‘SWP sediment’ conditions. Finally, the behavior of leeches as well as possible clinging events on the tadpoles were recorded and photographed. The results of the survival rates showed that only the presence of leeches had an impact on larval survival, as leeches showed direct predatory behavior: active capture and complete consumption of the prey. In contrast, the presence of polluted sediment had no impact on larval survival. Note that growth was faster in the ‘SWP sediment’ condition. Finally, we showed no significant difference in swimming speed or metabolism between the ‘control’ and ‘SWP sediment’ conditions.

These results compared to those of the first *in situ* study with European green toad tadpoles allow us to conclude the following: (1) that roadside stormwater ponds can be considered as ecological traps for the Green toad, as the chances of reproductive success are minimal; (2) that this is mainly the consequence of a species of leeches found exclusively in SWP that would be an active predator of tadpoles.

Keywords: Amphibians; Ecological Trap; Behavior; Standard metabolic rate; Leech

1. Introduction

Anthropogenic activities and industrialization lead to massive road construction. From 1957 to 2012, the European road network increased from 146.7 million of kilometers to 421.8 million (Stelder 2016). Besides the devastating consequences associated with the destruction and fragmentation of the landscape, road traffic further impacts biodiversity through the emission of pollution (e.g. chemical, light and noise; Gaston et al., 2018; Forman & Alexander, 1998; Neff et al., 2005). The chemical pollution (e.g. hydrocarbon and heavy metals) that is washed off the road surface by rain comes from tires, fuel residues and the asphalt used to pave roads (Davis et al. 2001). To mitigate the impact of such chemical pollution, roadside stormwater ponds have been constructed (EPA 2009; Le Viol et al. 2009). These stormwater ponds (SWP) are used to collect, store and clean up runoff water from the roads before it is released into the environment (EPA 2009). The name 'stormwater' pond refers to the design of these water reservoirs to collect all water, even in case of maximum rainfall, i.e. during a storm.

Despite their primary role to store road pollutants, some species, especially amphibians, breed inside SWPs, at least in North America and Western Europe, (Brand & Snodgrass 2010; Hassall & Anderson 2015; Jumeau et al. 2020; Conan et al. 2021). Consequently, some researchers consider such SWPs as ecological traps (Brand et al. 2010; Gallagher et al. 2014; Sievers et al. 2018a). Indeed, numerous studies have demonstrated negative effects of roadside pollutants (e.g. heavy metals, salts) on amphibians, particularly during larval development (Bishop et al. 2000; Brand et al. 2010; Egea-Serrano et al. 2012; Hall et al. 2017). Some of these pollutants might lead to physiological and morphological changes in affected animals, such as a reduced larval survival and metabolism, and an increasing risk of malformations (Chen et al. 2007; Brand et al. 2010; Reeves et al. 2010; Leduc et al. 2016; Sievers et al. 2018b). It has also been shown that these pollutants (e.g. copper, lead) can negatively affect the behavior of amphibians, such as the capacity to escape, through a decrease in swimming speed (Sievers

et al 2018b; Zhang et al. 2020). However, pollutant concentration in SWPs varies greatly between roads and also between countries, as road types, traffic volume and pond management practices (including dredging frequency) differ (Clevenot et al. 2018; Jumeau et al., 2020).

Although polluted, in a situation where amphibian natural habitats are in steep decline, SWPs are more and more viewed as substitute biotopes (Jumeau et al. 2020). Globally, 41% of amphibian species are threatened with extinction (IUCN 2021) and the main cause for such population erosion is the loss of natural habitat. Worldwide wetland surfaces, essential for amphibians, have decreased by more than 70% in the last century alone (Davidson 2014). Since SWPs are built alongside roads, they might act as relay sites (in a stepping-stone configuration) for the recolonization of wetland by providing a corridor for amphibian species (Herrera et al. 2017; Conan et al. 2021).

One species particularly concerned by such a scenario is the European green toad (*Bufo viridis*). In the Bas-Rhin plain region (Alsace, eastern France), which is host to the largest green toad population in France, the majority of individuals are found in SWPs (Berna et al. 2021). This is likely associated with the damming of the Rhine river in the 20th century, which destroyed the natural habitat of green toads in the region (open banks of large rivers). In the following, toads moved to various semi-natural ponds (SNPs; quarries and ponds developed for the species) for survival and later invaded SWPs, once they were implemented. Hence, it is of great importance to understand the role that SWPs play for this protected species (ecological trap or suitable breeding habitat), so that the design and management practices for these structures can be adapted. Conan and colleagues (submitted) studied the growth and survival of European green toad tadpoles within SWPs, which was compared with the situation in SNPs. The latter were used as ‘control sites’ because they are located far from major highways and their associated pollution. Results from that study showed a reduced larval survival inside SWPs (~0% in SWPs vs. ~21% in SNPs), supporting the view that SWPs might act as an ecological trap. The exact reason(s) for the reduced survival in SWPs remain(s) unknown. However, sediments inside SWPs had a five-fold higher concentration of pollutants than was found in the sediment of SNPs, while water pollution levels did not differ. In addition, a leech species (*Helobdella stagnalis*) was present in SWPs (and was found attached to adults and tadpoles) but not in SNPs.

Research objectives

The present study is a follow-up to the above reported study (Conan et al. submitted) and was conducted to investigate the potential effects of sediment pollution and leech presence on the survival of European green toad tadpoles in a controlled laboratory environment. In the following, our investigation covered the larval development of green toads from hatching to metamorphosis. For this, we followed the survival and growth of the tadpoles until metamorphosis. We also performed swimming tests of the tadpoles and studied the Standard Metabolic Rate for metamorphosed individuals in order to observe an impact of pollution.

Based on the published literature, we expected that sediment pollution would (1) negatively impact tadpole survival, (2) lead to an accelerated growth rate and (3) a decrease in swimming speed (Snodgrass et al. 2008; Brand et al. 2010). (4) An acceleration in growth rate should be reflected in an increased metabolism, while we expected that the presence of leeches should affect tadpole survival.

2. Materials and methods

2.1. Egg collection and housing

On May 17th, 2021, we collected five clutch fragments from European green toads (*Bufo viridis*), containing at least 200 eggs each, in a semi-natural pond (Bischoffsheim, 48°28'58.4"N, 7°30'42.7"E). The larval survival at this pond during the year before was ~70% (Conan et al. submitted). Clutch fragments were transported in a plastic bucket of water from the sampling site to the laboratory (IPHC-DEPE, Strasbourg). Eggs were incubated inside an aquarium at 20°C, until hatching. Water inside the aquarium consisted of water from the collection site (50%) and of clean tap water (50%), continuously oxygenated with an air pump.

2.2. Leech collection (*Helobdella stagnalis*)

On May 4th, 2021, we collected approximately 200 individuals of *Helobdella stagnalis* in one of the SWPs (Rosheim, 48°30'12.9"N, 7°29'57.7"E) where both leeches and breeding European green toads were present. Leeches were collected by hand, removing them from adult toads and our boots (after boot immersion). They were transported to the laboratory within a plastic bucket, filled with water from the sampling site, where they rested overnight, before being introduced to the experimental setup.

2.3. SWPs sediment samples

We collected approximately 5 liters of sediment from 3 SWPs in May 2021. The sediment at these sites was found to be the most polluted of all sites during our previous study (Conan et al. submitted). The sediment was thoroughly mixed and freeze-dried in the laboratory, to kill the majority of its life forms without modifying its biochemistry. About 2.5 liters of sediment were used in the experimental setup, while the rest was stored for pollutant analysis.

2.4. Experimental design

For our investigation, we set up four large glass tanks (120x50x35 cm, LxWxH) that each contained three smaller glass tanks (40x30x30 cm, LxWxH). Different environmental conditions, concerning sediment pollution and leech presence, were realized within the four tanks, while the three smaller glass tanks within each large tank served as replicates (**Fig. 1**). All tanks were filled with a 2 cm layer of sediment and tap water (up to a height of 28cm), which was continuously oxygenated by bubbling air through it (air pump JBL ProSilen a200, Neuhofen, Germany) and mechanically filtered (JBL CristalProfi e1502 greenline, Neuhofen, Germany). We set up the following four conditions: (1) In the '*control*' condition, tanks were filled with a clean sediment layer (bought from a pet store; JBL Sansibar white, Neuhofen, Germany) and water. (2) Tanks representing the '*leech*' condition were filled with clean sediment (as in condition 1), water and 20 leeches per replicate. (3) The '*SWP sediment*' condition contained polluted sediment from the SWPs and water. (4) The '*SWP sediment + leech*' condition also contained polluted sediment from the SWPs, water and, in addition, 20 leeches per replicate. The water quality (nitrate, nitrite, ammonium) was analyzed twice a week with colorimetric tests (JBL Combiset Test Plus NH₄, Neuhofen, Germany) to avoid exposure to nitrogen peaks. Each tank was set up carefully, depositing the sediment first and avoiding disturbance when adding water. All tanks were left for a period of 3 weeks so that conditions could stabilize (water quality, settling of suspended sediment). Thereafter (June 2nd, 2021), tadpoles and leeches were added to each replicate tank. A total of 480 tadpoles were used during the experiment (40 tadpoles per replicate tank, 3 replicate tanks per condition).



Fig. 1: Large glass tank, containing 3 smaller replicate tanks. Each replicate tank was filled with a 2 cm layer of sediment and water, that was continuously oxygenated and mechanically filtered. Water level in the small tanks was maintained at a height of 28 cm, through an outflow into the main tank.

2.5. Sediment pollution analysis

To ensure that sediment collected from the SWPs had pollution levels similar to those of our previous study, concentrations for the various pollutants were quantified before experimentation. The freeze-dried sediment was first crushed and then sieved to obtain a homogeneous sediment with a particle size of less than 125 μm (Ravansari et al. 2020). The pollutant analysis was conducted with a portable X-Ray Fluorescence Analyzer (pXRF; Olympus C-series Vanta, Tokyo, Japan) that had been carefully calibrated beforehand (Lenormand et al. *in press*). The shooting-time was set to 63 seconds and three replicates per sediment sample, which were kept inside a 10 cm^3 plastic cup covered with a ParafilmTM, were analyzed (USEPA 2017).

2.6. Survival and growth assessment

To allow the monitoring of survival and growth, tadpoles were moved from the respective setup to a small plastic box (1 cm water layer) containing a ruler. Pictures were taken with a digital camera (Olympus Tough 5, Tokyo, Japan) and the number of surviving tadpoles was counted and their size determined (from snout to base of tail) using the pictures and Image J software (v1.52a, Development Team, 2020). Measurements were conducted three times per week until all four legs of the tadpoles were well developed. Since tadpoles at this developmental stage switch from an aquatic to an aerial breathing system, individuals were placed into a terrarium, containing both an aquatic and terrestrial part, to avoid drowning. Size measurements were also discontinued, since body size decreases during that stage. The surviving metamorphosed tadpoles ('toadlets') were kept to be used in respirometry trials.

2.7. Swim tests

To investigate the potential impact of pollution on the locomotion capacity of tadpoles (i.e. swim speed), individuals with well-developed hind legs (i.e. ~42 days after the start of experimentation) were subjected to swim tests. At the start of a trial, an individual was placed in an open PVC tube that served as a swim channel with a graded scale at the bottom (**Fig. 2**). Within 30 seconds after placement, the individual was stimulated to swim by gently touching the tail with a stick. This was repeated three times per trial, leaving 30 seconds between repetitions. We filmed the trials with a digital camera (Olympus Tough 5, Tokyo, Japan) and analyzed video with Tracker software (v6.0.1, Development Team, 2021) to estimate the swimming speed of each individual. Swim tests conducted with three individuals per replicate tank (i.e. N=9 individuals per condition). However, since tadpoles exposed to conditions 2 and 4 (leech presence) died within the first 2 weeks of experimentation, these tests were only conducted for condition 1 and 3.



Fig. 2: Swim channel with 5 cm graduations.

2.8. Respirometry trials

To investigate the potential effect of pollutants on metabolic rate, we recorded the CO₂ production of freshly metamorphosed toadlets (four legs and fully resorbed tail) exposed to condition 1 (*‘control’*) and 3 (*‘SWP sediment’*). Given the high mortality of tadpoles in condition 2 and 4, no individuals reached metamorphosis and, hence, these groups could not be included in respirometry measurements.

We conducted respirometry trials with 10 toadlets per tested condition (i.e. N=20) that had a mean body mass of 0.26 g (range: 0.13–0.40 g; Aroma-Zone® precision balance, 0.1-500 g, resolution: 0.01 g.). The metabolic rate of individuals was determined by recording the CO₂ production rate within an open circuit respirometry system (FoxBox, Sable Systems, Las Vegas, US). The respirometer was properly calibrated (zeroed and spanned) before the beginning of CO₂ emission measurements. To span we used 5000 ppm certified CO₂ (Air Liquide) and to zero we used 0 ppm CO₂ generated by pulling air through an Ascarite® and Drierite® tube. A 5mL transparent plastic syringe with a 12.5 mm diameter served as the metabolic chamber

through which air was pulled at a rate of 44 mL/min and fed into the gas analyser. Water vapor and carbon dioxide were removed from the incurrent air using Drierite® and soda lime respectively. The time constant of the system was calculated to be 6.5 s. All trials were conducted at a room temperature of 21 °C. Baseline readings of background CO₂ and water vapor were established for at least 1 min before and after trials were conducted and the toadlets VCO₂ was measured during 8 min. After the initial disturbance, the animal remained calm for the rest of the trial when CO₂ concentration and flow rate were recorded. Trials lasted ~15 min for each individual and resting metabolic rate (Standard Metabolic Rate at 21 °C, SMR, in µL/h of CO₂) was calculated from the recording of a stable period of 8 min, using the equation of Lighton (2008) $\dot{V}_{CO_2} = FR_i(F_eCO_2 - F_iCO_2)$ with \dot{V}_{CO_2} corresponded to CO₂ rate, FR to the flow rate, F_e to excurrent flow and F_i to incurrent flow in mL/h. \dot{V}_{CO_2} was calculated as the lowest 60 sec mean value of instantaneous CO₂ production. Data were recorded and analyzed using the ExpeData software package (Sable Systems, Las Vegas, US).

2.9. Statistical analysis

We used the Kaplan Meier survival analysis and Log-rank test to compare the survival rate between the different conditions. A generalized additive model (GAM) was used to investigate potential size differences over time between the various conditions. An analysis of variance (ANOVA), based on a linear mixed model (LMM) with the individual as a random factor was used to compare the swim speeds of tadpoles exposed to condition 1 (*‘control’*) versus 3 (*‘SWP sediment’*). Finally, to investigate potential differences in metabolic rate between toadlets of condition 1 and 3, we used a multivariate analysis of variance (MANOVA-Pillai test).

All statistical analyses and graphs were realized with R (v3.5.5, RStudio v1.2.1335, R Core Team, 2020) and GraphPad Prism 8.2.1 (San Diego, California, USA). Results are presented as means±SEM with a statistical significance level of 5%.

3. Results

3.1. Pollution analysis

Sediment pollution analysis revealed high concentrations of heavy metals in the sediment used for condition 3 and 4 (Pb, Zn, Ni, Cu, Cr, As). The concentration of pollutants in our SWP sediments were greater than previously reported sublethal sediment concentrations

for amphibians (MacDonald et al. 2000; Jumeau et al. 2020; **Tab. 1**). We assumed pollution concentrations in the ‘clean sediment’ to be at trace levels, since this is sold in aquarium stores.

3.2. Survival and growth

Survival differed significantly between conditions (**Fig. 3A**; $\chi^2=528.1$, $d=3$, $p<0.001$). Survival was zero for condition 2 (*‘leech’*) and 4 (*‘SWP sediment + leech’*). By contrast, survival was $85.0\pm 7.6\%$ for condition 1 (*‘control’*) and $80.8\pm 9.2\%$ for condition 3 (*‘SWP sediment’*). When leeches were present, all tadpoles died in less than 15 days (14 days in condition 2 and 7 days in condition 4). We found no statistical difference in survival rate between conditions 1 and 3 (**Fig. 3A**; $p>0.05$), suggesting that sediment pollution had little effect on tadpole survival.

Since tadpoles died fast when exposed to condition 2 and 4, it was not possible to investigate growth rates for these conditions. However, growth rate was increased in condition 3 (*‘SWP sediment’*), when compared with the control condition (**Fig. 3B**; $F=62.4$, $d=1$, $p<0.001$). Individuals of the former group were significantly larger (by 4%) at the end of the monitoring period than individuals of the control group ($size_{C1}=8.7\pm 0.1$ mm vs $size_{C3}=9.0\pm 0.1$ mm). Results did not differ between the replicates of a given condition ($p>0.05$).

The strong effect that the presence of leeches had on tadpole survival (conditions 2 and 4), motivated us to set up a further condition (Condition 2b). The latter was similar to condition 2 but we provided food *ad libitum* for the leeches (i.e. chironomid larvae). While the survival of tadpoles in condition 2b was lower than in condition 1 and 3 (**Fig. 3A**; $\chi^2= 106.9$, $d=1$, $p<0.001$), some tadpoles survived (20.8%).

3.3. Swim tests

Analysis of the swim tests found no difference in swim speed between the *‘control’* and the *‘SWP sediment’* condition (92.1 ± 6.2 versus 87.4 ± 7.2 m/s; $\chi^2=0.09$; $d=1$; $p>0.05$).

3.4. Respirometry trials

Metabolic rate of toadlets (at 21°C) averaged 137.8 ± 13.4 $\mu\text{L/h}$ of CO_2 and did not differ between the *‘control’* and the *‘SWP sediment’* condition (129.6 ± 40.8 versus 145.9 ± 76.1 $\mu\text{L/h}$ of CO_2 ; $F=0.36$; $d=1$; $p>0.05$, **Fig. 4**)

Table 1: Pollutant concentrations of SWP sediment and, for comparison, sublethal concentrations estimated for amphibians in general (MacDonald et al. 2000; Jumeau et al. 2020)

| Pollutant | Concentration (mg/kg dry weight) | Estimated sublethal concentration (mg/kg dry weight) |
|-----------|----------------------------------|--|
| Pb | 43.0±0.6 | 35.8 |
| Zn | 337.0±1.0 | 121 |
| Ni | 63.3±5.7 | 22.7 |
| Cu | 108.0±2.9 | 31.6 |
| Cr | 128.0±13.6 | 43.4 |
| As | 13.3±0.3 | 9.79 |

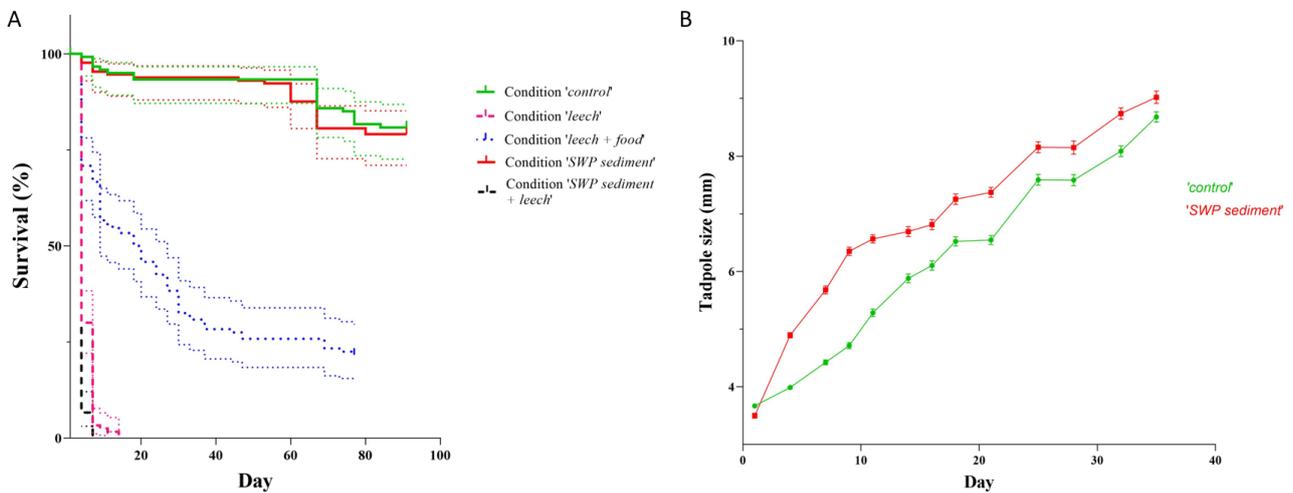


Fig. 3: (A) The Kaplan-Meier survival curve found a lower survival rate for tadpoles exposed to condition 2 ('leech') and 4 ('SWP sediment + leech'; pink and black dashed lines) than for condition 1 ('control') and 3 ('SWP sediment'; solid green and red line; $\chi^2=528.1$, $d=3$, $p<0.001$) Tadpole survival for condition 2b ('leech + food', blue dotted line), was lower than in condition 1 and 3 ($\chi^2= 106.9$, $d=1$, $p<0.001$) but greater than in condition 2 and 4. (B) Growth curve of European green toad tadpoles during experimentation period (40 days). Tadpoles exposed to the SWP sediment grew faster than control tadpoles, especially during the first ~10 days, resulting in an overall larger size ($F=62.4$, $d=1$; $p<0.001$).

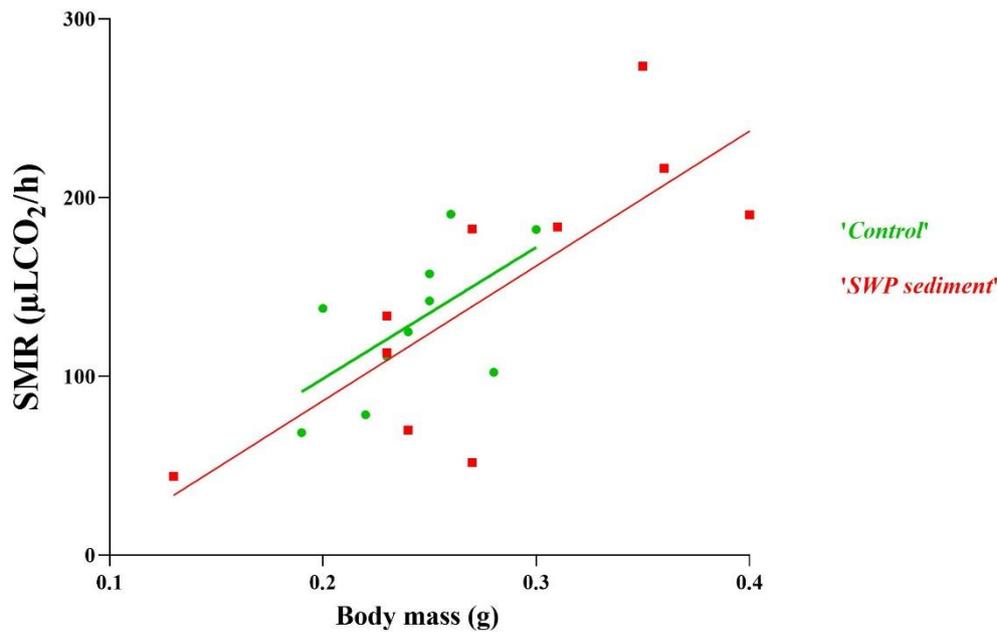


Fig. 4: Standard metabolic rate (SMR) of 20 green toad tadpoles in relation to body mass. Metabolic rate did not differ between exposure conditions ($F=0.36$, $d=1$, $p=0.56$).

4. Discussion

The results of our current study clearly demonstrate the strong effect that the presence of leeches has on tadpole survival. While the possibility remains that the polluted sediments of artificial SWPs contributed to the high mortality of tadpoles that we found previously *in situ* (Conan et al. submitted) and under controlled conditions (this study), the prominent role of *Helobdella stagnalis* is now obvious. A leech can detect a tadpole, attach itself to it and devour it within a few minutes. Leech predation on tadpoles at the abundance level tested (20 leeches for 40 tadpoles) was high, so that no tadpole survived for more than 15 days, regardless of the pollution level of the substrate (conditions 3 & 4). Interestingly, even when providing alternative food for the leeches *ad libitum* (condition 2b), they continued to devour tadpoles, suggesting a strong attraction for tadpoles.

Tadpole predation by *Helobdella stagnalis* (*Hs*) leeches is somewhat surprising because not all species of this genus possess chitinous jaws and these leeches are typically known to feed on invertebrates (e.g. chironomid larvae and small freshwater snails; Learner & Potter 1974). Tadpole predation by *Hs* has not been documented before but such predation has been observed in other leeches, *Desserodbella picta*, belonging to a different family, that frequently devour frog tadpoles (*Lithobates sylvaticus*: Berven & Boltz 2001; *Rana iberica*: Ayres &

Comesana 2010). Little is known about the ability of these 2 leech species to colonize new sites, so we can only speculate why *Hs* has never been observed in the semi-natural ponds of our study area (SNPs). One possible explanation may be the relative frequent dry up of SNPs during periods of draught, while we never observed such a full dry up in SWPs during our 3 years of monitoring. Hence, it might be possible that such frequent dry ups eliminate most leech individuals within SNPs.

Our study could not demonstrate a negative effect of sediment pollution on tadpole survival and locomotion capacity (swim speed), as well as on metabolic rates of tadpoles (condition ‘control’ vs ‘SWP sediment’). Since pollutant concentrations in the SWP sediment conditions were higher than known sublethal thresholds for amphibians (MacDonalk et al. 2000; Jumeau et al. 2020), this is surprising. In the context of the suitability of SWPs as amphibian habitats, pollution within SWPs is typically a major concern (Brand et al. 2010; Sievers et al. 2018). Previous studies found negative effects of Cu and Ni (see **Tab. 1**) on larval survival in other amphibian species (*Lithobates pipiens*; Leduc et al. 2016, *Limnodynastes tasmaniensis*; Sievers et al. 2018). However, since tadpoles died quickly during the conditions that included the presence of leeches (condition 2 and 4), we were only able to compare results from our measurements of swim speed and metabolic rate between condition 3 (‘SWP sediment’) and the control condition. Since the combination of sediment pollution and leech presence (condition 4) led to a much faster predation rate on tadpoles (i.e. no tadpole survivors after 7 days), this might indicate some synergistic effects. Different mechanism might explain the effects observed with polluted sediment. For example, (1) pollution might increase the motivation of leeches to feed (or increase their attraction for fatter tadpoles) or (2) pollution might affect the ability of tadpoles to escape from leeches, albeit unlikely related to changes in swim speed.

As originally expected, tadpoles exposed to the SWP sediment grew faster and larger than tadpoles exposed to the ‘clean sediment’ (**Fig. 3B**). This is likely explained by the greater concentration of organic matter within the SWP sediment, when compared with the aquarium sediment. This might also have offset any potential negative effects of pollutants on swim speed and metabolic rate. In contrast to our study, previous investigations demonstrated a clear effect of pollutants on metabolic rate and swim behavior in a number of species (*Lithobates catesbeianus* - Rowe et al. 2015; *Limnodynastes tasmaniensis* and *Limnodynastes peronii* Sievers et al. 2018; *Lithobates pipiens* - Chen et al. 2007). Apart from methodological issues preventing the demonstration of such an effect in our study (though pollutant levels in the above

studies were lower than in the current study; **Tab. 2**), it is possible that tadpoles of the European green toad are more resistant to the presence of pollutants than other species. For example, these toads are highly tolerant to salt pollution (Katz 1973, 1975; Katz et al. 1984). Nevertheless, pollution might have a long-term negative effect on adult reproduction via bioaccumulation (Hopkins et al. 2006). In this context, it would be very interesting to study pollutant levels in the different tissues of tadpoles (e.g. skin, muscle) in relation to their diet (i.e. stomach content) and to further study pollution dynamics over several years. Moreover, a parental transfer (i.e. transfer of contaminants to offsprings) could also be observed during the future reproduction of these individuals (Hopkins et al. 2006; Bergeron et al. 2010).

Table 2: Pollutant concentrations in sediment (mg/kg DM) in various studies that investigated effects on amphibians

| Pollutants | This study | Brand et al. 2010 | Rowe et al. 2015 | Sievers et al. 2018 |
|-------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Pb | 43.0±0.6 | 26 | 10.94±1.89 | 25 |
| Zn | 337.0±1.0 | 211 | ND | 70 |
| Cu | 108.0±2.9 | 74 | 55.12±5.05 | 25 |
| Cr | 128.0±13.6 | 53 | 27.25±6,22 | ND |

Based on the results of the current study and those of our previous investigation (Conan et al. submitted), which both demonstrate a high mortality of tadpoles in SWPs, we cannot recommend SWPs as suitable substitute habitat for European green toads. However, there are further aspects to consider. For example, during the last few years, we observed many toadlets emerging from several SWPs, especially from those more recently built. Clearly, after the construction of SWPs in the Bas-Rhin plain, toad populations have greatly increased in their vicinity. Some years, toadlet numbers around these newly built SWPs were the highest within the Bas-Rhin plain (Berna et al. 2021). Hence, we propose the following scenario concerning SWPs: when a SWP is first constructed, a sediment layer is absent and leeches will not be present. The shallowness at the pond edge and the absence of vegetation makes these artificial ponds the ideal breeding habitat for European green toads, whose numbers rapidly increase. However, after several years without sediment removal (dredging) and the absence of complete dry-up events, leeches are able to colonise the pond, spread rapidly and strongly feed on tadpoles, impacting the breeding success of toads. Further studies are needed to substantiate support for such a scenario, especially investigating the effect of SWP age and dredging frequency on toad reproduction (Clevenot et al. in prep). Until then, we recommend road managers to regularly dredge SWPs to limit the presence of leeches and to remove polluted sediment.

5. Conclusions

Clearly, recreating natural wetlands, especially in altered landscapes that have experienced a dramatic loss of wetlands, as is the case for the majority of the industrialized and agricultural plains of western Europe, would be the best way to improve the situation of locally endangered amphibians. However, to neglect artificial areas that could be improved to provide adequate habitat for amphibians would be a strategic mistake. The present study confirms that tadpole survival of European Green toads within SWPs might be low, if SWPs are not adequately managed. By contrast, if well managed, these structures might not act as ecological traps for sensitive amphibians, but add to conservation measures. Hence, it is important to reconsider the use of SWPs (banning wildlife from it or adapting it to the use of wildlife), study their role for different species and manage them in a way that significantly improves its qualities as an alternative and valuable wetland.

Discussion de l'étude 3 :

Pour reprendre une idée de mon introduction de l'étude 2, le fait d'aborder d'abord la problématique de la mauvaise qualité environnementale des BO, au travers d'une étude *in situ* du développement larvaire, était assez atypique si l'on s'en réfère à la littérature du domaine. C'est bien par cette première approche qu'il aura été possible d'entrevoir une hypothèse alternative à celle d'un problème lié à la pollution. Notons que cette approche avait permis aussi de préciser que ce n'était pas dans l'eau mais dans le sédiment que résidait un possible problème de surconcentration en certains polluants ce qui avait également été observé par Jumeau *et al.* (2020). Un argument de plus pour commencer d'abord par une étude *in situ*, certains chercheurs ayant menés des investigations en manipulant en laboratoire la pollution de l'eau et non celle des sédiments (Dorchin & Shanas 2010 ; Sievers *et al.* 2018). Cependant, sans cette troisième étude en conditions contrôlées, il n'aurait pas été possible d'écarter l'influence de la pollution du sédiment et privilégier l'hypothèse de la présence de cette espèce de sangsue *Helobdella stagnalis* (*Hs*) pour expliquer le faible succès reproducteur dans les BO. Néanmoins, l'influence de la pollution ne peut être pas totalement écarté, car des problèmes pourraient survenir plus tardivement, au stade adulte par exemple avec un impact sur la fécondité des individus ayant été en contact avec cette pollution (Hopkins *et al.* 2006). De plus, un transfert des parents aux jeunes/œufs peut également être observé pendant la reproduction de ces individus (Hopkins *et al.* 2006 ; Bergeron *et al.* 2010).

Par ailleurs, cette étude est la première à mettre en évidence un comportement de prédation de l'espèce *Helobdella stagnalis* sur des têtards d'amphibiens. Elle ouvre la porte à de nombreux questionnements et futures études sur l'impact de cette espèce (ou de ce genre) de sangsues sur les amphibiens en général. En effet, nous avons découvert sa présence dans un premier temps en observant dès 2020 plusieurs individus accrochés à des adultes de Crapaud vert dans les BO de notre zone d'étude. Nous nous posons donc maintenant la question d'un éventuel impact direct de cette sangsue *Hs* sur la survie et la reproduction des stades adultes. Notons que nous avons déjà réalisé des premiers tests en conditions contrôlées afin de mettre en évidence un comportement de parasitisme d'*Hs* sur les adultes de Crapaud vert. Malheureusement ces tests tous récents semblent non-concluants, car nous n'avons pu mettre en évidence, dans ces conditions de captivité, aucun contact sangsue-crapaud avéré, alors même que ces sangsues étaient à jeun depuis plusieurs jours. Cela nous laisse penser que les observations de contact sangsue-crapaud, réalisées dans les BO, pourraient ne pas correspondre

à du parasitisme, mais peut être plutôt à de la phorésie (les sangsues utiliseraient donc les crapauds plutôt pour se déplacer).

Je dois dire que l'irruption de cette hypothèse sangsues dans ma problématique de thèse a été assez cocasse, car préméditée mais aussi inattendue. En effet, j'ai eu un premier contact avec les sangsues d'une autre espèce (*Hirudo medicinalis*) lors de mon stage de M2 dans le Jura portant sur le Crapaud commun (*Bufo bufo*), durant lequel j'ai observé des comportements de parasitisme étonnants avec plusieurs dizaines de sangsues attachées sur un même individu. J'avais d'ailleurs à l'époque émis l'hypothèse que les épisodes de mortalité observés chaque année au niveau de ce site étaient dus à la présence de cette sangsue. Aujourd'hui, je démontre qu'une autre espèce de sangsues (plus petite) est capable de dévorer littéralement des têtards entiers. Je suppose que sans ces premières observations de sangsues sur des crapauds pendant mon M2, je n'aurais jamais émis l'hypothèse d'un potentiel impact négatif sur la survie des têtards de Crapaud vert.

Conclusion et perspective du premier chapitre

L'objectif du premier chapitre était de s'intéresser à la qualité des bassins d'orage routiers comme habitat pour les amphibiens, et d'éventuellement mettre en évidence un potentiel rôle de piège écologique de ces bassins dans le département du Bas-Rhin.

D'après nos résultats, les bassins d'orage routiers du Bas-Rhin, actuellement largement colonisés par la plupart des espèces d'amphibiens présents à proximité, peuvent être utilisés sans y être directement impactés (qualité individuelle, masse, taille) pour au moins le complexe des grenouilles vertes (étude 1). En ce qui concerne le Crapaud vert, espèce en danger d'extinction dans le Grand-Est et dont les plus grandes populations du Bas-Rhin sont rencontrées dans les bassins d'orage, le constat est engageant du fait des mauvais résultats du succès reproducteur, liés à une survie larvaire quasiment nulle. Le lien avec la présence (exclusive au BO) d'une sangsue prédatrice des têtards est maintenant avéré, bien qu'il ne faille pas complètement écarter le rôle potentiellement additif de la pollution du sédiment (étude 2 & 3). En effet, les BO captent les eaux de ruissellement de la chaussée afin de la dépolluer par décantation, ce qui entraîne une accumulation de ces polluants dans le sédiment. De fait, l'âge d'un BO, s'il est récent, ou la date de dernier curage pour les BO plus anciens va vraisemblablement déterminer la concentration des principaux polluants provenant du trafic

routier. Voici pourquoi il faudrait prendre en compte pour chaque bassin d'orage son âge et son entretien récent, l'état de pollution de ses sédiments, et l'abondance de sangsue *Hs*. À ce jour, nous disposons d'aucun élément d'information publié sur les mécanismes permettant la colonisation des BO par cette espèce.

Un autre élément de la problématique des bassins d'orage, pouvant être considérés donc comme des pièges écologiques pour le Crapaud vert, est la contradiction entre ces taux de survie larvaire si bas et le fait que les populations locales de l'espèce semblent se maintenir (résultats de l'association BUFO), alors que plus de 38% des sites de reproduction connus sont ces mêmes BO. Et de fait une des hypothèses plausibles est que pour les bassins d'orage routiers récents et également ceux curés récemment, la survie larvaire soit identique à celle observée dans les mares semi-naturelles. Cela permettrait alors un recrutement important lors des premières années suivant la création et le curage d'un bassin d'orage routier et donc le maintien des populations de Crapaud vert dans le Bas-Rhin. Il serait donc intéressant de se focaliser sur l'occurrence/abondance des sangsues en fonction de l'âge des bassins d'orage mais également du temps passé depuis le dernier curage avant leur retour dans ces bassins.

C'est pourquoi, en mai 2022, nous avons mis en place un suivi de l'occurrence et de l'abondance de cette espèce de sangsue entre les différents sites de reproduction du Crapaud vert (BO et MSN), suivant un protocole de site occupancy et en prenant en compte les informations disponibles sur le protocole de gestions de leurs sédiments. Cette problématique a d'ailleurs reçu l'aval et une aide financière de l'Eurométropole de Strasbourg (EMS), qui gère tous les bassins d'orage de son périmètre de responsabilité (la moitié des BO de la présente étude). En effet, l'intérêt des gestionnaires (compte tenu du statut de protection du Crapaud vert) est de trouver des solutions, soit pour mieux interdire l'accès des BO aux amphibiens, soit pour trouver une parade pour augmenter leur qualité, ce qui laisse supposer, dorénavant, une réduction de la prévalence de ces sangsues *Hs*.

Une autre approche prévue est de croiser ces données de prévalence de la présence de sangsues à une étude de Capture-Marquage-Recapture du Crapaud vert en cours (menée par notre équipe). Ces mêmes résultats seront utilisés et injectés dans des modèles démographiques (qui seront réalisés après ma thèse) regroupant l'ensemble des données obtenues lors d'un suivi CMR débuté en mai 2020.

De plus, il serait intéressant d'étudier la survie larvaire d'autre espèce d'amphibien, sur un nombre plus important de bassins d'orage. Il serait aussi intéressant de comparer ces résultats dans d'autres régions du monde où sont présentes ces espèces (e.g. Allemagne, Danemark, Italie, Israël pour le Crapaud vert)

Chapitre 2 : Mesures de cloisonnements : comment empêcher l'accès des bassins d'orage routiers aux amphibiens ?

Étude 4 : Efficacité des clôtures en grillage métallique pour empêcher l'accès des animaux aux infrastructures routières : une étude expérimentale sur les petits mammifères et les amphibiens.

Cette étude a fait l'objet d'une publication publiée en janvier 2022 dans la revue
« Nature Conservation ».

<https://doi.org/10.3897/natureconservation.47.71472>

Résumé :

Dans cette étude, nous avons testé l'efficacité du grillage métallique à mailles fines qui est la clôture petite faune la plus utilisée en France et probablement en Europe. Nous avons testé cette clôture, avec et sans la présence d'un bavolet, sur trois espèces de petits mammifères (le Hamster d'Europe : *Cricetus cricetus* ; le Campagnol des champs : *Microtus arvalis* & le Mulot sylvestre : *Apodemus sylvaticus*) et deux espèces d'amphibiens (la Grenouille rieuse : *Pelophylax ridibundus* & le Crapaud vert : *Bufo viridis*). Toutes ces espèces n'ont pas été testées au cours de ma thèse (les micromammifères et la Grenouille rieuse) car il s'agit en réalité d'une compilation de plusieurs sous-études nous ayant permis de dresser des résultats et recommandations les plus fiables possibles pour l'ensemble de la petite faune terrestre, reptiles et insectes exclus.

Au cours des essais, toutes les espèces testées ont été placées dans une arène, dont elles ne pouvaient s'échapper qu'en franchissant la clôture grillagée. Sans bavolet, presque tous les individus adultes de toutes les espèces testées ont été capables de franchir la clôture de 30 à 40 cm de haut. L'ajout d'un bavolet de 8 cm de long au sommet de la clôture a arrêté les espèces d'amphibiens testées mais pas les espèces de micromammifères les plus agiles, comme le Hamster d'Europe et le Mulot sylvestre. Sur la base de ces résultats, nous ne soutenons pas la

construction de clôtures en grillage le long des routes comme mesure pour empêcher les petits animaux de traverser. Nous recommandons l'utilisation de clôtures plus efficaces et durables, qui peuvent en outre être associées à des passages à faune pour reconnecter les populations isolées.

Effectiveness of wire netting fences to prevent animal access to road infrastructures: an experimental study on small mammals and amphibians

Antonin Conan^{1,2*}, Julie Fleitz^{1,3*}, Lorène Garnier¹,
Meven Le Brishoual¹, Yves Handrich^{1**}, Jonathan Jumeau^{2**}

1 Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France **2** Collectivité européenne d'Alsace, Place du Quartier Blanc, 67964 Strasbourg, Cedex 9, France **3** Société Cofiroute, Centre autoroutier de l'Ackerland, 67117 Ittenheim, France

Corresponding author: Antonin Conan (antonin.conan@iphc.cnrs.fr)

Academic editor: Cristian Remus Papp | Received 12 July 2021 | Accepted 24 January 2022 | Published 25 March 2022

<http://zoobank.org/C1001863-D6C7-47AC-B249-08D240177378>

Citation: Conan A, Fleitz J, Garnier L, Le Brishoual M, Handrich Y, Jumeau J (2022) Effectiveness of wire netting fences to prevent animal access to road infrastructures: an experimental study on small mammals and amphibians. In: Santos S, Grilo C, Shilling F, Bhardwaj M, Papp CR (Eds) Linear Infrastructure Networks with Ecological Solutions. Nature Conservation 47: 271–281. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.47.71472>

Abstract

Transport infrastructures, such as highways, disrupt animal migrations and cause roadkill. To mitigate the latter problem, fences have been built but their effectiveness has rarely been tested under controlled conditions. Here, we tested the effectiveness of the most commonly used fence in France and probably in Europe (wire netting fence) to block animals. We tested the wire netting fence, with and without a structural modification (i.e. an overhang), with three small mammalian species (the European hamster: *Cricetus cricetus* Linnaeus, 1758; the common vole: *Microtus arvalis* Pallas, 1778 & the wood mouse: *Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758) and two amphibian species (the marsh frog: *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 & the European green toad: *Bufo viridis* Laurenti, 1768). During testing, all small vertebrate species tested were placed into an arena, from which they could only escape by crossing the wire netting fence. Without an overhang, almost all adult individuals of all tested species were able to climb over a 30 to 40 cm high wire netting fence. Furthermore, the addition of an 8 cm long overhang at the top of the fence stopped the amphibian species tested but not the most agile mammalian species, such as the hamster and the wood mouse. Based on these results, we do not support the construction of wire netting fences along roads as a measure to stop small animals from crossing. We recommend the use of more effective and durable fences, which, in addition, can be associated with wildlife passages to reconnect isolated populations.

* These authors contributed equally and are co-first authors.

** These authors contributed equally and are co-last authors.

Keywords

Amphibians, fences, roadkill, small mammals

Introduction

Millions of animals around the world are killed daily by wildlife-vehicle collisions, affecting populations of most taxa (Bruinderink and Hazebroek 1996; Laist et al. 2001; Rao and Girish 2007). Even on roads with only moderate traffic, roadkill can severely impact population viability (Eigenbrod et al. 2007). These impacts can be accentuated in highly modified landscapes, when terrestrial fauna has to cross roads on a daily basis and/or during dispersion and migration movements (Billeter et al. 2008; Bissonnette and Rosa 2009). To limit roadkill, different mitigation measures, such as the construction of fences and wildlife passages, have been implemented, especially in industrialized regions (e.g. Australia, Western Europe and North America). Initially installed to limit vehicle collisions with large mammal species, like ungulates (e.g. deer, wild boar), the primary aim of fence construction concerned human safety and the limitation of economic losses associated with these collisions (Romin and Bissonnette 1996; Schwabe et al. 2002; Forman et al. 2003; Bouffard et al. 2012). The installation of fences on both sides of the road or along railways is not mandatory but global recommendations advise such measures, if the risk of collision and/or wildlife mortality is high (Iuell et al. 2003). Large-fauna fences or wire netting must be tall enough to prevent animals from jumping over it (i.e. >1.8 m, Iuell et al. 2003; Morand and Carsignol et al. 2019), while mesh size of such fences is typically relatively large (in general greater than 60×60 mm).

When research demonstrated the major role that roads play in habitat fragmentation and its negative impact on the populations of many species (and not only large mammals), further mitigation measures were implemented. These mitigation measures are designed to reduce roadkill (i.e. fences) and restore population connectivity (i.e. wildlife passages) to allow safe movements on different parts of the habitats separated by the road for various small fauna, such as reptilian (turtle), amphibian (frog and toad), small (shrew) and medium-sized mammalian species (hares, foxes, badgers, etc.) (Aresco 2003; Glista et al. 2009; Klar et al. 2009; Jarvis et al. 2019; Plante et al. 2019). For these species, different fences (made from wire netting, concrete, PVC or metal) were designed and often installed alongside the large-fauna fences. In Western Europe, wire netting fences (with a typical mesh size of 6.5×6.5 mm and a height of 40 to 60 cm) are most often used to block small fauna, and are usually attached to the large-fauna fences (Iuell et al. 2003; Puky 2003; Beebee 2013; Morand and Carsignol et al. 2019). Similar to the large-fauna fences, these small-fauna fences coupled with a wildlife passage are needed to manage the reconnection of populations in areas of high biodiversity (Clevenger et al. 2001; Iuell et al. 2003; Beebee 2013; Testud and Miaud 2018).

Some species are more sensitive than others and require special attention during the planning of infrastructure, such as roads. For example, amphibians are particularly

vulnerable to roadkill due to their mass migration strategy (Joly 2019; Cayuela et al. 2020) and their immobility when facing motor vehicles (Gibbs and Shriver 2005; Mazerolle et al. 2005). Amphibians are of particular concern, since globally 41% of all amphibian species are threatened with extinction (IUCN 2021). Small mammals are also of concern, since they often use the side of roads as refuge, especially in a highly modified landscape (Ruiz-Capillas et al. 2013; Jumeau 2017). While the impact of road mortality on populations of these small mammalian species may not appear problematic, because their population densities are generally high, this is not always the case. Studies show that some of these species are declining at an alarming rate and are now considered endangered, like the garden dormouse (*Eliomys quercinus*) or the European hamster (*Cricetus cricetus*) (Surov et al. 2016; Bertolino 2017). Hence, roadkill of wildlife is an important issue that has to be addressed in an overall conservation strategy (O'Brien 2015; Pinot et al. 2016).

Research objectives

To avoid roadkill of various small-fauna species, such as amphibian and small mammalian species, road managers in Western Europe frequently install wire netting fences alongside roads. Because of their low costs and easy installation, they may seem an attractive measure in roadkill prevention. However, to the best of our knowledge, the effectiveness of such fences to stop amphibian and small mammalian species from entering the road has rarely been tested under controlled conditions (Dodd et al. 2004; Woltz et al. 2008; Brehme et al. 2021). The goal of our study was to experimentally test the effectiveness of wire netting fences to block small fauna, preventing passage into roads. We hypothesized that a wire netting fence will not be appropriate for “agile” species, which might be able to climb the fence (e.g. mice) or jump over it (e.g. frogs), while it will be effective for other species (e.g. hamsters, voles). We further hypothesized that the inclusion of an overhang (i.e. back-bending the top wire netting) will improve its effectiveness. Finally, our study focused on the effectiveness of fences to stop animal road crossing, while studies investigating the effectiveness of such fences in guiding animals towards wildlife passages are lacking and should be encouraged.

Materials and methods

Protocol

This study presents the combined results from four independent experiments that were conducted between 2015 and 2020. While the individual protocols and the group of individuals used (adults/juveniles) differed to some degree between studies, they all shared the same general principle. In each study, individuals were placed in an arena for a pre-determined duration, from which they could only exit by crossing the fence

under investigation. During that period, animals were monitored continuously with an infrared video-camera, so that individual behaviour and the success or failure of passage could be determined.

All studies used a wire netting fence with a mesh size of 6.5×6.5 mm. However, studies differed with respect to fence height (30 or 40 cm, which corresponds to the height typically found along roads in Alsace), the presence or absence of an overhang and its length (from 2 to 15 cm), the tested species, the number of individuals used per test, and the time given to individuals to escape the arena (30 min, 10 or 12 hours). The latter was due to behavioural differences between species and the requirements imposed by the various capture and ethical permits. (Table 1; see Suppl. material 1, for the exact protocol of each study). With the exception of the study concerning the European hamster, the length of the overhang was varied to test its effect on passage success. The greatest length of the overhang was tested first (15 cm or 10 cm, depending on the study) and decreased gradually in subsequent trials, once all individuals had been tested for a given length. Given the nocturnal activity patterns of the tested species, all experiments were conducted during the night, spanning the summers from 2015 to 2020.

Species were selected according to their mode of locomotion. The following species were tested (Table 1): (1) two small mammalian species, considered to be ‘non-agile’, the European hamster and the common vole, both of which are good runners but have limited jumping abilities; (2) one ‘agile’ small mammal, the wood mouse, which has good climbing and jumping abilities; (3) one ‘agile’ amphibian species, the marsh frog, with good jumping abilities; and, lastly, (4) one ‘non-agile’ amphibian species, the European green toad, which has limited jumping abilities. All tested individuals were captured from the wild for the purpose of the concerned study, except hamsters, which came from a local breeding centre. However, only European green toads were maintained in captivity after capture (for 3 and 15 days for juveniles and adults, respectively, since they participated in a further study). All other captured species were released immediately after the end

Table 1. Summary of the species tested and experimental set-up (for more details, see SM).

| Species | Origin of animals | N | Height of netting fence tested (cm) | Length of the overhang (cm) | Body length (mean±SEM) cm | Duration of experiment | Number of animals tested simultaneously |
|---------------------|-------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|---|---------------------------|---|
| European hamster | Laboratory | 26 (5♀ adults 8♂ adults & 13 juveniles) | 40 | 8 | 25.17±2.00 (adults) 19.88±1.37 (juveniles) | 12 h per individual | 1 |
| Common vole | Wild | 40 adults of each species (8 for each overhang length) | 30 | 0, 2, 5, 10, 15 | 9.16±0.68 | 30 minutes per individual | 1 |
| Wood mouse | Wild | 40 adults (8 for each overhang length) | 30 | 0, 2, 5, 10, 15 | 9.48±0.70 | 30 minutes per individual | 1 |
| Marsh frog | Wild | 40 adults (8 for each overhang length) | 30 | 0, 2, 5, 10, 15 | No data. | 30 minutes per group | 8 adults |
| European green toad | Wild | 39 (9♂ adults & 20 juveniles), the same for both the 0 or 10 cm overhang | 40 | 0 or 10 (only for adults) | 5.94±0.67 (adults) - 1 cm (juveniles) | 10 hours per group | 9 for adults & 20 for juveniles |

of testing. The total number of individuals that could be used for experimentation was limited by capture/ethical permits. Before experimentation, individuals were measured and weighed, and sex was determined in all species tested, except marsh frogs. The capture and housing protocols are detailed in the Suppl. material 1. All manipulations were carried out after obtaining the legal authorizations for capture and transport, and the approval of the different protocols by the Ethical Committee (see Suppl. material 1).

Methods

Each time an individual was placed in the arena, alone or with conspecifics, the result of the passage test was recorded either as success (if the individual successfully crossed the fence by climbing or jumping over it) or as failure (if the fence was not crossed). For each overhang length tested, the proportion of crossing success (mean \pm SEM) was calculated for all individuals tested at that specific overhang length. In the case of the European hamsters and European green toads, test results from adult and juvenile animals were kept separate. For both amphibian species, animals were tested as groups, which prevented to recognize the crossing success of individuals. Given the differences in the experimental protocol of the various species (i.e. individual/group testing, presence/absence and dimensions of the overhang), we present results from all experiments without statistical testing. Nevertheless, we believe that the results are explicit, even in the absence of statistical analysis.

Results

Effectiveness of wire netting fences

Without an overhang, all species were able to cross the fence. The crossing success rate varied between 45% for juvenile green toads and 100% for wood mice, marsh frogs and adult green toads (Table 2). Hamsters were not tested without an overhang. Since crossing success rate of juvenile hamsters was 100% for a fence with a 10 cm overhang

Table 2. Crossing success rates for wire netting fences.

| Species | Locomotion type | Status | Fence height | Crossing success without overhang | Crossing success with an 8/10 cm overhang |
|---------------------|---|----------|--------------|-----------------------------------|---|
| European hamster | Running ⁺ | Adult | 40 cm | NA | 80% |
| | Running ⁻ | Juvenile | 40 cm | NA | 100% |
| Common vole | Running ⁻ | Adult | 30 cm | 87.5% | 0% (25% at 15 cm) |
| Wood mouse | Climbing ⁺ /Jumping ⁺ | Adult | 30 cm | 100% | 75% (100% at 15 cm) |
| European green toad | Jumping ⁻ | Adult | 40 cm | 100% | 0% |
| | Jumping ⁻ | Juvenile | 40 cm | 45% | NA |
| Marsh frog | Jumping ⁺ | Adult | 30 cm | 100% | 0% |

Without overhang, wire netting fences of 40 cm are not effective to stop the tested small mammals and amphibians. With a 10 cm overhang, the European hamster, Common vole and the Wood mouse can still climb over these fences. The '+' and '-' signs indicate the capabilities of the species, with the '+' sign indicating better performance than the '-' sign.

(and 80% for adult hamsters; Table 2), it is likely that both juvenile and adult hamsters would have crossed the fence lacking an overhang without problems. For the other species, the presence of an 8–10 cm overhang decreased the crossing success rate to 0% for green toads and common voles, but only to 75% for wood mice (Table 2).

In marsh frogs, crossing success dropped (from 100% to 12.5%) when the overhang reached a length of 5 cm and became zero at a 10 cm overhang. For the common vole, the introduction of an overhang reduced the crossing success substantially but some individuals were still able to cross the fence with a 15 cm overhang. The length of the overhang had little effect on the crossing rate of wood mice, which passed even at the greatest length tested.

How animals crossed the fence

Seven of the 20 juvenile green toads tested were able to pass through the 6.5 mm mesh of the wire netting. All other individuals of this species and all individuals of the other species tested that managed to pass the fence, did so by climbing it and not by jumping over it. European hamsters (the largest species tested) were able to pull themselves up onto the overhang by grabbing the end of the overhang and pulling themselves up using their front legs (i.e. without climbing along the overhang), once they reached the top of the fence. The same occurred in wood mice up to an overhang length of ~10 cm. For longer overhangs, wood mice climbed along the overhang, upside down, until they reached its far end, where they passed. The same behaviour was occasionally observed in juvenile hamsters.

Discussion

Our study, which experimentally investigated the effectiveness of wire netting fence to stop small terrestrial vertebrates (five species of small mammals and amphibians) from entering into road infrastructures, clearly demonstrates the limitations of such structures.

Without an overhang at the top of the wire netting fence, individuals of all tested species, adults and juveniles, were able to pass the structure. Clearly, wire netting fences without overhang should be avoided in future constructions. Furthermore, even the addition of an overhang only marginally increased the effectiveness of the wire netting fence in blocking the tested mammalian species. Individuals of all small mammal species tested were still able to cross the fence, including the common vole despite some difficulties, even with a long, 15 cm overhang. For example, hamsters were sufficiently large to reach the far end of the overhang, so that they could pull themselves up and cross the fence. However, some adult individuals were unable to cross the fence, which was likely explained by their body condition (i.e. these were the largest and heaviest adult hamsters). Since the hamsters tested were captive individuals from a breeding center, they were presumably fatter and less agile than wild hamsters. Wood mice were

able to reach the far end of the overhang by climbing along the mesh, upside down. However, changes in the design of the overhang structure, like the use of a solid structure (e.g. a metal plate), without gripping possibility, might prevent such small/agile species from crossing. Nevertheless, structures similar to the ones used in our study should be avoided, at least for small mammals.

By contrast, for amphibians, the tested wire netting fence might prove effective when combined with a 10 cm overhang. Adult individuals of European green toads and marsh frogs were unable to pass such a structure during our tests. However, since juvenile frogs were able to pass through the mesh of wire netting fences, even at a relatively small mesh size, their use should be avoided at the proximity of ponds. They should also be avoided when more “agile” amphibians, such as achieved jumping (i.e. Agile frog, *Rana dalmatina*) or climbing species (i.e. European tree frog, *Hyla arborea* or newts) are present. These species were not tested in our study but have been shown to easily cross a 40 cm concrete fence (Conan et al. 2021).

Given our current test results, we suggest to avoid the use of wire netting fence along motorways. In eastern France, 70.4% of overhangs of wire netting fences along motorways inspected by Jumeau (2017) had a length of less than 9 cm, which is lower than the 10 cm overhangs that proved effective for the tested amphibians in our study. The author explained this situation by a lack of information/communication on behalf of the work crews installing these fences along the roads. If during construction the fences were buried a few centimetres too deep, while fence height above ground was maintained, bending the top of the fence resulted in a too short overhang. In addition, the author reported that 78.2% of inspected fences, even recently built fences, showed signs of deterioration, such as broken mesh, too high vegetation (allowing animals to climb over the fence; Arntzen et al. 1995), as well as deteriorated or absent overhang. These results are especially troubling, since such a state will also reduce the effectiveness of fences for their second role, namely to guide animals to wildlife passages (Clevenger et al. 2001; Beebee 2013; Testud and Miaud 2018).

For several years, studies have highlighted the ineffectiveness of wire netting fences in excluding animals from road infrastructures, especially for amphibians (Schmidt et al. 2008; Testud 2020). Nevertheless, these fences are still being used along newly built roads, even when they are located in the dispersal corridors of endangered species (e.g. green toad and European hamster in Alsace, France). Therefore, we recommend that these fences should be replaced by viable alternatives. Opaque fences, for example, may be more effective in guiding small animals to the wildlife passages, and experimental tests to confirm this are urgently needed. It is, however, important to note that effective fences can impact the movement of individuals on both sides of a road and consequently lead to a decrease in gene flow if individuals are unable to reach wildlife passages (e.g. newt; Matos et al. 2018). In this context, testing the effectiveness of structures to guide animals to wildlife passages is needed in controlled and field conditions while an increase in the number of wildlife passages might also be necessary.

Conclusions

Wire netting fence between 30 and 60 cm is a commonly used mitigation device to prevent small vertebrate species from entering/crossing roads and reduce roadkill. This study showed that its effectiveness is very limited. Accordingly, we suggest that this device should be avoided and replaced by more effective and durable fences.

Ethics approval

All manipulations were carried out after obtaining the legal authorizations for capture and transport (2019-DREAL-EBP-0031) and a certificate permitting the detention of wildlife species in captivity (DDPP67-SPA-E-FSC-2019-04). The experimental protocol was approved by the ethics committee (CREMEAS and Ministry) under the agreement number (#18546-2019011810282677 v7).

Acknowledgements

We thank all the students who participated in this study and anonymous reviewers for their valuable comments. We thank Manfred Enstipp for the English editing. Special thanks to Frederic Voegel and Laurence Feltmann. This study was funded by the French Minister of Ecology (DREAL Grand-Est), the Région Grand-Est, and the Collectivité européenne d'Alsace (CcA). They had no role in the study design, writing, collection, analysis and interpretation of data. They agree to the publication of this study.

References

- Aresco MJ (2003) Highway mortality of turtles and other herpetofauna at Lake Jackson, Florida, USA, and the efficacy of a temporary fence/culvert system to reduce roadkills. In: Irwin CL, Garrett P, McDermott KP (Eds) Proceedings of the International Conference on Ecology and Transportation; 2003 August 24–29, Lake Placid, NY.
- Arntzen JW, Oldham RS, Latham DM (1995) Cost effective drift fences for toads and newts. *Amphibia-Reptilia* 16(2): 137–145. <https://doi.org/10.1163/156853895X00316>
- Beebee TJC (2013) Effects of road mortality and mitigation measures on amphibian populations. *Conservation Biology* 27(4): 657–668. <https://doi.org/10.1111/cobi.12063>
- Bertolino S (2017) Distribution and status of the declining garden dormouse *Eliomys quercinus*. *Mammal Review* 47(2): 133–147. <https://doi.org/10.1111/mam.12087>
- Billeter R, Liira J, Bailey D, Bugter R, Arens P, Augenstein I, Aviron S, Baudry J, Bukacek R, Burel F, Cerny M, De Blust G, De Cock R, Diekötter T, Dietz H, Dirksen J, Dormann C, Durka W, Frenzel M, Hamersky R, Hendrickx F, Herzog F, Klotz S, Koolstra B, Lausch A, Le Coeur D, Malfait JP, Opdam P, Roubalova M, Schermann A, Schermann

- N, Schmidt T, Schweiger O, Smulders MJM, Speelmans M, Simova P, Verboom J, Van Wingerden WKRE, Zobel M, Edwards PJ (2008) Indicators for biodiversity in agricultural landscapes: A pan-European study. *Journal of Applied Ecology* 45(1): 141–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01393.x>
- Bissonette JA, Rosa SA (2009) Road zone effects in small-mammal communities. *Ecology and Society* 14(1): art27. <https://doi.org/10.5751/ES-02753-140127>
- Bouffard M, Leblanc Y, Bédard Y, Martel D (2012) Impacts de clôtures métalliques et de passages fauniques sur la sécurité routière et le déplacement des orignaux le long de la route 175 au Québec. *Naturaliste Canadien* 136(2): 8–15. <https://doi.org/10.7202/1009100ar>
- Brehme CS, Tracey JA, Ewing BAI, Hobbs MT, Launer AE, Matsuda TA, Cole Adelsheim EM, Fisher RN (2021) Responses of migratory amphibians to barrier fencing inform the spacing of road underpasses: A case study with California tiger salamanders (*Ambystoma californiense*) in Stanford, CA, USA. *Global Ecology and Conservation* 31: e01857. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01857>
- Bruinderink GWTAG, Hazebroek E (1996) Ungulate Traffic Collisions in Europe. *Conservation Biology* 10(4): 1059–1067. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10041059.x>
- Cayuela H, Valenzuela-Sánchez A, Teulier L, Martínez-Solano Í, Léna J-P, Merilä J, Muths E, Shine R, Quay L, Denoël M, Clobert J, Schmidt BR (2020) Determinants and consequences of dispersal in vertebrates with complex life cycles: A review of pond-breeding amphibians. *The Quarterly Review of Biology* 95(1): 1–36. <https://doi.org/10.1086/707862>
- Clevenger AP, Chruszcz B, Gunson KE (2001) Highway mitigation fencing reduces wildlife-vehicle collisions. *Wildlife Society Bulletin*: 646–653.
- Conan A, Le Brishoual M, Garnier L, Fleitz J, Dehaut N, Georges J-Y, Jumeau J, Handrich Y (2021) Road mortality mitigation measures: fences for amphibians. The infrastructure and Ecology Network Europe (IENE) conference, 12–15 January 2021, Online (Talk).
- Dodd CK, Barichivich WJ, Smith LL (2004) Effectiveness of a barrier wall and culverts in reducing wildlife mortality on a heavily traveled highway in Florida. *Biological Conservation* 118(5): 619–631. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2003.10.011>
- Eigenbrod F, Hecnar SJ, Fahrig L (2007) Accessible habitat: An improved measure of the effects of habitat loss and roads on wildlife populations. *Landscape Ecology* 23(2): 159–168. <https://doi.org/10.1007/s10980-007-9174-7>
- Forman RTT, Sperling D, Bissonette JA, Clevenger AP, Cutshall CD, Dale VH, Fahrig L, France RL, Goldman CR, Heanue K (2003) *Road ecology: science and solutions*. Island press, Washington DC.
- Gibbs JP, Shriver WG (2005) Can road mortality limit populations of pool-breeding amphibians? *Wetlands Ecology and Management* 13(3): 281–289. <https://doi.org/10.1007/s11273-004-7522-9>
- Glista DJ, DeVault TL, DeWoody JA (2009) A review of mitigation measures for reducing wildlife mortality on roadways. *Landscape and Urban Planning* 91(1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2008.11.001>
- IUCN (2021) IUCN Red List of Threatened Species, Summary Statistics. <https://www.iucn-redlist.org/resources/summary-statistics> [Accessed on 15.11.2021]

- Iuell B, Bekker GJ, Cuperus R, Dufek J, Fry G, Hicks C, Hlaváč V, Keller VB, Rosell C, Sangwine T, Tørsløv N, Wandall B le Maire [Eds] (2003) Wildlife and traffic: A European handbook for identifying conflicts and designing solutions. KNNV Publishers, UK.
- Jarvis LE, Hartup M, Petrovan SO (2019) Road mitigation using tunnels and fences promotes site connectivity and population expansion for a protected amphibian. *European Journal of Wildlife Research* 65(2): 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1263-9>
- Joly P (2019) Behavior in a Changing Landscape: Using Movement Ecology to Inform the Conservation of Pond-Breeding Amphibians. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7: e155. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00155>
- Jumeau J (2017) Les possibilités de dispersion et éléments d’habitat-refuge dans un paysage d’agriculture intensive fragmenté par un réseau routier dense : le cas de la petite faune dans la plaine du Bas-Rhin. PhD Thesis, University of Strasbourg, Strasbourg, France.
- Klar N, Herrmann M, Kramer-Schadt S (2009) Effects and Mitigation of Road Impacts on Individual Movement Behavior of Wildcats. *The Journal of Wildlife Management* 73(5): 631–638. <https://doi.org/10.2193/2007-574>
- Laist DW, Knowlton AR, Mead JG, Collet AS, Podesta M (2001) Collisions between ships and whales. *Marine Mammal Science* 17(1): 35–75. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2001.tb00980.x>
- Matos C, Petrovan SO, Wheeler PM, Ward AI (2018) Short-term movements and behaviour govern the use of road mitigation measures by a protected amphibian. *Animal Conservation* 22(3): 285–296. <https://doi.org/10.1111/acv.12467>
- Mazerolle MJ, Huot M, Gravel M (2005) Behavior of amphibians on the road in response to car traffic. *Herpetologica* 61(4): 380–388. <https://doi.org/10.1655/04-79.1>
- Morand A, Carsignol J (2019) Amphibiens et dispositifs de franchissement des infrastructures de transport terrestre. CEREMA, Connaissances 58.
- O’Brien J (2015) Saving the common hamster (*Cricetus cricetus*) from extinction in Alsace (France): Potential flagship conservation or an exercise in futility? *Hystrix*: 26.
- Pinot A, Barraquand F, Tedesco E, Lecoustre V, Bretagnolle V, Gauffre B (2016) Density-dependent reproduction causes winter crashes in a common vole population. *Population Ecology* 58(3): 395–405. <https://doi.org/10.1007/s10144-016-0552-3>
- Plante J, Jaeger JAG, Desrochers A (2019) How do landscape context and fences influence roadkill locations of small and medium-sized mammals? *Journal of Environmental Management* 235: 511–520. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.093>
- Puky M (2003) Amphibian mitigation measures in Central-Europe. In: Irwin LC, Garrett P, McDermott KP (Eds) *Proceedings of the International Conference on Ecology and Transportation, The Center for Transportation and the Environment, Raleigh, North Carolina (24–29 August, 2003), Lake Placid, New York*, 413–429.
- Rao RSP, Girish MKS (2007) Road kills: Assessing insect casualties using flagship taxon. *Current Science*: 830–837.
- Romin LA, Bissonette JA (1996) Deer: vehicle collisions: status of state monitoring activities and mitigation efforts. *Wildlife Society Bulletin*: 276–283.

- Ruiz-Capillas P, Mata C, Malo JE (2013) Road verges are refuges for small mammal populations in extensively managed Mediterranean landscapes. *Biological Conservation* 158: 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.09.025>
- Schmidt S, Schmidt BR, Zumbach S (2008) Amphibian road mortality and how to prevent it: A review. *Herpetological Conservation* 3(Cha): 157–167.
- Schwabe KA, Schuhmann PW, Tonkovich M (2002) A dynamic exercise in reducing deer-vehicle collisions: Management through vehicle mitigation techniques and hunting. *Journal of Agricultural and Resource Economics* 27: 261–280.
- Surov A, Banaszek A, Bogomolov P, Feoktistova N, Monecke S (2016) Dramatic global decrease in the range and reproduction rate of the European hamster *Cricetus cricetus*. *Endangered Species Research* 31: 119–145. <https://doi.org/10.3354/esr00749>
- Testud G (2020) Étude de la perméabilité de la LGV Bretagne – Pays de la Loire (BPL) aux déplacements des amphibiens. Université Paris sciences et lettres.
- Testud G, Miaud C (2018) From effects of linear transport infrastructures on amphibians to mitigation measures. *Reptiles and Amphibians*, 85. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74857>
- Woltz HW, Gibbs JP, Ducey PK (2008) Road crossing structures for amphibians and reptiles: Informing design through behavioral analysis. *Biological Conservation* 141(11): 2745–2750. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.08.010>

Supplementary material I

Supplementary materials and methods

Authors: Antonin Conan, Julie Fleitz, Lorène Garnier, Meven Le Brishoual, Yves Handrich, Jonathan Jumeau

Data type: docx. file

Explanation note: In the following we provide details for the four separate studies conducted. Each study used a different experimental set up, which was adapted to the species tested.

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/natureconservation.47.71472.suppl1>

Discussion de l'étude 4 :

Cette étude est à notre connaissance la seule s'intéressant à l'efficacité des clôtures en grillage métallique en conditions contrôlées. Cela est curieux sachant que la majorité des routes françaises présente ce type de clôture et que son utilisation est même contestée dans la littérature (Arntzen *et al.* 1995 ; Schmidt *et al.* 2008). Malgré ça, les aménageurs continuent à utiliser ce type de clôture, facile d'installation, peu cher, mais facilement altérable. À l'heure où les aménageurs s'engagent sur une obligation de résultats et non plus sur une obligation de moyens¹ concernant les mesures environnementales de leurs projets, une telle étude est aujourd'hui indispensable pour informer les acteurs routiers de l'inefficacité de ces clôtures.

En effet, pour l'ensemble des espèces testées, la majorité des individus arrivent à franchir la clôture en grillage métallique lorsqu'elle n'est pas munie d'un bavolet. En présence d'un bavolet, l'efficacité est toutefois améliorée mais la fragilité de ces clôtures ne permet pas de conserver le bavolet effectif sur le long terme. Par conséquent, ce type de clôture ne doit plus être utilisé le long des infrastructures de transport pour limiter les mortalités routières.

À noter que certains aménageurs ayant pris conscience à la fois de leur obligation de résultats et de la fragilité des grillages, utilisent un nouveau type de clôture. Il s'agit d'un sandwich de plusieurs grillages métalliques à différentes tailles de mailles, le sandwich formé par simple accrochage via agrafes permet de rigidifier la structure. Toutefois, lors de nos prospections de terrain, nous avons observé à plusieurs reprises des individus de Crapaud vert coincés entre ces grillages (**Figure A**). Cette solution n'est donc pas viable car pourrait entraîner la création de pièges physiques mortels pour ces individus. Il est donc primordial de tester d'autres types de clôtures, plus pérennes afin de stopper l'ensemble des espèces d'amphibiens.



Figure A : Crapaud vert coincé entre deux clôtures en grillage métallique

¹ Obligation de moyens : l'aménageur s'engage à mettre tous les moyens dont il dispose pour exécuter le contrat. Il n'est pas obligé d'atteindre un résultat. Depuis la loi Biodiversité de 2016, l'obligation de résultats a remplacé l'obligation de moyens pour la mise en œuvre de la séquence éviter-réduire-compenser.

Étude 5 : Efficacité d'une clôture permanente de protection de la faune pour limiter la mortalité routière des amphibiens.

Cette étude a fait l'objet d'une publication soumise en septembre 2022 dans la revue « Ecological Applications » et qui est actuellement en révision.

Résumé :

Suite aux résultats et recommandations de l'étude précédente sur les clôtures en grillage métallique, nous nous sommes ensuite focalisés sur l'efficacité de clôtures plus pérennes. Dans cette étude, nous avons alors testé des clôtures en béton et en tôle galvanisée, munies ou non de bavolets. Comme pour l'étude précédente, les tests ont été réalisés en arène mais cette fois uniquement sur 5 espèces d'amphibiens adultes et juvéniles.

Les espèces testées ont été choisies en fonction de leur mode de locomotion pouvant être plus ou moins agiles (*e.g.* crapaud vs rainette), permettant d'extrapoler les résultats à n'importe quelle espèce ou presque d'amphibien moderne. Les résultats montrent que les espèces les moins agiles ne franchissaient pas une hauteur de clôture en béton de 13 cm et 24 cm respectivement pour le Crapaud calamite et Crapaud vert. Cette hauteur était réduite pour ces mêmes espèces à 10 et 17 cm avec l'ajout d'un bavolet métallique de 10 cm. Par ailleurs, les espèces plus agiles (Grenouille agile et Rainette verte américaine) ont franchi une clôture en béton de 40 cm de haut, mais les rainettes ont été arrêtées à 35 cm de haut par le bavolet. Les résultats pour la clôture en métal galvanisé avec bavolet étaient similaires à ceux obtenus pour la clôture en béton avec bavolet. Enfin, les juvéniles ont franchi une hauteur maximale de 20 cm de clôture en béton en l'escaladant uniquement lorsque la paroi était humide. Par conséquent, pour empêcher les amphibiens de traverser les routes, nous recommandons la construction de clôtures durables (en béton ou en métal galvanisé) et bien entretenues d'une hauteur minimale de 40 cm (ou plus en fonction des espèces) avec un bavolet de 10 cm, afin qu'ils puissent être guidés vers le passage à faune le plus proche.

Efficacy of permanent wildlife fences to mitigate amphibian roadkill

Conan, Antonin^{1,2*}, Le Brishoual, Meven¹, Garnier, Lorène¹, Fleitz, Julie^{1,3}, Dehaut, Nathan^{1,2}, Enstipp, Manfred¹, Jumeau, Jonathan², Handrich, Yves¹

¹ Université de Strasbourg, CNRS, IPHC, UMR7178, F-67000 Strasbourg, France

² Collectivité européenne d'Alsace, CERISE, Place du Quartier Blanc, 67964 Strasbourg, Cedex 9, France

³ Société Cofiroute, Centre autoroutier de l'Ackerland, 67117 Ittenheim, France

*Corresponding author.

E-mail address: antonin.conan@iphc.cnrs.fr

Abstract

To mitigate habitat fragmentation and roadkill, roads are increasingly equipped with wildlife fences and underpasses. However, the effectiveness of such fences in preventing road access for amphibians has not been tested under controlled conditions. In 2019 and 2020, we tested the efficacy of full panel fences of differing shape, height and material, without or with additional overhang, to prevent the crossing of adult and juvenile individuals belonging to five amphibian species. Species were selected according to locomotion mode: Natterjack toads (*runners*), European green toads (*short-distance jumpers*), agile frogs (*proficient jumpers*), American tree frogs (*proficient climbers*) and smooth newts (*climbers*). We found that species representing the *running* and *short-distance jumping* mode were unable to cross a concrete fence with a height of 13 and 24 cm, respectively. Addition of a 10 cm overhang reduced height further to 10 and 17 cm, respectively. By contrast, good jumping and good climbing species were not stopped by the greatest fence height tested (40 cm). However, addition of the overhang stopped the good climbers (tree frogs) at a concrete fence height of 35 cm. With some species we also tested an alternative metal fence (with overhang), which performed similar to the concrete fence with overhang. Finally, juveniles passed a maximal concrete fence height of 20 cm by climbing. Hence, to stop amphibians from crossing into roads, we recommend the construction of durable (concrete or galvanized metal) and well-maintained fences with a minimum height of 40 cm with a 10 cm overhang, so that they can be guided to the nearest wildlife underpass.

Keywords: wildlife passages, mitigation, amphibian mortality, road ecology

1. Introduction

Linear transport infrastructures, such as roads, are a threat to biodiversity and one of the most significant causes of landscape fragmentation (Maxwell *et al.* 2016). These structures lead to habitat loss, roadkill, and disrupt the movement of animals by creating ecological barriers (Fahrig *et al.* 1995; Forman & Alexander 1998). All taxa are impacted by roads (Forman & Alexander 1998) but some are particularly sensitive to them. According to the IUCN (2021), habitat fragmentation is the most significant threat to amphibians, affecting 76 of the 85 species found in Europe (Stuart *et al.* 2004; Maxwell *et al.* 2016). Amphibians undertake spring and autumn migrations, which renders them particularly sensitive to roads between the various key areas of their life cycle (Wilbur 1980; Miaud *et al.* 2000; Semlitsch 2008; Joly 2019; Cayuela *et al.* 2020). Roads disrupt the movement of individuals between local populations and, furthermore, increase mortality through roadkill, potentially leading to the extinction of amphibian populations (Fahrig *et al.* 1995; Dodd *et al.* 2004; Testud & Miaud 2018; Joly 2019).

To limit roadkill and restore connectivity, mitigation measures have been implemented. These measures are numerous and include, for example, traffic and speed reduction, road closures and wildlife passages (Schmidt *et al.* 2008; Rytwinski *et al.* 2016; Testud & Miaud 2018). The last measure is often associated with fences (e.g. wire netting, plastic mesh, or full panel concrete or metal), constructed to prevent animals from venturing onto roads and guide them instead towards passages (under/overpasses), where they can safely cross a road (Schmidt & Zumbach 2008; Carvalho *et al.* 2017; Arntzen *et al.* 2017; Testud & Miaud 2018). These fences are typically designed for large fauna (large mesh-size), such as ungulates (e.g. deer; Fahrig *et al.* 1995; Romin & Bissonette 1996; Clevenger & Waltho 2000; Forman *et al.* 2003; Dodd *et al.* 2004; Kenneth Do Glista *et al.* 2009), but often contain additional components (fences with a small mesh-size), to stop amphibians and small mammals (Carsignol *et al.* 2019). Large fauna fences have been relatively well studied (i) because they are of obvious interest for human safety (Romin & Bissonette 1996; Schwabe *et al.* 2002; Forman *et al.* 2003; Bouffar *et al.* 2012) and (ii), because their effectiveness can be easily demonstrated by monitoring the number of collisions between ungulates and vehicles. For small fauna, different types of fences have been used but their effectiveness has rarely been studied. The few studies that have been carried out suggest a low efficacy of such fences (Dodd *et al.* 2004; Woltz *et al.* 2008; Brehme *et al.* 2021; Conan *et al.* 2022). For example, Arntzen *et al.* (1995) tested the effectiveness of plastic mesh fences to avoid amphibian road crossings. They found that plastic fences reduced the number of crossings by 35 to 70% for toads and by 34 to 48% for newts. The findings of

the above and further studies indicate that plastic mesh fences allow a relatively high number of amphibians to pass and, in some cases, do not reduce roadkill (Arntzen *et al.* 1995; Baxter-Gilbert *et al.* 2015; Ottburg & van der Grift 2019). Another type of small wildlife fence regularly found along roads is a wire netting fence (with adapted mesh size). It suffers from the same defects as the plastic mesh fence; it deteriorates quickly and is easily climbed and passed by small-mammals and amphibians (Conan *et al.* 2022). Non-mesh (full panel) fences, constructed with different materials (e.g. PVC, concrete and metal), have also been used alongside roads. Such fences are fairly durable, overcoming the problem of fast deterioration and are, therefore, increasingly recommended (Dodd *et al.* 2004; Crasignol *et al.* 2019; Conan *et al.* 2022). However, to the best of our knowledge, only one study tested their efficacy for amphibians under controlled conditions (Zbierski and Schneeweiß, 2003). That study, which tested the efficacy of different shapes of full panel concrete fences for European tree frogs (*Hyla arborea*), found that the most effective shapes are difficult to build and expensive to maintain (Zbierski and Schneeweiß, 2003).

Research objectives

In the current study, we investigated the efficacy of different types of full panel fences in preventing road crossing with five European amphibian species. We tested fences (1) made from two types of materials (concrete or galvanized metal) (2) of different height, and (3) without or with a horizontal metal overhang. For generalization, the five species were selected according to their mode of locomotion (i.e. runner/jumper/climber) and developmental stage (adult and juvenile). We further tested fences in a dry or wet state (simulating the most common meteorological conditions) and also considered individual biometric measurements in our analysis.

We expected that: (1) A fence height exists that prohibits the crossing for all amphibian species tested (effective fence height; H_{eff}) and this height will differ between fence types; (2) given the differences in locomotion mode of the species/developmental stages tested, H_{eff} will differ between species/developmental stages; (3) the presence of an overhang will improve the efficacy of fences tested; (4) wetting of the fence will increase the crossing capacity of climbers; (5) the larger size and/or better body condition of some individuals will allow them to pass fences at a greater height than others.

2. Materials and methods

2.1. Model species, capture conditions and temporary captivity

Five amphibian species with different modes of locomotion in the adult stage were used in our study (**Tab. 1**): The Natterjack toad (*Epidalea calamita* Laurenti, 1768) moves by running on the ground; the European green toad (*Bufo viridis* Laurenti, 1768) advances by small steps (low height/length ratio); the American tree frog (*Dryophytes cinereus* Schneider, 1799) is a good climber, due to its adhesive toepads (good adhesion on smooth surfaces, Li *et al.* 2021), and the agile frog (*Rana dalmatina* Fitzinger in Bonaparte, 1839) makes powerful jumps. The smooth/common newt (*Lissotriton vulgaris* Linnaeus, 1758) walks on the ground but can also climb walls by adhesion to the substrate. Given the low weight and small size of juveniles, we assumed that juveniles of all species tested will be able to climb walls by adhesion. Hence, the behaviour when crossing a vertical obstacle might differ between the developmental stages of species tested. To avoid any potential impact of experimentation on females gravid with eggs, only males were included at the adult stage (see Test protocol).

Due to the national lockdown that occurred during the first Covid-19 outbreak in France (March-May 2020), we were unable to capture wild European tree frogs (*Hyla arborea* Linnaeus, 1758). Given their morphological similarity, we used American tree frogs (*Dryophytes cinereus*) as a substitute species. The lockdown also prevented us to complete trials with Natterjack toads and agile frogs, so that only two fence types were tested with these species (concrete without or with a 10 cm overhang).

With the exception of American tree frogs that were purchased from a pet store ('La ferme tropicale', Paris, France), all individuals of the other species (both stages) were captured near their breeding sites during their terrestrial phase (see **Tab. 1** for the number of individuals and capture dates). To minimize any potential effect on local populations, we captured individuals only at breeding sites with a sufficiently large population and which were close to the place of experimentation. Individuals were collected by hand (with gloves) or with a net during nocturnal patrols. After experimentation, all individuals were released at the site of capture, following a maximum of 35 days in captivity.

Tab. 1: Information on studied species and capture dates

| Species | Stage | Sex | N | Mode of locomotion | Origin | Capture date |
|--|----------|------|----|--------------------------|----------|----------------|
| Natterjack toad (<i>Epidalea calamita</i>) | adult | Male | 12 | running | Field | July 2019 |
| | juvenile | ND* | 20 | climbing | Field | July 2019 |
| European green toad (<i>Bufo viridis</i>) | adult | Male | 12 | jumping (short-distance) | Field | June 2020 |
| | juvenile | ND* | 20 | climbing | Field | July 2020 |
| American tree frog (<i>Dryophytes cinereus</i>) | adult | Male | 8 | climbing (proficient) | Pet shop | September 2020 |
| Agile frog (<i>Rana dalmatina</i>) | adult | Male | 15 | jumping (long-distance) | Field | March 2020 |
| | juvenile | ND* | 20 | climbing | Field | June 2019 |
| Smooth newt (<i>Lissotriton vulgaris</i>) | juvenile | ND* | 20 | climbing | Field | July 2019 |

* Not determined

Four Natterjack toads of each sex were used in separate preliminary tests.

To allow individual tracking during experimentation, a RFID PIT tag (1.4 x 9 mm; TAG LF GLT1M4X9 RO EM, Biolog-ID®, Bernay, France) was implanted into adults at the time of capture. Following implantation, the following morphological measurements were taken from adults: (1) body-mass in g (BM), (2) snout-vent length in mm (SVL, from the snout to the tip of the ischium) and (3) extension length in mm (EL, the length of the straight line between the tips of hindlimbs and forelimbs, with both limbs extended, i.e. elongation size). Body mass was determined with a spring balance (0-50 g, resolution: 0.5 g, accuracy: ± 0.3 g; Pesola®, Schindellegi, Switzerland), while SVL was measured using an electronic caliper (0-150 mm, accuracy: ± 0.03 mm, Tesa technology®, Renens, Switzerland). The precise measure of EL was difficult with active amphibians, so it was rounded to the nearest 5 mm using a tape measure (Dexter, Lezennes, France). A body condition index (BCI) was calculated for all species

following Green (2001), using the individual residuals of the linear regressions between Ln(BM) and Ln(SVL).

Throughout captivity, individuals were kept in 800x600x435 mm polypropylene tanks with perforated lids (Euronorm container 12.4046.07 AXESS industries®, Strasbourg, France). Individuals were housed together according to species and developmental stage. The maximum number of individuals per tank was 20 (i.e. juveniles). The tanks were enriched with moist, sandy soil and fresh moss. Flat tiles and stones provided hiding places for individuals. Finally, during experimentation (which coincided with the breeding season), food was available *ad libitum* in the tanks (e.g. earthworms (*Lombriidae*, ~5 cm), wax moth (*Galleria mellonella*, ~2 cm) and crickets (*Acheta domesticus*, ~1 cm).

All procedures were carried out after obtaining the authorizations for capture and transport (2019-DREAL-EBP-0031) and a certificate for the detention of the various species in captivity (DDPP67-SPAE-FSC-2019-04). The experimental protocol was approved by the French Ethical Committee (CREMEAS) and the French Ministry of Environment: ‘Ministère de la Transition Écologique’ under agreement number (APAFIS #18546-2019011810282677.v7).

2.2. Experimental setup

2.2.1. Test arena

All tests were conducted in an arena built from PVC (60x80x70 cm, width*length*height; **Figs. 1 & 2**). The arena consisted of three compartments: (1) the ‘departure’ compartment (~60x30 cm) had a bare concrete floor (*i.e.* unattractive), while the (2) ‘arrival’ compartment (~60x40 cm) was enriched with wet soil and moss, hides made of bricks and a small pool filled with freshwater. The latter was added as an attractive reward and has been used to that end in learning experiments with toads (Dall’Antonia & Sinsch 2001; Daneri *et al.* 2007). On the rear side of the ‘arrival’ compartment a speaker (Pulsar® 2x3 W speaker, Enkhuizen, Netherlands) replayed calls from *Epidalea calamita* & *Pelophylax spp.*, to motivate amphibians to cross the fence. Male calls (conspecific or not) are known to attract all resident amphibian species (Gerhardt 1995; Yeager *et al.* 2014; Muller & Schwarzkopf 2017). Adjacent to the ‘arrival’ compartment was (3) a further compartment (~60x10 cm) that hosted two males of the tested species, which added to the acoustic stimulus provided by the speaker, while also potentially relaying visual and olfactory cues. The first two compartments were separated by the fauna fence to be tested (concrete or galvanized metal fence), while the last

compartment was separated from the arrival compartment by a perforated Plexiglass plate (**Fig. 1**). The top of the arena was covered with a regularly perforated Plexiglass lid to allow for good ventilation and its openings were covered with netting. An air ventilation system (Pump KNF N840.1.2FT.18, Freiburg im Breisgau, Germany) provided appropriate ventilation throughout the arena and also allowed for an exchange of scent throughout the system (i.e. amphibians in the departure compartment likely smelled their conspecifics in the last compartment). To test the effect that moisture might have on the crossing capacity of amphibians, half of the length of the fence tested (concrete and galvanized metal) was fitted with a water circulation system (aquarium pump; Neptus Mini P300®, Italy) that permanently wetted this part of the fence (**Fig. 2**).

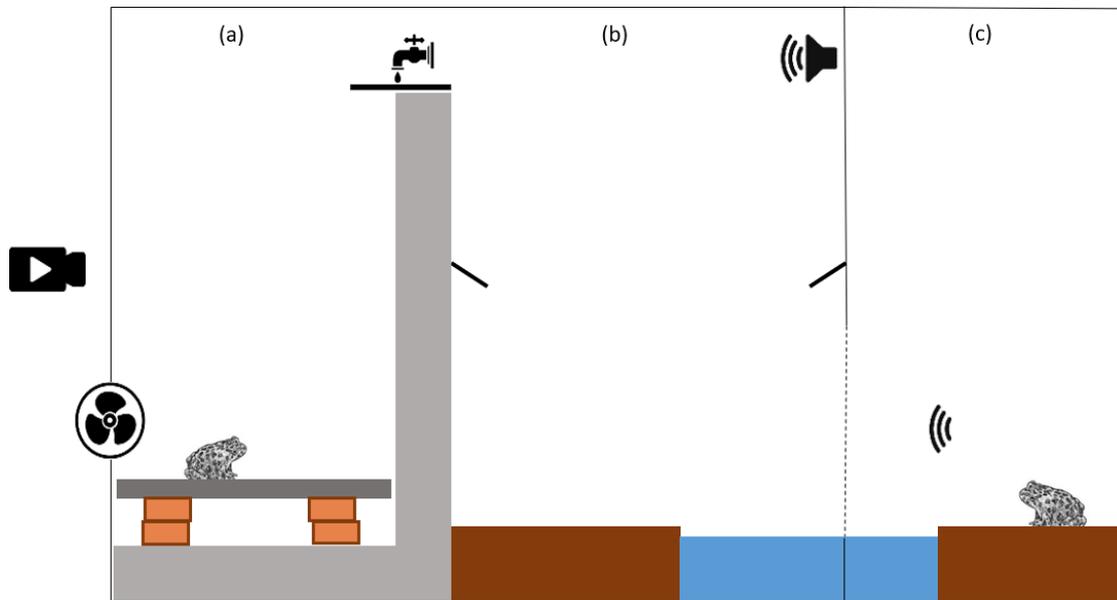


Fig. 1: Illustration of the experimental arena. The aquatic part is shown in blue, the enriched soil in brown, the fauna fence is shown in grey and the overhangs are represented by solid black lines. The iconography from left to right: camera; ventilation system; species tested; water inlet to wet fence; loudspeaker; singing male. (a) 'departure' compartment (not enriched) with a movable concrete base (shown in dark grey) that allowed modification of test height (see also Fig. 3); (b) 'arrival' compartment, enriched with sandy soil and moss; (c) compartment with singing males, separated from the 'arrival' compartment by a perforated Plexiglass plate (covered with a net), allowing the exchange of visual and olfactory cues in addition to auditory stimulation. Overhangs in the 'arrival' compartment were added to prevent individuals that crossed the fence to return to the 'departure' compartment.

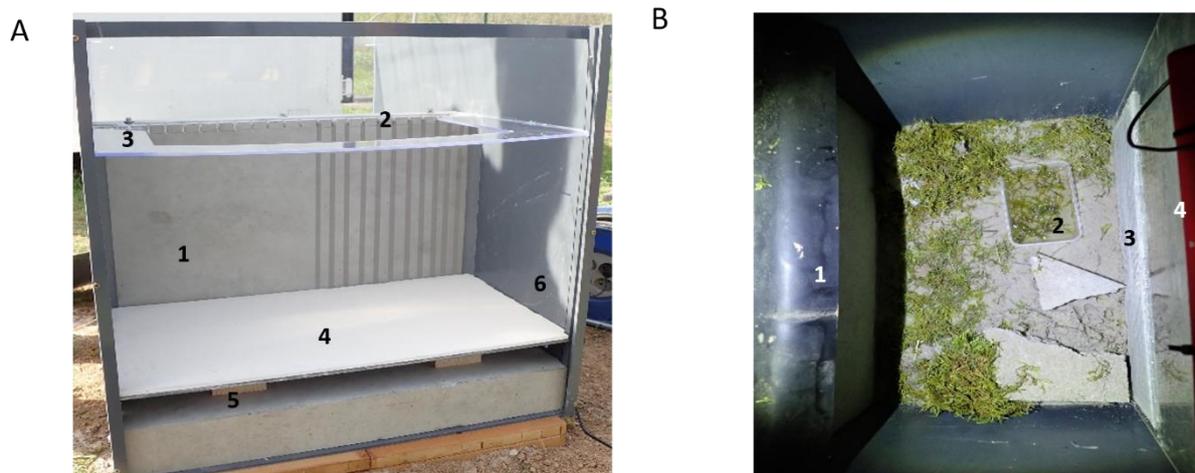
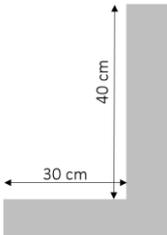


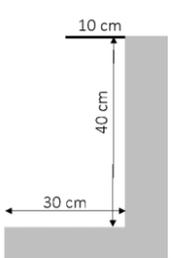
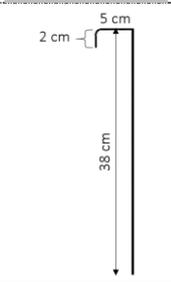
Fig. 2: Experimental arena. (A) Frontal view of the ‘departure’ compartment: (1) dry part of the vertical concrete fence tested; (2) wet part of the vertical fence tested; (3) anti-escape Plexiglass plate; (4) movable concrete base (30x50cm, width*length), allowing to adjust fence height; (5) wooden blocks for height adjustments; (6) transparent frontal Plexiglass plate allowing video recording; (B) Aerial view of the ‘arrival’ compartment: (1) Overhang made from a 7.5 cm wide PVC sheet, that was fixed 5 cm below the top of the fence and bent downwards (inclination angle: ~75°), to prevent animals from returning to the ‘departure’ compartment; (2) small water tank placed among other enrichments: sand, wet moss, hides made of bricks; (3) opening in Plexiglass plate (covered with a mesh) enabling ventilation throughout all compartments; (4) speaker that replayed calls of *Epidalea calamita* & *Pelophylax* spp., to stimulate amphibians to cross the fence.

2.2.2. Tested obstacles

Three full panel fence types were tested: (1) a concrete fence without overhang (Crt), (2) a concrete fence with a 10 cm horizontal overhang (Crt+) and, lastly, (3) a fence of galvanized metal (Galv) with a bent overhang that extended 5 cm horizontally and 2 cm downwards (**Tab. 2**). To allow testing of different fence heights, the movable base of the departure compartment was mounted onto a varying number of wooden blocks, altering the distance to the top of the fence (**Fig. 3**). As stated above, due to the Covid crisis lockdown, we were unable to test all fence types with all species/developmental stages.

Tab. 2: Overview for the three different fence types tested

| Fence type | Shape | Dimensions | Tested species/developmental stage |
|---------------------------------|---|--|--|
| (1) simple concrete fence (Crt) |  | Height: 40 cm Base: 30 cm Overhang: none | <i>E. calamita</i> : adults & juveniles <i>B. viridis</i> : adults & juveniles <i>R. dalmatina</i> : adults & juveniles <i>D. cinereus</i> : adults <i>L. vulgaris</i> : juveniles |

| | | | |
|---|---|---|--|
| <p>(2) concrete fence with a horizontal overhang (Crt+)</p> |  | <p>Height: 40 cm Base: 30 cm Overhang: 10 cm (horizontal)</p> | <p><i>E. calamita</i>: adults <i>B. viridis</i>: adults <i>R. dalmatina</i>: adults <i>D. cinereus</i>: adults</p> |
| <p>(3) galvanized metal fence (Galv) with a bent overhang</p> |  | <p>Height: 38 cm Base: none Bent overhang: 5 cm horizontal + 2 cm downwards</p> | <p><i>B. viridis</i>: adults <i>D. cinereus</i>: adults</p> |

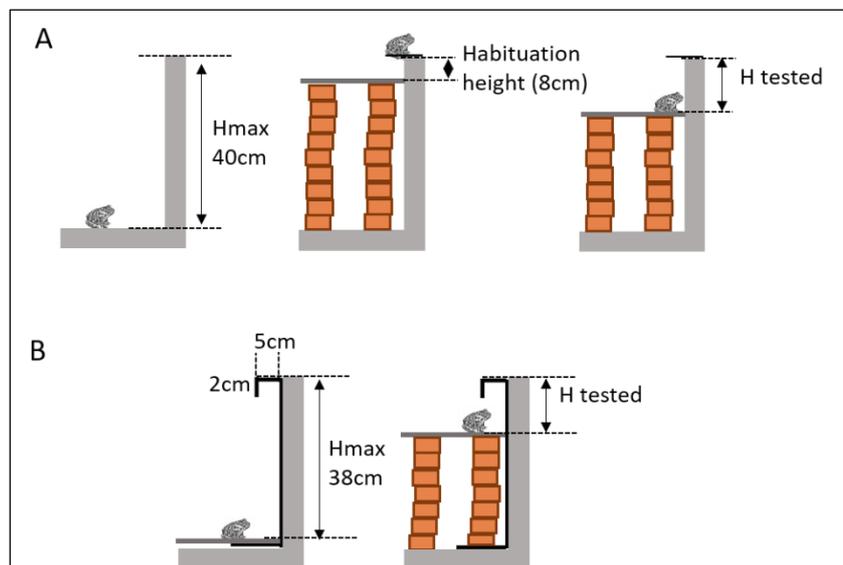


Fig. 3: Setup to test the capacity of amphibians to cross different fence types and heights. We used wooden blocks to adjust the concrete base to the desired fence height to be tested. All tests with adult amphibians started with a habituation height of 8 cm, before height was increased in the following trials. (A) Concrete fence tests: H_{max} (the maximal height tested) was 40 cm, without or with an overhang of 10 cm; (B) Galvanized metal fence tests: H_{max} was 38 cm; this fence type had a bent overhang (5 cm horizontal+ 2 cm downwards).

2.3. Test protocol

2.3.1. Preliminary tests

To verify that the arena was functional (*i.e.* no escapes), we conducted preliminary tests with four male and with four female Natterjack toads (separate tests). Individuals were placed into the ‘departure’ compartment at a fence height of 8 cm (*i.e.* habituation height, which corresponds to the height of a sidewalk, which amphibians cross easily) and their behaviour

was recorded with infrared cameras (HIKVISION DS-2CD2655FWD-IZS, Hangzhou, China). During these tests, 2 of the 4 females started to oviposit outside the water and without the presence of males in their compartment. To limit any potential impact of our experimentation on wild populations, we excluded adult females from experimentation. Size differences between sexes are little in Natterjack toads, European green toads and tree frogs (Leskovar *et al.* 2006; Oromi *et al.* 2012). Accordingly, any potential bias in our results, due to testing males only, should be limited for these species. Female agile frogs are typically larger than males (~14%; Angelini *et al.* 1995), so that we cannot exclude a potential bias in our results for this species. However, given our results, this concern is irrelevant (see below).

2.3.2. *Experimental trials*

The primary goal of our trials was to find the lowest effective fence height (H_{eff}) for all fence types tested (Crt, Crt+, Galv; **Tab. 2**) that prevented crossing for individuals of all species and developmental stage.

During experimental trials, individuals were tested in groups of 8, 10 or 20 individuals of the same species and developmental stage (**Tab. 1**). The difference in numbers resulted from permit limitations for adults (N=10) and the inability to purchase more than 8 tree frogs, while we were able to include a greater number of juveniles (N=20) per species. At the start of a trial, animals were placed into the ‘departure’ compartment at the end of a day (9:30 PM) and had until the following morning (7:30 AM) to cross the fence. During the entire trial duration, calls were replayed from the speaker (looped recording), callers were present inside the last compartment and a video camera recorded continuously (**Fig. 1**). The following morning, after completion of a trial, the number of individuals that had managed to cross the fence were removed from the ‘arrival’ compartment, counted and identified (RFID tags in adults only). Thereafter, all individuals that participated in a trial were transferred back to their holding tanks. To allow animals to familiarize themselves with the setup, a fence height of 8 cm (i.e. habituation height, **Fig. 3**) was used during the first night for each group (except juveniles, see below). Following that first night, animals were tested for a maximum of three consecutive nights for a particular height. We started with the maximum height possible for the different fence types (40 cm for the concrete fence types and 38 cm for the galvanized metal fence) and iteratively decreased or re-increased height in the following trials, depending if individuals failed or succeeded to cross. As soon as at least one individual managed to cross a particular height during one night, height was increased during the following night. For example, if amphibians failed to cross the 40 cm fence for 3 consecutive nights, the following night, fence

height was adjusted to half the difference between the habituation height (8 cm) and the maximal height (40 cm), hence, to 16 cm ($32/2$ cm). If one individual managed to cross at that height, fence height was increased to 24 cm ($16+8$ cm). Testing continued until H_{eff} was found for a given species, stage, and type of fence.

Apart from slight modifications indicated below, testing conditions for juveniles of all four species were identical to adults. Juveniles were tested in groups of 20 individuals and with a strict limitation on the duration of experimentation. Given the fragility of amphibians during their juvenile stage, we limited experimentation to 3 consecutive nights and did not offer a habituation trial, as in adults. The first night, the height to be crossed was set to 40 cm with a 10 cm overhang (maximum difficulty possible to test with our setup), which was never reached by climbing juveniles. To estimate the greatest height reached by juveniles, we attached a measuring bar to the concrete fence (Fig. 4), that was clearly visible in the video footage. During the following 2 nights, fence height was set to half the height reached by climbing juveniles during the previous night (as identified from video footage), to encourage successful crossing. Unfortunately, no further height increments could be tested because of the set time limit for experimentation with juveniles. This also prevented us from testing the concrete fence with overhang and the metal fence with juveniles.

Following a trial, we viewed the recorded video footage to identify how individuals crossed the fence. Our protocol was designed to strongly motivate individuals to cross the fence. Besides call replays, the presence of conspecifics (callers) in the last compartment and the enrichment inside the arrival compartment, trial durations were long (10 h) and each height was tested during a maximum of 3 consecutive nights (if amphibians failed to cross). Hence, we assume that a fence height not crossed during our experimentation will not be crossed in the wild.

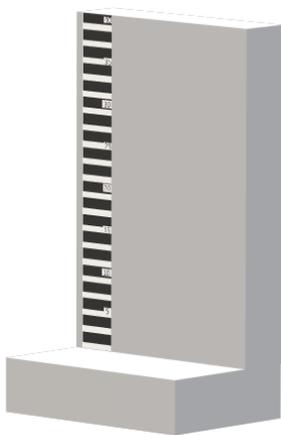


Fig. 4: A measuring bar was fixed to the concrete fence element, to determine the greatest height reached by climbing juveniles.

2.4. Analysis and statistics

2.4.1. Test of protocol efficacy

To ensure that our protocol sufficiently motivated individuals to cross the fence and to further quantify the number of crossing attempts of individuals, we conducted a behavioral analysis on 10 h of video footage from European green toads and Natterjack toads. We chose footage from unsuccessful trials (i.e. no individuals passed the fence), selected Individuals randomly and studied how the number of crossing attempts varied between individuals. Since adult amphibians were implanted with an RFID tag, we could investigate individual differences in crossing success and also determine if crossing failures were likely explained by height or differences in motivation. For example, it is possible that individuals pass at a greater height but fail to do so at a lower height, simply because they were not motivated to cross.

2.4.2. Effective fence height (H_{eff})

Our goal was to experimentally determine H_{eff} for all conditions and species/developmental stages, hence, we consider further statistical determination obsolete. However, we conducted a path analysis to investigate the effect of biometric variables of adult amphibians on H_{eff} for trials with the concrete fence without an overhang. Path analysis investigates the relationship between variables in a diagram and was used to test for a correlation between the fence height individuals managed to cross and their body size. For variables found to significantly affect H_{eff} , we plotted linear regressions and smoothed curves. Path analysis and graphs were conducted with R (v3.5.3, RStudio v1.2.1335 and GraphPad Prism 8.2.1. All results are presented as means \pm SEM.

3. Results

3.1. Test of protocol efficacy

During the 10 h of video recording we analyzed, all individuals engaged in crossing attempts. We recorded 735 and 344 unsuccessful crossing attempts of European green toads and Natterjack toads, respectively. On average, individual green toads made 8.4 attempts per hour (range 4-13), while Natterjack toads engaged in 3.9 attempts per hour (range 3-11). The frequency of crossing attempts remained stable throughout the night in both species. Considering all tests conducted, 50% of European green toads, failed to cross at a lower height but managed to cross at a greater height later on, while this did not occur in Natterjack toads.

However, similar to the green toads, agile frogs (80%) and American tree frogs (75%) passed at a greater height after having failed to cross at a lower height.

3.2. Efficacy of fence types in preventing amphibian crossings

The effective fence height (H_{eff}) for all species and developmental stages tested with different fence types is shown in **Tab 3**. Only the most nimble species tested (agile frogs and American tree frogs) were able to cross a full panel concrete fence (without overhang) at a height of 40 cm (the maximum height we could test). Furthermore, addition of a 10 cm overhang decreased the crossing success for all species, except for agile frogs (Crt vs Crt+; **Fig.5 and Tab 3**). However, given the height limitations, we were unable to determine the effective fence height for the concrete fence without overhang for agile and tree frogs. In the following we will present results separately for the most nimble species, the remaining toad species, and all juveniles.

Tab. 3: Time line for experimental tests according to species and development stage

| Groups tested | | Test duration (number of consecutive nights) | | | | Smallest effective fence height: H_{eff} (cm) | | |
|---------------------|-------|--|-----------------------------------|---|-------|--|--|---|
| Species | Stage | Test 1= concrete without overhang | Test 2= concrete + overhang | Test 3= galvanized fence (with overhang) | Total | Concrete without overhang (‘Crt’) | Concrete with overhang (‘Crt+’) | Galvanized fence (‘Galv’) + overhang |
| Natterjack toad | AD | 9 | 4 | Nt* | 13 | 13 | 10 | Nt* |
| European green toad | AD | 20 | 7 | 8 | 35 | 24 | 17 | 19 |
| American tree frog | AD | 5 | 10 | 5 | 20 | > 40 | 35 | 36 |
| Agile frog | AD | 2 | 2 | Nt* | 4 | > 40 | > 40 | Nt* |
| Smooth newt | Juv | 3 | Nt* | Nt* | 3 | 21 | Nt* | Nt* |
| Natterjack toad | Juv | 3 | Nt* | Nt* | 3 | 12 | Nt* | Nt* |
| European green toad | Juv | 3 | Nt* | Nt* | 3 | 0 | Nt* | Nt* |
| Agile frog | Juv | 3 | Nt* | Nt* | 3 | 16 | Nt* | Nt* |

* Not tested

AD: Adult

Juv: Juvenile

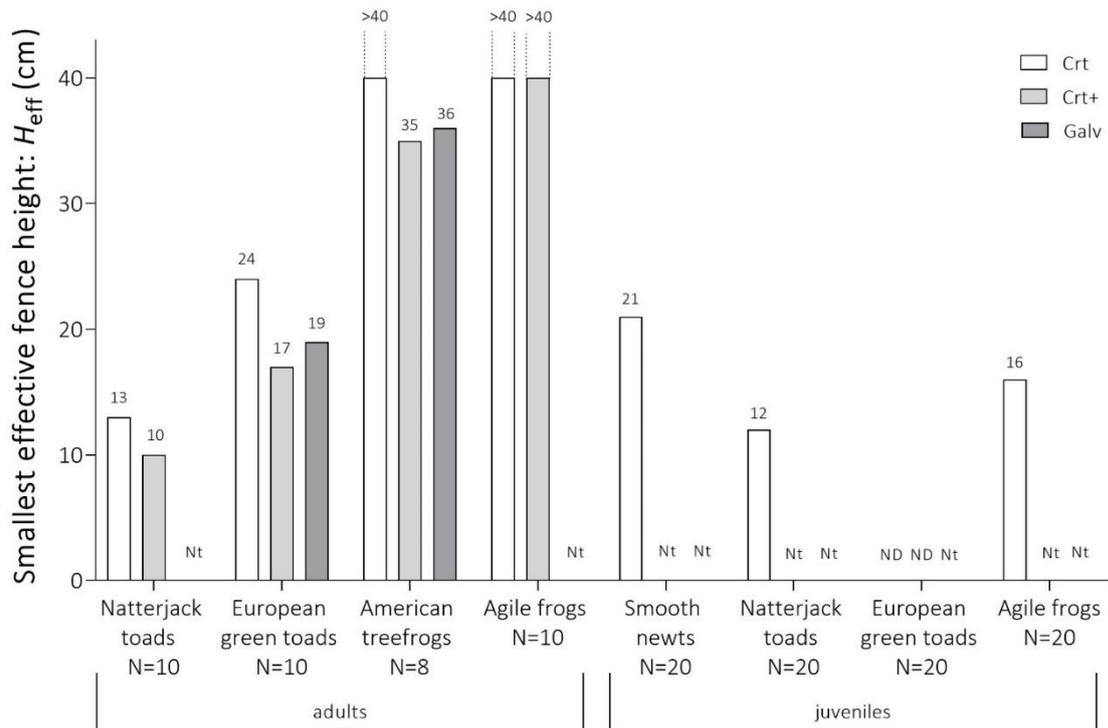


Fig. 5: Smallest effective fence height (H_{eff}) for the amphibian species/developmental stages tested that prevented them to cross over various fence types, as indicated by different bar colours (white: simple concrete fence (Crt); light gray: concrete fence with a 10 cm horizontal overhang (Crt+); dark gray: galvanized fence (Galv) with a bent overhang). Note that not all fence types could be tested with all species/developmental stages, as indicated by 'Nt' (not tested). Juvenile green toads never attempted to cross the fences tested, so that we could not determine H_{eff} in that case, as indicated by ND (not determined).

3.2.1. Adult agile frogs (proficient jumpers) and American tree frogs (proficient climbers)

With a single direct jump, agile frogs were able to reach the top of the concrete fence. However, they required a sufficient minimum distance to the fence (~30 cm), especially when jumping in a straight fashion towards it. Successful attempts at maximum fence height were mostly sideway jumps, when individuals took advantage of the 60 cm width of the compartment (see **Fig. 2**) to increase distance to the fence, so that they could reach a sufficient height during the jump. The presence of an overhang, which reduced the distance by 10 cm, did not prevent any individuals from reaching the top of the 40 cm Crt+ fence. Fence crossing in this species often involved two steps: firstly, an individual would jump to the 'Anti escape Plexiglas sheet' (see #3 in **Fig. 2**), located at a height of 40 cm, and then jump further to the top of the fence or even directly into the 'arrival' compartment. The greater distance possible when jumping first to the Plexiglass plate possibly contributed to the ease with which agile frogs reached the fence top. However, such a strategy is likely irrelevant in the context of wildlife fences, when such a structure will not be present. Unfortunately, the galvanized fence type could not be tested with agile frogs.

Similar to the situation for agile frogs, the 40 cm concrete fence (without overhang) was no challenge for the American tree frogs and they passed over it during the first night of testing (**Fig. 5**). However, they used a different mode of locomotion; rather than jumping, they climbed the concrete fence and showed no preference for the wet or dry part of the fence. In addition, tree frogs developed a different mode to cross the fence after ~8 nights. Individuals would climb the smooth PVC sidewalls or the smooth frontal Plexiglass plate and then jump onto the fence top or right into the arrival compartment. Hence, unfortunately, when testing the concrete fence with overhang (Crt+), tree frogs did not try to cross the 40 cm fence directly but used their newly developed mode instead. Nonetheless, one individual passed the overhang via the direct fence route at a height of 35 cm. Testing the galvanized fence (Galv) with the tree frogs showed that the 2 cm downward component of the overhang (see **Fig. 3.B**) was rather counterproductive. Frogs were able to cling to it and, by stretching out, they managed to reach the fence top and cross over the fence. Nevertheless, tree frogs were unable to cross the maximal metal fence height of 38 cm directly. Similar to the Crt+ tests, frogs only managed to cross at that height by climbing the side walls and then jumping over the metal fence.

3.2.2. Adult Natterjack toads (runners) and European green toads (short distance jumpers)

The only way adult Natterjack toads managed to cross the tested fences was by stretching out and pulling themselves up and over the fence top. By contrast, adult green toads often jumped onto the fence and then stretched themselves towards the top to cross over. Given the jumping advantage of green toads, they managed to cross all fence types at a greater height than Natterjack toads (**Fig. 5** and **Tab. 3**).

3.2.3. Juvenile amphibians

The only mode by which juveniles attempted to cross the concrete fence without overhang (the only type tested with juveniles) was by climbing. Juvenile European green toads were the exception and never attempted to cross the fence. However, the juveniles of all other species were able to climb the fence by adherence of their extremities. Interestingly, they never tried to climb the dry part of the fence but focused entirely on its wet part. With the exception of the green toads, all juveniles were able to climb to a height equivalent to more than 10 times their size (SVL ~1 cm; **Fig. 5**, **Tab. 3**). However, no juveniles were able to cross a fence height greater than 20 cm.

3.3. Effect of biometric variables on minimum effective height (H_{eff})

Path analysis for adult trials of the concrete fence without overhang showed that elongation length (EL) was positively correlated with H_{eff} in the less nimble Natterjack and green toads ($\rho = 0.40$; $p = 0.01$; Figs. 6 & 7).

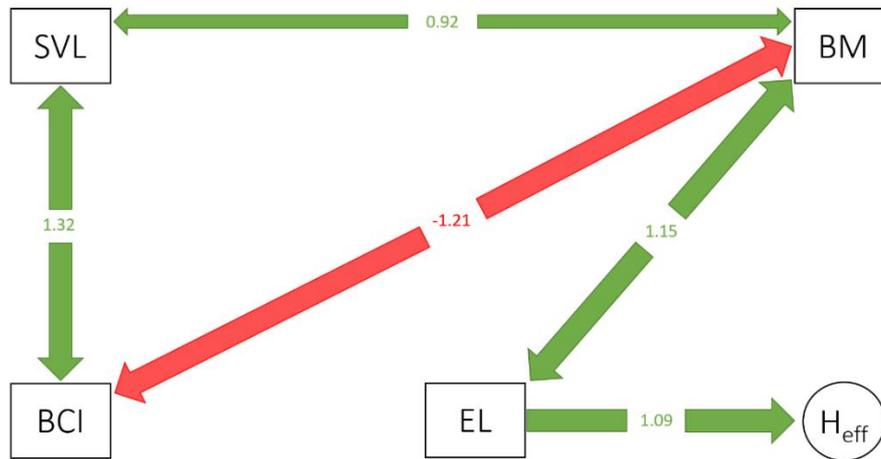


Fig. 6: Path analysis diagram illustrating the effect of biometric variables on the minimum effective height (H_{eff}) that prevented all less agile species (adult Natterjack and green toads) to cross the concrete fence without overhang. Variables tested: BM = Body mass; BCI = Body Condition Index; SVL = snout-vent length; EL= elongation length. Arrows indicate significant links between variables, positive in green and negative in red, for all species tested as adults. The standardized estimates are indicated along their respective paths. Only significant pathways are indicated in this diagram ($p < 0.05$). EL was the only variable significantly correlated with H_{eff} .

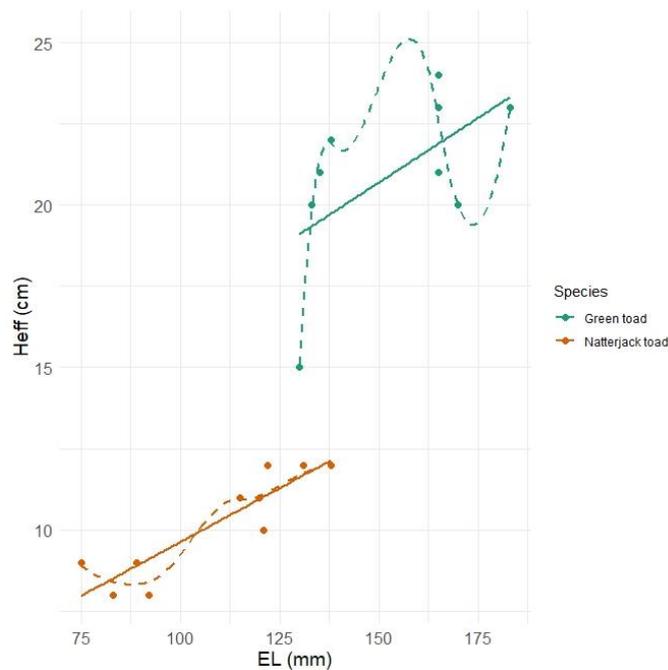


Fig. 7: Relationship between elongation length (EL) and minimum effective height (H_{eff}) that prevented adult Natterjack and green toads from crossing the concrete fence without overhang ($N=10$ for both species). Solid lines indicate the linear regressions, while dashed lines indicate the smoothed curves. There was a positive relationship for both species between EL and H_{eff} ($\rho = 0.40$; $p = 0.01$).

4. Discussion

Our experiments showed that the height of the fence types tested was sufficient to stop adult individuals of species representing the *running* and *short-distance jumping* mode (Natterjack and European green toads), as well as all juveniles from crossing. Addition of an overhang (in case of the concrete fence) further reduced height at which these species were able to cross the fence. By contrast, proficient jumping and climbing species (American tree frogs and agile frogs) were not stopped by the greatest fence height tested. However, addition of an overhang stopped the proficient climbers (tree frogs) at a height below the maximal tested height, while it had no effect on agile frogs. An alternative galvanized metal fence (with overhang), which we tested with some species, performed similar to the concrete fence with overhang. Finally, climbing juveniles were only able to pass a concrete fence at about half its maximal height and only when it was wet.

In our setup, amphibians were highly motivated to cross the barrier separating the departure and arrival compartment. When failing repeatedly to cross at a particular height, individuals nevertheless continued to try. Crossing attempts in such cases ranged between 3 and 13 per hour for the two toad species tested. Furthermore, if amphibians failed to cross at a particular height, they were given two more nights (3 consecutive nights per test height in total). A sufficient time frame for testing is important, since motivation to cross might not be identical throughout trials. For example, we observed that individuals of all adult species, except Natterjack toads, failed to cross the fence at a lower height but managed at a greater height soon after. Accordingly, results from a previous study that are based on only 6 hours of testing and without replicates should be treated with caution, as they might underestimate the crossing capacity of species (Zbierski and Schneeweiß, 2003). By contrast, we believe that our setup was well suited to test the crossing capacity of amphibians.

As expected, we found that the effective fence height (H_{eff}), i.e. the minimal height at which amphibians failed to cross, differed according to locomotion mode. However, in contrast to our most fundamental expectation, a concrete fence without overhang (Crt; maximal height tested: 40 cm) was only sufficient to stop the adults of the less nimble species, like toads (green toads and Natterjack toads) and all juveniles but failed to prevent the crossing of agile frogs and tree frogs (**Fig. 5**). In case of the toads tested, larger individuals succeeded to cross at a greater fence height (**Fig. 6**). As expected, the addition of a 10 cm overhang (Crt+) increased the efficacy of the concrete fence, lowering effective fence height (H_{eff}) for the adults of all species where an overhang was tested, albeit, not for agile frogs (**Fig. 5**). Hence, in case of most

European amphibian species, road managers are left with the choice of a greater concrete fence height without overhang or a lower fence height with overhang. However, while an increase in fence height to, for example, 50 cm, may stop agile frogs, this will unlikely stop American tree frogs, unless an overhang is also installed. Accordingly, when more nimble species (agile frogs, tree frogs) are present, we strongly recommend the addition of an overhang to a fence. Such addition stopped the American tree frog, a species able to climb trees (Gourevitch & Roger 2018), at a fence height of 36 cm. Unfortunately, we were unable to test a fence height greater than 40 cm, so H_{eff} for agile frogs remains unknown, as they jumped across the greatest height tested, even in the presence of an overhang. This is likely of relevance for all proficient jumping amphibian species. Similar to previous recommendations (Moran & Carsignol 2019), we therefore suggest a fence height of a least 50 cm with the addition of a horizontal overhang. The width of the overhang is crucial and anything less than 10 cm might not work well for frog species (Conan *et al.* 2022).

When the installation of a concrete fence is not possible (due to high costs and/or the destructive nature of its construction), road managers have the option to install other fence types. These might be less expensive to install but might also be less durable. As a first choice, road managers often consider the use of wire-netting fences to stop small animals. However, they are fragile and, most importantly, useless in preventing the crossing of green frogs, European green toad and many small mammalian species (Conan *et al.* 2022). A better option might be the use of galvanized metal fences of the type we tested (i.e. with a 5 cm horizontal overhang and a 2 cm downward component; **Fig. 3**). Unfortunately, we were only able to test this fence type with green toads and tree frogs but H_{eff} was similar to that of the concrete fence with overhang (**Fig. 5**). However, the overhang was problematic for the tree frogs, since they could attach themselves to the downward bent and then cross over the fence, reducing the efficacy of this fence type. Unfortunately, the 2 cm downward bent of the overhang was a structural requirement for the prototype we tested. Nevertheless, increasing the horizontal dimension of this overhang (e.g. from a width of 5 to 10 cm) might improve its efficacy and should be tested.

The 40 cm concrete fence stopped all juvenile amphibians, despite their similar locomotion mode to that of tree frogs (i.e. climbing), which were able to pass such fence. Juveniles of all tested species were unable to reach a height greater than 10 to 20 times their body size (**Fig. 5**). Unfortunately, we were unable to test the effect of an overhang with juveniles. Such structural addition will limit the presence of water along a fence during rainy

weather (Schmidt & Zumbach. 2008), reducing fence wetting. The latter is of great importance, since in our trials juvenile amphibians only crossed over the wet part of the fence, as expected.

Our results are supported by previous studies indicating that durable and opaque structures are required to stop amphibians from crossing into roads and to guide them to the nearest wildlife passage (Brehme *et al.* 2021; Conan *et al.* 2022). A concrete fence equipped with a 10 cm overhang is an effective fence to stop the majority of amphibians present in Europe but only if it is well managed. In this context, we occasionally observed American tree frogs climbing the side walls of the arena, rather than the fence itself, from which they jumped over the fence, sideways. This is of great relevance for the situation on site. If the growth of sufficiently large/high vegetation near a fence is not prevented, tree frogs and similar climbing species will be able to overcome any type of fence. Hence, maintaining the vegetation near fences sufficiently small/low is essential to ensure the effectiveness of fences, especially in the case of climbing species (Speybroeck *et al.* 2018).

In our study we only addressed the situation of amphibian species. However, amphibians are not the only animals concerned by roadkill. Road mortality is also of concern for numerous other small animal species, such as small mammals, reptiles and also insects (Forman & Alexander 1998; Dodd *et al.* 2004; Baxter-Gilbert *et al.* 2015). However, few studies have addressed the efficacy of fences for these groups (Dodd *et al.* 2004) but instead have focused on the efficacy of the ensuing tunnels to facilitate road crossing (Dodd *et al.* 2004; Glista *et al.* 2009). Furthermore, the lack of rigorous experimental testing of fences often leads to approximate measures by road managers which are based on practice rather than scientific evidence, and this includes the situation for amphibians (Morand & Carsignol 2019).

In conclusion, a 40 cm concrete fence with a 10 cm overhang was effective to stop some of the amphibian species tested at the adult and juvenile stage (Bufonidae, Hylidae), while this was not the case for species with a great ability to jump (e.g. *Rana dalmatina*). Accordingly, for the latter group of species we recommend a concrete fence height of 50 cm as also suggested by Morand & Carsignol (2019). If, for whatever reasons, a full panel concrete fence cannot be used, we advise the use of a full panel galvanized metal fence with a height of 40 cm and an overhang of at least 10 cm



Aknowledgements

We thank all the students who participated in this study and anonymous reviewers for their valuable comments.

Author contributions

AC, JJ, & YH conceived the study and designed the methods; AC, MLB, ND & LG collected the data; AC analysed the data; AC drafted the manuscript with contributions from MLB, ND, LG, JF, ME, JJ & YH. All authors approve this version of the manuscript for publication. They agree to be accountable for the aspects of the work that they conducted, and will ensure that any questions related to the accuracy or integrity of any part of their work are appropriately investigated and resolved.

Discussion de l'étude 5 :

Cette étude est à notre connaissance la seconde étude qui s'est focalisée sur l'efficacité des clôtures en béton pour les amphibiens. La première est une étude allemande, publiée dans la littérature grise et réalisée avec des rainettes vertes sur des profilés en béton assez complexes (Zbierski and Schneeweiß, 2003). Les rainettes n'étaient déposées dans l'arène que 3 heures, or dans notre étude nous avons montré que les animaux sont motivés toute la nuit à essayer de franchir la clôture et que certains individus arrivent à la franchir lors de la seconde nuit de test uniquement. Il est donc nécessaire de réaliser ce type des tests sur une nuit complète (environ 10h) et sur plusieurs nuits pour une même hauteur et mêmes individus.

Par conséquent, les résultats obtenus dans l'étude allemande semblent sous-estimer les capacités de la rainette à franchir la clôture testée.

Enfin, mis à part pour les espèces capables de réaliser de grands sauts, on peut dire qu'une hauteur de clôture (qu'elle soit en béton ou en métal galvanisée) de 40 cm avec un bavolet de 10 cm permet de stopper une majorité des espèces d'amphibiens testées. Néanmoins, il faut être prudent avec la présence de végétation pouvant pousser à proximité de ces clôtures, car certaines espèces pourraient s'aider de cette végétation pour franchir la clôture (*e.g.* rainette). Pour finir, il faut savoir que nous avons tout fait pour motiver au maximum les individus à franchir la clôture, en réalité, il est concevable que les individus longent d'abord la clôture avant de tenter de l'escalader.

Nous avons le regret de ne pas avoir testé des hauteurs de clôture plus élevées pour les grenouilles agiles. Cela est dû tout d'abord à notre arène qui avait été initialement conçue pour une hauteur maximum de 40 cm. Néanmoins, j'ai réussi à augmenter la hauteur par l'ajout de briquettes, mais cela s'est fait la veille du confinement de 2020, et par conséquent les résultats n'étaient pas exploitables car il a fallu relâcher rapidement les individus. Il serait intéressant de rechercher cette hauteur afin d'avoir une idée d'une clôture type permettant de stopper l'ensemble des amphibiens de France et d'Europe. Enfin, ces clôtures ont également pour rôle de guider les animaux vers le passage à faune. Il serait également intéressant de se focaliser sur le comportement de guidage, car une étude indique que certaines espèces de tritons ne longent les clôtures que sur de faibles distances (~3 m ; Matos *et al.* 2018).

Conclusion du second chapitre

Dans ce chapitre, nous avons démontré que pour stopper de manière efficace les amphibiens il est nécessaire d'utiliser des clôtures pérennes, opaques, en béton ou en tôle métallique d'une hauteur minimale de 40 cm avec un bavolet de 10 cm

Ces clôtures seraient pertinentes dans le cas de passages à faune mais bien moins pour empêcher les amphibiens de rentrer dans un bassin d'orage. En effet, rendre ces ouvrages totalement imperméables aux amphibiens est impossible car les amphibiens pourraient toujours pénétrer dans les bassins par l'arrivée d'eau (avaloir) ou la sortie d'eau (exutoire). En plus, il n'est pas impossible que les amphibiens adultes ainsi que les pontes soient amenés dans l'eau par des oiseaux aquatiques. Cette hypothèse est revenue plusieurs fois, essentiellement donnée par des pêcheurs dont l'observation a déjà été faite sur des hérons empoisonnant des bassins.

En plus, chercher à entièrement priver les amphibiens de l'accès aux bassins d'orage peut être contreproductif. Dans les paysages modifiés où peu de zones humides persistent comme c'est le cas en plaine d'Alsace, fermer entièrement les bassins entraînerait une perte significative du nombre de sites de reproduction mais également de potentiels sites relais, objet du chapitre suivant.

Chapitre 3 : Intérêts des bassins d'orage routiers dans le déplacement des Crapauds verts

Étude 6 : Contribution des bassins d'orage à la connectivité paysagère : une étude de cas sur le Crapaud vert européen dans le Bas-Rhin, France

Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de préparation

Résumé :

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'intérêt des bassins d'orage dans le déplacement potentiel des Crapauds verts dans le paysage du Bas-Rhin. Pour ce faire, nous avons réalisé différents modèles de réseaux écologiques à partir de la théorie des graphes afin de simuler les conséquences que l'absence des bassins d'orage pourrait avoir sur les capacités de déplacement du Crapaud vert entre les différents sites potentiels de reproduction.

Pour ce faire, nous avons réalisé six modèles avec ou sans la présence de bassins d'orage (BO) et de mares semi-naturelles (MSN), mais également en faisant la distinction entre bassin d'orage routier (BO_R) et bassin d'orage industrielle (BO_I). Enfin, nous avons réalisé un modèle prenant en compte la présence de nouvelles routes, couplées aux bassins d'orage routiers construits à cette occasion.

Le principal résultat est que les BO (BO_R + BO_I) seraient aussi importants dans la connectivité que les MSN pour le Crapaud vert. Ils permettent à l'espèce de coloniser le paysage sur de larges surfaces (réduction des surfaces atteignables de 76,7% en l'absence des BO) et contribuent significativement à la connexion des populations (diminution de 35,8% de la probabilité de rencontre entre deux individus et division en 6 populations isolées de la population étudiée en l'absence des BO). Les BO ne sont toutefois pas totalement équivalents aux MSN car ils forment des groupes plus serrés par rapport à ces dernières réparties aléatoirement dans le paysage.

Les BO et notamment les bassins d'orage routiers, qu'ils soient ou non adaptés à la reproduction du Crapaud vert, sont donc centraux pour l'espèce dans la connectivité structurelle du paysage étudié.

Contribution des bassins d'orage à la connectivité paysagère : une étude de cas sur le Crapaud vert (*Bufo viridis*) dans le Bas-Rhin, France.

Antonin Conan^{1,2*}; Adèle Koetz²; Yves Handrich¹; Jonathan Jumeau²

¹ Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

² Collectivité européenne d'Alsace, CERISE, Place du Quartier Blanc, 67964 Strasbourg, Cedex 9, France

* Corresponding author:

Antonin.conan@iphc.cnrs.fr

1. Introduction

L'aménagement d'Infrastructures Linéaires de Transport (ILT) comme les routes et autoroutes entraîne non seulement une perte d'habitats naturels, mais induit également un morcellement et une modification de la connectivité des habitats résiduels (Fahrig 2003, 2017 ; Maxwell *et al.* 2016). Les déplacements des animaux en sont perturbés, allant jusqu'à un isolement des populations (Fahrig *et al.* 1995 ; Forman & Alexander 1998). Pour les amphibiens, cette perturbation est d'autant plus grande que leurs capacités de déplacement sont faibles, malgré une place prépondérante des déplacements dans leur cycle de vie (Stuart *et al.* 2004 ; Maxwell *et al.* 2016 ; Joly 2019 ; Cayuela *et al.* 2020). La distance entre les sites, qu'ils soient utilisés pour la reproduction, le nourrissage ou la brumation (période hivernale), détermine la capacité d'un individu à assurer un cycle complet et à la population de se maintenir (Joly 2019). De plus, la création d'ILT, formant des barrières plus ou moins perméables, entraîne des problèmes lors de la dispersion des individus, même entre des populations proches (Fahrig 2003).

Ainsi selon UICN (2021), 76 des 85 espèces présentes en Europe sont négativement impactées par la fragmentation du paysage (Stuart *et al.* 2004 ; Maxwell *et al.* 2016). Dans les paysages fortement modifiés comme les plaines et plateaux céréaliers, traversés par un réseau routier dense, les amphibiens utilisent parfois des sites de substitution comme sites relais, à la place des sites de reproduction historiques qui ont pu disparaître avec la modification des paysages (Sheehy *et al.* 2011). La présence de ces sites relais, qu'ils soient ou non considérés comme des habitats appropriés pour la reproduction d'une espèce, peut grandement améliorer la connectivité structurelle du paysage pour celle-ci (Paton 2012). Pour les amphibiens, les bassins d'orage routiers (BOR) retrouvés le long du réseau routier sont un exemple typique de site de substitution (Le Viol *et al.* 2012 ; Clevenot *et al.* 2018 ; Jumeau *et al.* 2020 ; Conan *et al.* 2021). L'effet bénéfique ou négatif de l'utilisation des bassins d'orage routiers comme site de reproduction par les amphibiens est toujours controversé (Sievers *et al.* 2018). D'un côté, en

collectant les eaux de ruissellement des routes polluées, les BO_R contiennent des sédiments pollués qui pourraient réduire drastiquement le succès reproductif des amphibiens (Sievers *et al.* 2018 ; Conan *et al.* en révision). De l'autre, plusieurs études ont montré que les BO_R pouvaient être colonisés par de nombreuses espèces avec des abondances importantes et des concentrations de polluants faibles dans leur eau (Jumeau *et al.* 2020 ; Clevenot 2020 ; Conan *et al.* 2021). Quoi qu'il en soit, les BO_R pourraient être utilisés comme sites relais étant donné le nombre disponible après la construction de chaque nouvelle route, formant de longs alignements en pas japonais, améliorant les chances de colonisation de proche en proche (Clevenot *et al.* en révision). En plus de ces BO_R, d'autres bassins d'orage (non associés à la pollution du trafic routier) sont disponibles au niveau de zones industrielles et commerciales (BO_I) et sont également utilisés par les amphibiens. Ces BO_I étant à la charge des industriels et des gestionnaires locaux, chaque usine et parking de commerce peut potentiellement en comporter un. Ils forment alors des groupes resserrés de sites de substitution dans le paysage. Bien que bien moins étudiés que les BO_R, les études récentes indiquent que les BO_I sont également utilisés par les amphibiens (Berna *et al.* 2021).

Le rôle bénéfique potentiel des BO_I et/ou des BO_R pour la connectivité des populations d'amphibiens reste toutefois à démontrer. Sans argument concret disponible (ni publication probante) et malgré la présence d'amphibien dans les BO, ces sites ne sont donc pas considérés, au sein des études environnementales par les autorités compétentes et les bureaux d'études, comme « habitats » pour les amphibiens. Une forte sous-évaluation des capacités de colonisation par les amphibiens de sites distants est donc possible, d'autant plus que peu d'études se sont intéressées au mouvement des amphibiens pendant leur phase terrestre (Eggert 2002 ; Trochet *et al.* 2019). Ces informations, pourtant cruciales pour inférer sur la biologie de la conservation de ces espèces, nous ont amené à étudier cette question.

Objectif de recherche

Dans cette étude, nous avons étudié la contribution respective de ces deux types de BO (BO_R : routiers et BO_I : industriels) à la connectivité paysagère structurelle (CPS) pour une espèce menacée : le Crapaud vert (*Bufo viridis viridis*) par rapport aux mares semi-naturelles favorables à l'espèce formant l'ensemble des principaux points de reproduction connus dans la zone d'étude (c'est-à-dire des : zones humides naturelles vraies, des sites de gestion d'eau pluviales de carrières, et des mares aménagées pour le Crapaud vert). Nous avons créé pour

cela des modèles de réseau écologique basés sur la théorie des graphes, permettant d'aborder les questions suivantes :

- Quel est l'apport des BO à la connectivité paysagère structurelle (CPS) ? Avec les hypothèses suivantes : (1a) Les BO contribuent de manière significative à la CPS paysagère pour le Crapaud vert et (1b) la création de nouvelles routes accompagnées de BO_R pourrait permettre la reconnexion de populations maintenant isolées, mais aussi d'étendre l'aire de distribution de l'espèce ;
- Quel apport relatif des BO par rapports aux mares semi-naturelles (MSN) ? Avec les hypothèses suivantes : (2a) les BO servent de sites relais si les MSN sont isolées ; (2b) Les BO_R, de par leur distribution en pas japonais le long des routes, contribuent-ils de façon plus importante à la connectivité paysagère que (i) les BO_I, localisés en « cluster » (regroupements concentrés de sites), ou que (ii) les MSN, localisés aléatoirement et à moindre densité dans le paysage.

2. Matériel et méthodes

2.1. Modèle et site d'étude

Le Crapaud vert (*Bufo viridis viridis*) a été utilisé comme modèle d'étude, car il présente une répartition bien identifiée dans la zone d'étude et que la plupart des sites de reproduction connus de l'espèce au sein de la zone d'étude sont localisés dans des bassins d'orage (Berna *et al.* 2021). Ces BO sont considérées comme sites de substitution car depuis la canalisation du Rhin au XX^e siècle, les sites favorables pour l'espèce ont tous disparus (Michel 2012). De ce fait, l'espèce est considérée en danger d'extinction au niveau régional (UICN 2015).

La présente étude s'est effectuée au niveau de la plaine d'Alsace dans le département du Bas-Rhin (Est de la France ; **Fig. 1**). Cette plaine contient majoritairement des paysages fortement modifiés composés de terres arables, de zones urbaines et de routes. Au sein de cette plaine, une zone d'étude de 896 km² a été définie, correspondant à un polygone dont chaque bord est distant de 5 km du point de reproduction connu (de l'espèce) le plus proche. Au sein de cette zone d'étude, les sites connus de reproduction étaient répartis entre des mares semi-naturelles (MSN ; N=35), des bassins d'orage routiers (BO_R ; N=15), et des bassins d'orage industriels (BO_I ; N=9). Notons que la présence du Crapaud vert dans l'ensemble de ces sites a été vérifiée suite à des inventaires que nous avons réalisés entre 2019 et 2021 (non encore

publié). D'autres MSN et BO existent au sein de la zone d'étude, mais ils se sont avérés jamais utilisés par l'espèce lors de ces inventaires. Par ailleurs, de nouvelles routes à grande vitesse (Contournement Ouest de Strasbourg « COS » et la Rocade Sud) ont vu le jour avec la création de 21 nouveaux bassins d'orage routiers au sein de la zone d'étude. Les mares semi-naturels occupées par le Crapaud vert sont quant à elles soit des zones humides naturelles vraies (n=4), des sites de gestion d'eau pluviales, par exemple de carrière (n=14), ou des mares aménagées pour le Crapaud vert pouvant également se trouver dans des carrières (en activité ou non) (n=15).

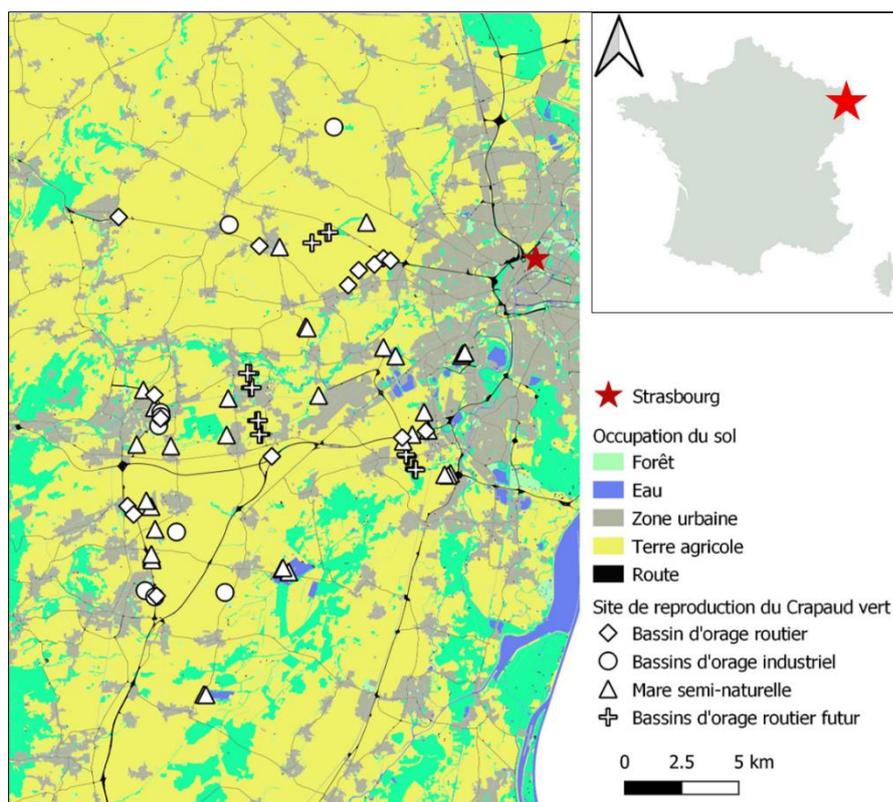


Figure 1 : Zone d'étude et localisation des sites de reproduction du Crapaud vert

2.2. Modélisation de la connectivité

La connectivité paysagère structurelle a été estimée sur le logiciel Graphab v2.8 (Foltête *et al.* 2021) par des modèles de déplacement basés sur la théorie des graphes et utilisant la théorie des réseaux, les chemins de moindre coût (CMC) et la théorie des circuits. Afin de réaliser ces modèles, deux entrées sont nécessaires : (i) une identification des « habitats » de l'espèce (*i.e.* site de reproduction) ; et (ii) une « carte de résistance », basée sur le type d'occupation du sol, mais également sur les capacités de déplacement de l'espèce étudiée.

Comme précisé précédemment, les sites de reproduction ont été obtenus grâce à des inventaires réalisés en 2019 et 2021. Les cartes de résistance ont quant à elles été réalisées à l'aide de couche d'occupation du sol (précision de 1 : 10000, CIGAL 2019), à laquelle nous avons attribué un « *coefficient de friction* » (compris entre 1 = habitat très facile à franchir ; et 10 000 = élément très résistant comme les autoroutes) à chaque type d'habitat (**Annexes**). Ces coefficients définissent une capacité de mouvement pour une espèce étudiée et pour chaque élément du paysage (Balbi 2017). Les coefficients de frictions (**Annexes**) et les informations sur la capacité de déplacement (distance maximum de dispersion estimée à 5 km) ont été obtenus après discussion avec des experts du Crapaud vert (U. Sinsch, M. Stock et M. Cheylan) et à partir de la littérature disponible sur le Crapaud vert et sur une espèce à écologie semblable, le Crapaud calamite (*Epidalea calamita*). Afin de valider ces coefficients de frictions, une procédure de validation multi-échelles a été utilisée (Balbi 2017). Tout d'abord, un premier « *modèle à petite échelle* » sur une zone d'étude réduite de 36 km² (commune de Molsheim ; 48°32'49.4''N 7°31'09.4''E) a été réalisée en 2019, après affinage manuel de l'occupation du sol (CIGAL, 2019) au mètre de précision (1 pixel = 1x1 m). Les résultats obtenus à cette échelle en terme de possibilité de présence et de chemins de moindre coûts ont été comparés à des données de présence d'individus en phase terrestre (individus en déplacement et individus écrasés). Ces dernières données ont été obtenues durant 23 inventaires nocturnes réalisés entre le 04/03/2019 et le 20/05/2019, à partir d'un échantillonnage menés à quatre opérateurs par parcours, pendant 30 minutes de transects circulaires autour de 21 sites potentiels de reproduction. Comme l'ensemble des données de terrain obtenues (n=367) recoupaient les possibilités de présence et les chemins de moindre coût, les coefficients de friction ont alors été validés à cette échelle réduite. Un modèle à l'échelle globale de la zone d'étude (896 km²) a ensuite été réalisé, cette fois-ci avec une précision de 1 pixel = 5x5 m, sans affinage au mètre de l'occupation du sol. Afin de s'assurer que ce « *modèle global* » était fiable, il a été comparé, comme pour le modèle à petite échelle, aux données d'inventaire sur l'échelle réduite de 36 km², ainsi qu'aux possibilités de présence et de chemins de moindres coûts du modèle réduit au sein de la zone de 36 km². Cette étape pas à pas, basée à la fois sur une validation entre échelles de modèles et sur des données d'inventaire, permet de considérer le modèle utilisé à l'échelle de la zone d'étude comme plutôt fiable.

Hypothèse 1a et 1b : Apport des bassins d'orage actuels et futurs à la connectivité globale.

Le paradigme actuel étant de ne pas considérer les BO comme habitats et sites relais pour le Crapaud vert, plusieurs modèles de déplacement ont été réalisés en supprimant les différents types de points d'eau :

- (i) Modèle complet = ensemble des BO et MSN du paysage
- (ii) Modèle sans BO = présence uniquement des MSN sans les BO
- (iii) Modèle sans BO_R = présence des MSN et des BO_I, sans les BO_R
- (iv) Modèle sans BO_I = présence des MSN et des BO_R, sans les BO_I
- (v) Modèle sans MSN = présence uniquement des BO (BO_R et BO_I) sans les MSN

Un dernier modèle a été également réalisé, prenant compte les 21 nouveaux bassins dans la zone d'étude :

- (vi) Modèle futur = modèle complet + BO_R futurs

Pour chacun de ces modèles, différentes métriques globales ont été calculées et comparées avec tous les autres modèles :

- la *connectivité équivalente* (EC) qui est la capacité d'un individu provenant de n'importe quelle tache d'habitat à rejoindre une autre tache. Plus l'EC prend une valeur élevée, plus deux individus pris au hasard ont de chance de se rencontrer dans le paysage ;
- la *surface atteignable* qui est la surface que les crapauds verts peuvent potentiellement atteindre avec leur capacité de déplacement (dispersion maximale de 5 km dans cette étude). La *surface atteignable* peut être représentée graphiquement par les « corridors » ;
- le *nombre de « composantes »* qui représente le nombre de populations structurellement isolées.

Hypothèse 2a et 2b : Apport relatif des bassins d'orage par rapport aux mares semi-naturelles

Au sein du modèle complet et uniquement pour celui-ci, différentes métriques locales ont été calculées pour chaque site de reproduction :

- la *centralité intermédiaire* (BC) qui correspond à la fréquence d'utilisation de chaque tache basée sur la théorie des réseaux. Plus la BC prend une valeur élevée, plus la tache permet un déplacement moins coûteux vers une autre tache d'habitat ;
- le *flux circuit* (CF) qui correspond à la fréquence d'utilisation de chaque tache, basée sur la théorie des circuits électriques ;
- le *flux d'interaction* (IF) qui correspond aux échanges d'individus dispersants. L'IF est un indicateur des interactions potentielles entre une tache *i* et les autres taches. Plus l'IF prend une valeur élevée, plus fortes sont ces interactions potentielles ;
- le *degré du nœud* (Dg) qui correspond au nombre de taches voisines atteignables, c'est-à-dire au nombre de taches connectées à la tache étudiée.

Ces métriques locales ont été comparées entre les différents types de site de reproduction (BO_I, BO_R et MSN) par des tests de Kruskal-Wallis et tests post-hoc de Dunn.

L'ensemble des analyses statistiques et graphiques a été effectué sur R (v3.5.3, RStudio v1.2.1335, R Core Team, 2020) et GraphPad Prism 8.2.1 (San Diego, California, USA). Un seuil de significativité de 5% a été utilisé.

3. Résultats

Hypothèse 1a et 1b : Apport des bassins d'orage actuels et futurs à la connectivité globale.

La connectivité équivalente (EC) était diminuée de 35,8% par rapport au modèle complet en l'absence de BO (n= 24, soit une diminution relative par BO de 1,1%) alors qu'elle diminuait de 48,4% en l'absence des MSN (n= 35, soit 2% de diminution relative par MSN). En distinguant les types de BO, l'absence de BO_R diminuait l'EC de 23,6% (n= 15), et 11,7% pour le retrait des BO_I (n=9) (**Tableau 1**). Via l'ajout des 21 nouveaux BO_R, l'EC augmentait de 29,2%, les BO devenant majoritaires dans la zone d'étude (41 BO vs 35 MSN).

Initialement (modèle complet) la surface atteignable était de 150 770 ha. Sans les BO, cette surface était diminuée de 76,7% (soit une diminution relative de 2,25%), contre 69,9% (soit une diminution relative de 2,91%) sans les MSN. En distinguant BO_R et BO_I, la surface atteignable était diminuée de 55,4% sans BO_R et de 26.4% sans BO_I. L'ajout des 21 nouveaux BO_R, augmentait la surface atteignable de 11,3% par rapport au modèle complet (**Tableau 2**).

En distinguant BO_R et BO_I la diminution relative était de 1,29% pour un BO_R et 0,54% pour un BO_I (**Tableau 2**).

Le nombre de composantes (= nombre de populations structurellement isolées) passait de 1 à 6, que ce soit en retirant les MSN ou les BO (**Tableau 3 ; Fig. 2**). Le retrait distinct des BO_R ou des BO_I divisait le paysage en 2 populations structurellement isolées (**Tableau 3 ; Fig. 2**).

Tableau 1 : Résultats obtenus pour l'EC (Connectivité équivalente)

| Modèle | EC | Variation de l'EC (%) | Variation de l'EC en tenant compte de la proportion relative du nombre de points d'eau (%) |
|-----------------------------|-------|-----------------------|--|
| Modèle complet | 14,54 | 0,0 | 0,0 |
| Modèle sans BO | 9,33 | - 35,8 | -1,1 |
| Modèle sans BO _R | 11,11 | - 23,6 | -0,5 |
| Modèle sans BO _I | 12,84 | - 11,7 | -0,2 |
| Modèle sans MSN | 7,51 | - 48,4 | -2,0 |
| Modèle futur | 18,79 | + 29,2 | +0,4 |

La variation de l'EC était toujours obtenue par rapport au modèle complet

Tableau 2 : Résultats obtenus pour la surface atteignable

| Modèle | Surface atteignable (ha) | Variation (%) | Variation relative par nombre de points d'eau |
|-----------------------------|--------------------------|---------------|---|
| Modèle complet | 150 770 | 0 | 0 |
| Modèle sans BO | 35 204 | - 76,7 | - 2,25 |
| Modèle sans BO _R | 67 328 | -55,4 | -1,29 |
| Modèle sans BO _I | 111 039 | - 26,4 | - 0,54 |
| Modèle sans MSN | 45 402 | -69,9 | - 2,91 |
| Modèle futur | 167 766 | + 11,3 | + 0,14 |

La variation de surface atteignable correspondait toujours obtenue par rapport au modèle complet

Tableau 3 : Nombre de composantes (populations structurellement isolées) en fonction des différents modèles

| Modèle | Nombre de composantes |
|-----------------------------|-----------------------|
| Modèle complet | 1 |
| Modèle sans BO | 6 |
| Modèle sans BO _R | 2 |
| Modèle sans BO _I | 2 |
| Modèle sans MSN | 6 |
| Modèle futur | 1 |

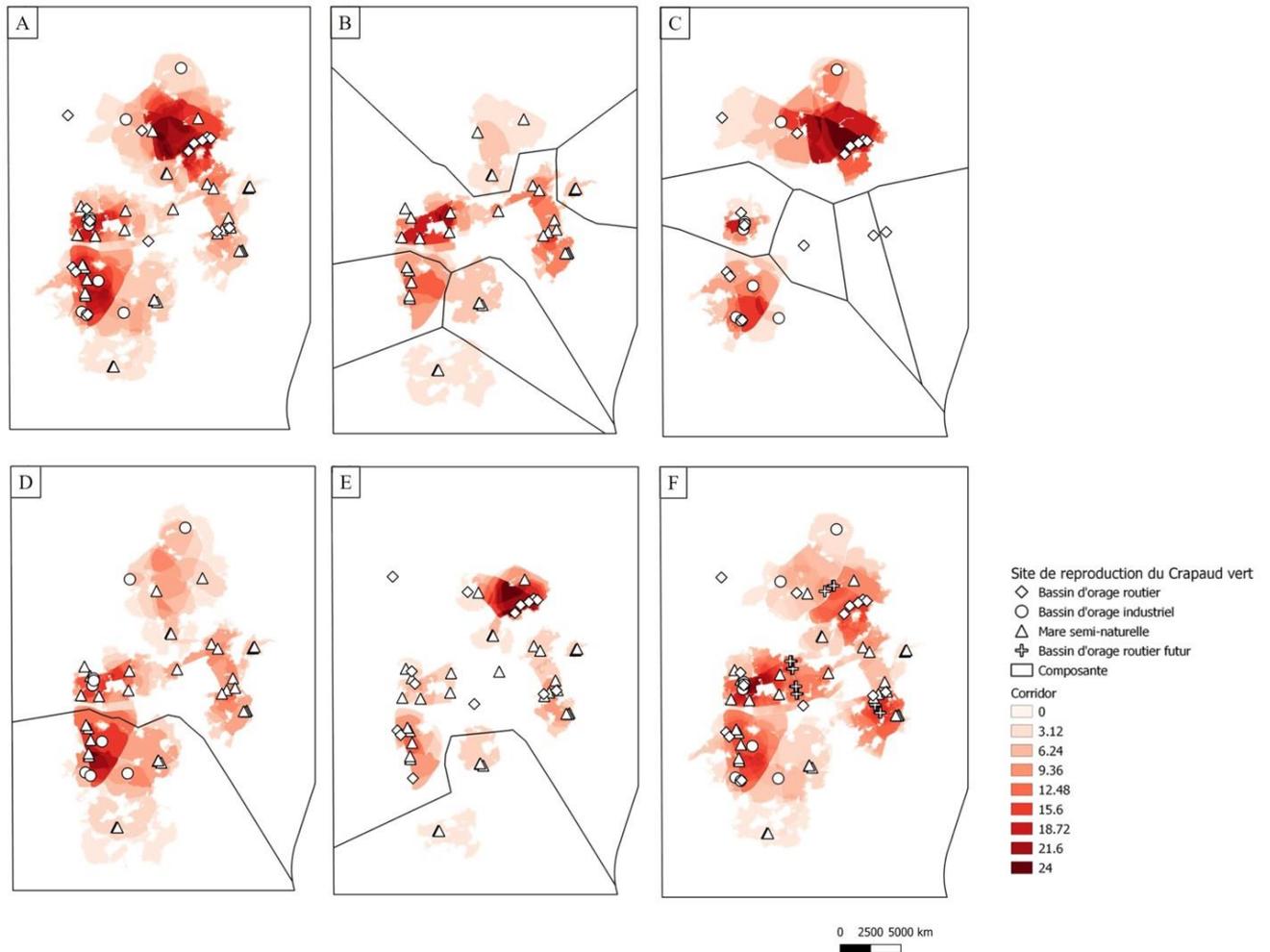


Figure 2 : Représentation cartographique des sites de ponte dans la zone d'étude (3 types différents), des « corridors » (ou surface atteignable) et des composantes (population structurellement isolée) selon 6 différents scénarii de modèles testés (panneau A à F). (A) pour le modèle complet avec l'ensemble des sites ; (B) pour le modèle sans les bassins d'orage ; (C) pour le modèle sans les mares semi-naturelles ; (D) pour le modèle sans les bassins d'orage routiers (BOR) ; (E) pour le modèle sans les bassins d'orage industriels (BOI) ; et (F) pour le modèle futur avec l'ajout des nouvelles routes couplés à leurs bassins d'orage routiers. Concernant les surfaces atteignables représentées par les « corridors » ici, plus le coloris rouge est foncé, plus forte est la probabilité de rencontrer dans cette zone un individu en déplacement. En comparant les scénarii, on peut noter par exemple que : (i) panneau A, toutes les populations sont connectées ; (ii) panneau B ou C, en supprimant tous les bassins d'orage, ou toutes les mares semi-naturelles, la population se scinderait en 6 populations isolées entre elle ; (iii) panneau F, en rajoutant les bassins d'orage des deux routes récemment construites, la connectivité devient plus homogène sur l'ensemble de la zone d'étude.

Hypothèse 2a et 2b : Apport relatif des bassins d'orage par rapport aux mares semi-naturelles

Sur l'ensemble des métriques locales testées, seule la métrique locale BC (correspondant à la *centralité intermédiaire*) était statistiquement significativement différente ($\chi^2=6,19$; $d=2$; $p<0,05$) avec une médiane réduite par rapport à celle des mares semi-naturelles de 3,4 fois pour les BOI à 5,8 fois pour les BOR (**Fig. 3**).

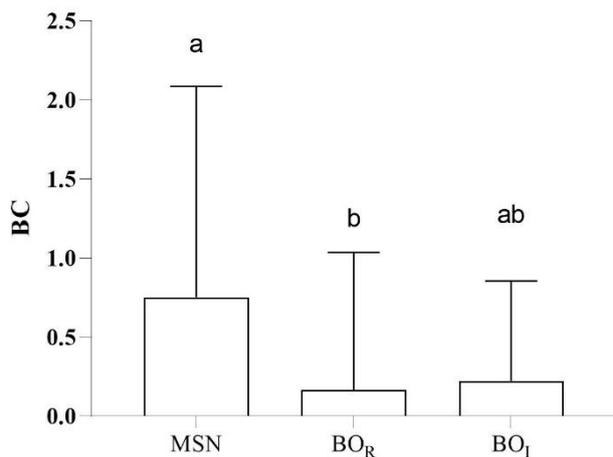


Figure 3 : Variation de la centralité intermédiaire (BC, qui correspond à la fréquence d'utilisation de chaque tache d'habitat) selon les 3 types de sites de reproduction du Crapaud vert : mare semi-naturelle, bassin d'orage routier ou bassin d'orage industriel) Les histogrammes représentent la médiane et l'écart interquartiles. Une différence significative de la BC est observée ($\chi^2=6,19$; $d=2$; $p<0,05$) avec une médiane encore plus réduite dans les BO_R que dans les BO_I, les deux comparés au MSN (a, b : lettres communes = non-significativement différent)

4. Discussion

Le premier objectif de cette étude était d'apporter des connaissances sur l'importance possible des bassins d'orage dans la connectivité paysagère pour le Crapaud vert, ceux-ci étant utilisés comme sites relais, même si ces bassins d'orage n'étaient pas favorables à leur reproduction. En effet, pour éviter un éventuel impact négatif des polluants présents dans les BO, les gestionnaires routiers interdisent l'accès des bassins aux amphibiens, par la mise en place de mesures de cloisonnement. En considérant à tort ces mesures de cloisonnement efficaces, les gestionnaires autoroutiers et les organismes de contrôle (DREAL) ont longtemps fermé les yeux sur la présence évidente d'amphibiens dans leurs ouvrages, entraînant deux conséquences directes pour la conservation de ces espèces (Jumeau *et al.* 2020). La première est que les gestionnaires n'adaptent pas les pratiques d'entretien aux besoins de ces espèces notamment le Crapaud vert préférant les sites ouverts pour sa reproduction, qui nécessiterait un retrait régulier de la végétation des berges (Sinsch *et al.* 2007). La seconde conséquence et qu'en voulant ignorer l'intérêt potentiel des BO comme site relais, ce rôle a été négligé, ce qui revient sans doute à une sous-évaluation de la connectivité paysagère globale pour l'espèce. En effet, même si les BO restaient des sites défavorables pour la reproduction du Crapaud vert, le fait qu'il restent accessibles seraient peut-être un élément clefs pour être à portée de colonisation de site plus favorable et de les connecter entre eux. Les périmètres d'inventaires mais aussi le

choix de création ou d'aménagement de nouvelles MSN seraient alors biaisés, en ne considérant que les seules MSN comme habitats participant à la connectivité paysagère de l'espèce.

Les résultats de la présente étude vont exactement dans ce sens : ils indiquent clairement un effet déterminant des bassins d'orage à la connectivité paysagère locale ou globale, du moins pour le cas du Crapaud vert. Sans ces bassins d'orage (*e.g.* si les mesures de réduction d'accès étaient efficaces ou améliorées), la connectivité équivalente dans la zone étudiée serait réduite de ~35% et la surface atteignable par un individu en dispersion réduite de 3/4, ce qui est biologiquement significatif (**Tab. 1, 2 et 3**). À ce titre, notre première hypothèse est validée. À noter que cette surface atteignable est probablement sous-estimée car nous n'avons pas pu prendre en compte les passages à faune existants au niveau des routes. Certaines routes sont donc certainement moins résistantes au déplacement des amphibiens qu'indiqué si un ouvrage favorable est présent (Fahrig *et al.* 1995 ; Glista *et al.* 2009 ; Testud & Miaud 2018). En effet, les routes sont équipées de très nombreux ouvrages, qui même s'ils ne sont pas dédiés à la traversée de la faune, permettent le franchissement des espèces (c'est par exemple le cas des nombreux ouvrages d'art assurant la transparence hydraulique des routes en remblais) (Seiler & Olsson 2009). Si leur emplacement est connu des aménageurs, leur capacité individuelle à permettre le passage d'amphibiens ne l'est pas. Il aurait alors fallu analyser individuellement des milliers d'ouvrages d'art pour pouvoir les prendre en compte, ce qui représente un travail disproportionné par rapport à la question posée. D'ailleurs et comme nous l'envisagions, l'augmentation très récente du nombre de bassins d'orage dans la zone d'étude permet d'améliorer encore la connectivité globale, ce qui est logique de par le simple ajout de nouveaux points de reproduction (+21 BO en 3 ans). Concernant ces 21 nouveaux bassins d'orage, notons aussi que leur position respective est particulièrement intéressante. En effet, le modèle complet concluait à l'émergence d'une seule et unique composante (sites tous interconnectés), alors que le modèle possédait en réalité deux populations structurellement isolées visuellement distinctes : une Sud-SudOuest, l'autre au Nord-NordEst, **Fig. 2A**) reliées uniquement par un corridor de faible intensité. De par leur configuration en pas japonais et leur alignement entre ces deux populations structurellement isolées, ces nouveaux bassins routiers permettent de créer un nouveau corridor, de direction Nord-Sud, tout en renforçant celui déjà présent. Aussi, si structurellement la population étudiée était unique, ce n'était pas forcément le cas d'un point de vue fonctionnel, comme l'indique l'étude de Vacher et Ursenbacher (2019). Cette étude montre en effet que génétiquement, une vraie coupure existe entre Nord et Sud. Ces nouveaux bassins d'orage pourraient alors participer à une reconnexion non pas seulement structurelle

mais surtout fonctionnelle. Ce même résultat obtenu par modélisation a également été mis en évidence dans une autre zone d'étude française où le retrait des BO_R entraînait un isolement des populations d'amphibiens (Clevenot *et al.* en révision). Ainsi, que les bassins d'orage soient ou non favorables à la reproduction du Crapaud vert (Sievers *et al.* 2018 ; Conan *et al.*, en révision), ils peuvent jouer un rôle non négligeable dans les déplacements de l'espèce. Ceci est cohérent avec la littérature indiquant qu'un réseau dense de zones humides permet de faciliter la dispersion et l'accessibilité à d'autres sites de reproduction (Hamer & Parris 2011 ; Holtmann *et al.* 2017).

Malgré ce rôle favorable de relais potentiel, un bassin d'orage n'a pas le même apport à la connectivité qu'une mare semi-naturelle. En effet, au niveau des métriques globales, l'apport individuel des BO était plus faible que celui des MSN, ce qui contredit notre hypothèse 2). Au niveau des métriques locales en revanche, la différence est moins marquée avec uniquement la fréquence d'utilisation (métrique BC) qui différait entre MSN et BO_R au profit des BO_I. Cela signifierait que les mares semi-naturelles, avec un degré de centralité identique aux BO (autant de lien avec d'autres sites, *i.e.* degré de nœud « Dg » non différent) et une surface atteignable plus importante, auraient une position plus éloignée des autres points de reproduction, permettant une meilleure connectivité entre des sites distants. Cela est cohérent avec le fait d'avoir une plus grande surface atteignable par les mares que par les bassins d'orage. Les bassins d'orages formeraient alors quant à eux des réseaux plus resserrés, ce qui est logique au regard de leur nature. Ces résultats font échos à ceux obtenus sur l'utilisation des BO_R par les amphibiens, qui indiquent des différences spécifiques en termes d'abondance mais une richesse spécifique similaire entre BO_R et MSN (Le Viol *et al.* 2012 ; Jumeau *et al.* 2020). Un bassin d'orage ne serait alors pas moins bon ou meilleur qu'une mare semi-naturelle, il permettrait simplement des avantages différents à ce taxon. Il est donc nécessaire et urgent que les autorités compétentes prennent en considération ces sites comme des habitats potentiels pour les amphibiens, et d'autant plus pour les espèces sélectionnent davantage ce type de points d'eau (Jumeau *et al.*, 2020).

Pour conclure, les bassins d'orage qu'ils soient routiers ou industriels jouent un rôle important dans la connectivité paysagère pour le Crapaud vert. Il est donc primordial de les considérer comme des habitats au minimum relais pour cette espèce et donc de prévoir les mesures de gestions en lien avec le calendrier de présence des amphibiens.

Discussion de l'étude 6 :

Cette étude prouve l'intérêt des bassins d'orage dans la connectivité paysagère pour le Crapaud vert. En effet, s'ils sont cloisonnés de manière efficace comme cela peut être préconisé par les autorités compétentes, cela entraînerait, d'après nos modèles, un isolement des populations. Celui-ci pourrait être dramatique pour l'avenir des populations de Crapaud vert dans le Bas-Rhin.

Les résultats de cette étude ont été assez longs à obtenir car cela nécessitait de réaliser des observations de terrain afin de valider la robustesse des modèles. En effet, durant la première année de thèse, une première étude a consisté à rechercher des individus en phase terrestre sur la commune de Molsheim. Lors de cette étude nous avons également mis en évidence des localisations de mortalité routière de crapaud vert. Ces observations ont permis de valider notre premier modèle réalisé à petite échelle, car les observations étaient présentes là où le modèle prédisait des déplacements, et les mortalités étaient localisées au niveau de points de conflits obtenus par le modèle (i.e. intersection entre un chemin de moindre coût avec une route). De ce fait, nous avons pu utiliser ces paramètres pour réaliser nos modèles à l'échelle du Bas-Rhin. Ces résultats ont également été validés par des observations de terrain d'individus en déplacement.

Il semblerait que les bassins d'orage jouent un rôle important dans la connectivité paysagère pour le Crapaud vert. En effet, les BO peuvent être utilisés comme sites relais afin de coloniser le paysage et permettent des échanges d'individus entre populations. De ce fait, leur cloisonnement est une mauvaise mesure d'atténuation, pourtant toujours préconisée, adoptée pour la construction des ouvrages récents du Bas-Rhin.

Ces premiers résultats ainsi que le peu de publications sur le sujet mènent à se questionner sur la manière dont le Crapaud vert utilise l'habitat terrestre et plus particulièrement à proximité des bassins d'orage. De plus, étant une espèce en danger d'extinction, son habitat de reproduction mais aussi son habitat de repos (terrestre) sont protégés. Il est donc indispensable d'étudier cet habitat terrestre afin de mettre en évidence des zones de protection déterminantes pour l'espèce.

Étude 7 : Utilisation de l'habitat terrestre par un amphibien à proximité des bassins d'orage routiers : le Crapaud vert (*Bufo viridis*) dans la plaine d'Alsace, France.

Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de préparation

Résumé :

Dans les études précédentes il a été montré que le Crapaud vert utilisait les bassins d'orage comme site de substitution, pour leur reproduction et/ou pour coloniser des habitats plus favorables, mais plus lointains. Cependant cette espèce, comme la plupart des amphibiens, n'utilise pas seulement les sites aquatiques, mais également les habitats terrestres aux alentours. De plus, étant une espèce considérée en danger au niveau régional (Grand-Est), l'ensemble de ses habitats est protégé (habitat de reproduction : aquatique & de repos : terrestre). Nous nous sommes donc intéressés dans cette étude à l'utilisation de l'habitat terrestre autour des bassins d'orage, ces derniers représentant une part non négligeable des sites de reproduction de l'espèce dans le Bas-Rhin (41% dans la présente étude et 54% depuis la création de 21 nouveaux sites).

Pour cela, des individus ont été équipés de radio-émetteurs internes et leurs positions ont été suivies *in situ* lors de la période de reproduction et après la migration post-reproduction ($64,9 \pm 11,2$ jours). Cette étude a montré que les individus avaient un domaine vital moyen sur l'ensemble du suivi de $45,5 \pm 24,5$ ha et de $37,0 \pm 25,6$ ha uniquement sur la période post-reproduction ($n = 5$). De plus, une analyse de sélection d'habitats nous a permis de montrer que les individus avaient tendance à sélectionner les bandes herbacées et à éviter les routes, les prairies, les haies et les chemins. En revanche, les cultures et les zones urbanisées ne sont ni évitées ni sélectionnées. Nous avons également mis en évidence que certains individus pouvaient se déplacer rapidement sur de grandes distances avec une distance parcourue maximale de 473 m en 24h. Sur l'ensemble du suivi, la moyenne du cumul des distances parcourues était de $942,0 \pm 172,3$ m, avec 4 individus ayant un cumul des distances parcourues de plus de 1 km. Pour finir, nos résultats ont également montré que les individus s'éloignaient en moyenne à $472,8 \pm 74,8$ m du site de reproduction, avec une distance maximale pour un individu atteignant 716 m. Enfin, nous avons montré que le Crapaud vert utilise majoritairement les terriers et galeries de micromammifères comme gîte quotidien.

Si on compare nos résultats à ceux obtenus dans d'autres études sur l'habitat terrestre du Crapaud vert et d'une espèce proche (le Crapaud calamite), nos résultats montrent que dans un

paysage fortement dégradé à proximité de bassins d'orage routiers, le Crapaud vert a un domaine vital étendu et peut également parcourir de grandes distances. De plus, les résultats permettent de mettre en évidence des zones importantes pour le déplacement, mais également pour les périodes de repos du Crapaud vert comme les bandes herbacées. Ces dernières doivent être maintenues et gérées dans le temps en prenant en compte l'éventuelle présence de l'espèce, pouvant être les derniers refuges de biodiversité à proximité des routes et abritent une concentration importante en micromammifères et par conséquent de terriers.

Utilisation de l'habitat terrestre par un amphibien à proximité des bassins d'orage routiers : le Crapaud vert dans la Plaine d'Alsace, Est de la France

Antonin Conan^{1,2*}; Nathan Dehaut¹ ; Meven Le Brishoual¹ ; Yves Handrich¹ ; Jonathan Jumeau²

¹ Université de Strasbourg, CNRS, IPHC, UMR7178, F-67000 Strasbourg, France

² Collectivité européenne d'Alsace, CERISE, Place du Quartier Blanc, 67964 Strasbourg, Cedex 9, France

*Corresponding author.

E-mail address: antonin.conan@iphc.cnrs.fr

1. Introduction

Les amphibiens font partie des taxons les plus menacés au niveau mondial avec plus de 40% d'espèces concernées (IUCN 2021). Vulnérables, ils subissent différentes menaces comme l'introduction d'espèces exotiques envahissantes, l'apparition de maladies émergentes, le réchauffement climatique et la fragmentation des habitats naturels (Stuart *et al.* 2004). Les amphibiens sont particulièrement sensibles à cette dernière menace qui entraîne à la fois la destruction et l'isolement des habitats naturels (Fahrig, 2017). En effet, comme ces espèces alternent une phase aquatique (reproduction et développement larvaire) et une phase terrestre qui représente la majeure partie de leur vie (chasse, repos, brumation) (Baumberger *et al.* 2019), ils utilisent des habitats naturels contrastés. Or la surface des zones humides indispensables pour la reproduction des amphibiens aurait diminué de 60 à 70% au cours du XX^e siècle (Davidson 2014). La fragmentation paysagère induit également un morcellement des habitats résiduels et une modification de la connectivité paysagère. Cependant, passant de phase aquatique à phase terrestre plusieurs fois par an pendant les migrations et même quotidiennement pendant la période de reproduction, les amphibiens sont directement impactés par la création de barrières entravant leurs déplacements, comme les infrastructures linéaires de transport, les canaux et les clôtures (Chelgren *et al.* 2006 ; Cayuela *et al.* 2019). Concernant les routes, ces obstacles induisent également des pics de mortalité, là où elles coupent des couloirs de dispersion réguliers des amphibiens (Sillero 2008).

Malgré l'enjeu que représentent les habitats terrestres pour les amphibiens, il existe peu d'études s'intéressant aux déplacements de ces espèces en phase terrestre (Sinsch 1988 ; Eggert *et al.* 1999 ; Miaud *et al.* 2000 ; Trochet *et al.* 2017). En effet, la majorité des études s'est focalisée sur la phase aquatique, probablement plus facile à étudier car les amphibiens sont tous concentrés au même endroit durant la période de reproduction (Joly *et al.* 2011 ; Riley *et al.* 2017). Cette phase permet aussi une facilité d'inventaire via les pontes et les larves de ces

espèces qui sont pour la plupart strictement aquatiques (Miaud et Muratet 2018). En phase terrestre, les amphibiens sont en revanche difficiles à observer, car ils adoptent un comportement discret leur permettant un camouflage efficace, alors que les individus sont dispersés sur de plus grandes surfaces (Storfer 2003).

Il fut pendant longtemps difficile d'étudier les amphibiens en phase terrestre, étant donné l'effort d'observation nécessaire, mais aussi par le manque de solutions techniques alternatives de suivi sur le terrain. Cependant depuis les années 1960, l'utilisation de la radio-téléométrie permet un accès plus précis du suivi individuel de la faune. Largement modernisée depuis, cette technique permet aujourd'hui un suivi d'espèces aussi petites que les amphibiens (MacDonald 1978). De nouvelles connaissances sur la phase terrestre des amphibiens sont maintenant à notre portée, et restent indispensables pour la mise en place de mesures de conservation efficaces sur l'ensemble du cycle de vie de ces espèces (Trochet *et al.* 2017).

En France, en région Grand-Est, une espèce particulièrement sensible et concernée est le Crapaud vert (*Bufo viridis viridis*). Plus particulièrement en Alsace, avec la raréfaction drastique des zones humides naturelles, il utilise aujourd'hui des sites de substitution d'origine anthropique comme les mares de carrière ou encore les bassins d'orage routiers (Michel 2012 ; Berna *et al.* 2021). En cas de gestion non adaptée à l'espèce, ces sites pourraient cependant agir comme des pièges écologiques, pouvant contribuer au classement « en danger d'extinction » du Crapaud vert dans sa limite Ouest de répartition mondiale (Michel 2012 ; Berna *et al.* 2021). Mais surtout, comme ces sites de substitution sont principalement retrouvés dans des paysages très modifiés avec un fort tissu urbain traversé par un réseau routier dense, l'espèce se retrouve alors fortement exposée à la fragmentation paysagère (Jumeau, 2017). Possédant une distance de dispersion estimée à plusieurs kilomètres qui l'amène à traverser de nombreuses routes et habitats naturels différents, le Crapaud vert est sensible aux collisions et aux modifications du paysage (Baumgart 2003). Pour cette espèce, malgré le manque d'études sur le sujet, la prise en compte de l'habitat terrestre dans les programmes de conservation devient une priorité maintenant accessible.

Objectifs de recherche

La présente étude s'est focalisée sur l'utilisation de l'habitat terrestre par le Crapaud vert dans un paysage fortement modifié. Dans le cadre de ce manuscrit de thèse, cette étude s'est uniquement focalisée sur un site centré autour d'un bassin d'orage routier (vu qu'il s'agit du sujet de la thèse). Toutefois, l'étude s'est en réalité déroulée sur 3 sites au total et l'article

définitif aura alors une dimension plus vaste et moins « bassin-centré », pour devenir « paysage-centré ».

D'après le peu de littérature retrouvé chez cette espèce et les observations de terrain d'une étude passée (Conan & Jumeau, données non publiées : il s'agit des données obtenues lors de l'étude sur la connectivité au niveau de Molsheim, cf. étude 6), nos hypothèses étaient (1) le domaine vital des individus durant la saison de reproduction s'étend au-delà des sites de reproduction ; (2) en saison post-reproduction, le Crapaud vert possède un domaine vital très vaste ; (3) l'espèce utilise préférentiellement les chemins agricoles pour se déplacer plutôt que les champs ; (4) en journée, l'espèce se repose dans des cachettes variées (Baumgart 2003 ; Stock *et al.* 2008).

Pour tester ces quatre hypothèses, un suivi individuel quotidien par radio-télémetrie a été effectué durant la période de reproduction et post-reproduction de 24 individus autour d'un bassin d'orage routier, pendant l'année 2021.

2. Matériel et méthode

2.1. Zone d'étude

La zone d'étude est située dans la plaine du Bas-Rhin (France) où les effectifs de Crapaud vert se distribuent entre bassins d'orage routiers et mare de compensation (Berna *et al.* 2021). Plus précisément, elle est localisée à proximité de la route métropolitaine M451 (route à moyenne vitesse, sans clôture petite faune et possédant 6 passages à petite faune souterrains) mise en service en 2013 et couplée à 5 bassins d'orage routiers. Le paysage environnant cette infrastructure est caractérisé par une grande densité de terres arables (75% de l'aire de l'étude) ainsi que de zones urbaines (16%) et peu de zones humides (<1%). À part les bassins d'orage routiers, une seule mare semi-naturelle était présente dans la zone d'étude : une mare de compensations mise en place pendant la construction d'un lotissement en 2020 (**Fig. 1**). Une mare historique de présence du Crapaud vert était présente dans la zone considérée, mais faute d'une gestion adaptée, elle n'était plus favorable au Crapaud vert au moment de l'étude.

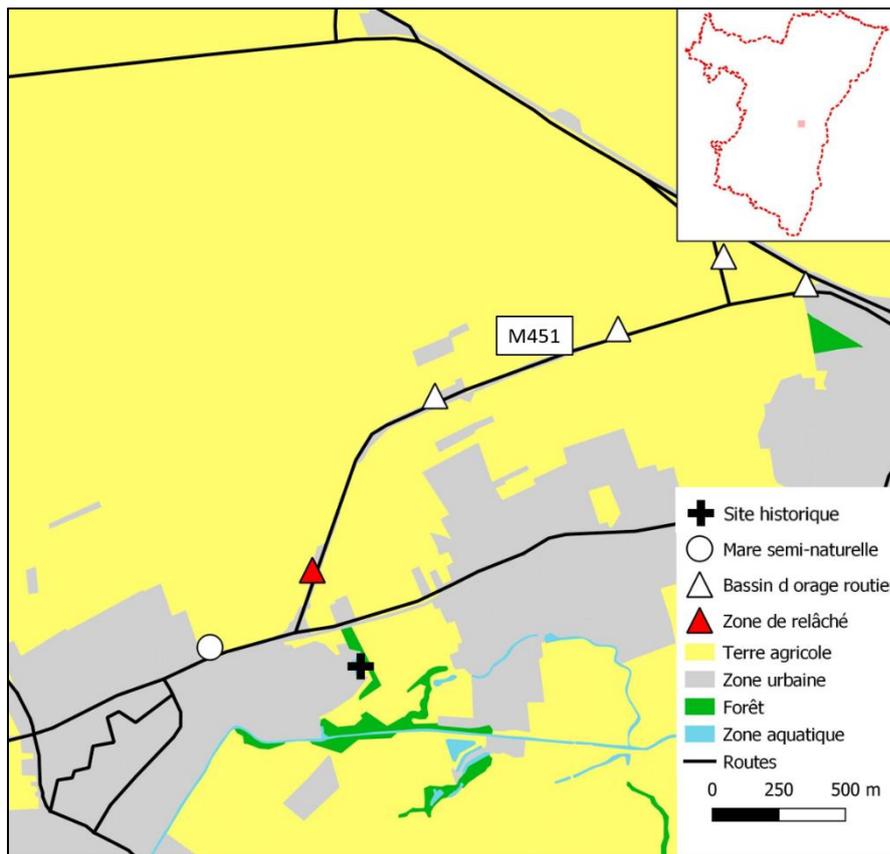


Figure 1 : Plan de la zone d'étude, située à 2,5km à l'ouest de Strasbourg, centrée sur 5 bassins d'orage disposés le long d'une route à moyenne vitesse (M451). Le bassin considéré comme site de reproduction de l'ensemble de nos individus suivi est représenté par le triangle rouge (BO 195).

2.2. Protocole de capture et d'implantation des émetteurs

Les individus adultes de Crapaud vert ont tous été capturés de nuit, en phase terrestre à proximité immédiate d'un bassin d'orage routier de la zone d'étude, *i.e.* soit dans l'enceinte du site, derrière la clôture, soit hors de l'enceinte, mais à proximité de la clôture <100 m du bassin (BO 195 ; **Fig. 1** ; 48°35'09.5''N ; 7°38'16.0''E). Comme la durée de vie des émetteurs de télémétrie était limitée à 6 mois en moyenne (BD-2H, Holohil Systems®, Ontario, Canada ; 1,9 g), deux vagues de captures ont été réalisées. En mai 2021, 5 femelles et 5 mâles ont été capturés afin de suivre leurs déplacements pendant la période de reproduction. Leur site de reproduction (BO) est connu pour l'ensemble de ces 10 individus, certifié, car ces individus étaient capturés dans l'enceinte du BO. De fin mai à début septembre 2021, 3 autres femelles et 11 autres mâles ont ensuite été capturés afin de suivre leurs déplacements pendant la période post-reproduction jusqu'à l'hiver. À l'origine, il était prévu de capturer et d'équiper 10 femelles et 10 mâles sur cette seconde période, mais il n'y avait plus assez de femelles dans la zone d'étude à ce moment de l'année pour atteindre ce sex-ratio équilibré. Trois individus sur les 14

capturés en post-reproduction correspondaient à une recapture d'une étude parallèle et leur numéro d'identification permettait de certifier dans quel BO ils s'étaient reproduits cette année. Pour les 11 autres individus correspondants à une première capture, tous ont été capturés à moins de 100 m du BO le plus proche, qui était considéré comme étant leur site de reproduction, sachant que sur notre zone d'étude, chaque BO est distant d'une autre d'en moyenne 600 m.

Une fois capturés, les individus étaient transportés dans un seau avec une faible quantité d'eau (~1 cm) et amenés au laboratoire (DEPE-IPHC ; 48°36'29.2''N 7°42'50.8''E) où ils étaient déposés dans des boîtes en plastique en attendant la chirurgie qui avait systématiquement lieu le lendemain en journée. Ces boîtes étaient munies d'une ouverture grillagée sur le couvercle (800x600x435 mm, Euronorm 12.4046.07, AXESS industries[®], Strasbourg, France) et présentaient une partie aquatique et une partie sèche munie d'une cachette.

Concernant l'implantation des émetteurs de télémétrie, chaque crapaud était anesthésié individuellement dans une solution de MS 222[®] (350 mg/L), l'eau de dilution étant tamponnée au bicarbonate de soude à 5 g/L. Cette anesthésie générale était obtenue par immersion de l'individu dans la solution jusqu'à décontraction musculaire totale (~36,1±2,2 min). La profondeur de l'anesthésie était vérifiée suivant 2 critères :

- Le réflexe de retournement : l'animal placé sur le dos ne devait pas tenter de se retourner ;
- L'absence de réflexe nociceptif : l'animal ne devait pas réagir après un pincement ou une piqure d'aiguille.

Si l'anesthésie n'était pas assez profonde, l'individu était alors replacé quelques minutes dans la solution de MS 222. Une fois l'individu anesthésié, une désinfection à la Vétédine solution[®] était effectuée au niveau de la future incision (*i.e.* flanc abdominal gauche). Afin de potentialiser l'anesthésie générale, une anesthésie locale traçante était effectuée au site d'incision à l'aide de lidocaïne (Lurocaïne[®] 20 mg/L dilué 20 fois). Afin de réduire la douleur de l'intervention, un analgésique général était injecté dans la cavité générale après incision de la peau sur 1 cm au ciseau fin (méloxicam – Métacam[®] 2 mg/L dilué 40 fois). Les quantités des solutions injectables de lidocaïne et de méloxicam étaient obtenues en fonction de la masse de l'individu (~4 µL/g). Après injection de l'analgésique général, le plan musculaire était ouvert (~1 cm) à la lame froide (n°11 WDT CuraVet[®], Brignoles, France) permettant alors l'implantation dans la cavité générale de l'émetteur radio préalablement désinfecté dans la Vétédine solution[®]. Après introduction de l'émetteur, deux sutures en points simples des plans

musculaires puis cutanée étaient réalisées avec un monofilament résorbable PDS 5/0[®]. Une dernière désinfection était réalisée sur la suture en fin de chirurgie. L'animal était ensuite rincé à l'eau fraîche puis placé en salle de réveil dans un bac comprenant quelques millimètres d'eau et un support permettant de maintenir sa tête émergée (*i.e.* coussin en compresse). Une fois réveillé, l'individu était placé dans un bac propre semblable au bac de stabulation pré-chirurgie. La stabulation post-chirurgie était d'environ 72 h pendant laquelle les animaux étaient nourris *ad libitum* avec des grillons (*Acheta domesticus* ~1 cm). Un suivi post-opératoire de chaque individu était réalisé 2 fois par jour afin de s'assurer de la bonne cicatrisation de la plaie. Enfin, 72 h après la chirurgie, l'animal était relâché sur le site exacte de capture (à proximité du BO 195, **Fig. 1**) si son état de santé le permettait.

Afin d'éviter la propagation d'agents pathogènes comme *Batrachochytrium sp.*, les individus étaient systématiquement manipulés avec des gants en nitrile non poudrés et l'ensemble du matériel était désinfecté au Virkon[®] entre chaque site (Miaud 2014). Toutes les manipulations ont été effectuées après l'obtention des autorisations de captures et de transport délivrées par le Ministère de la Transition Écologique (2020), et d'un certificat de capacité pour la détention d'amphibiens sauvages (DDPP67-SPAE-FSC-2019-04). Tout le matériel de chirurgie était désinfecté et passé à l'autoclave (180°C) entre chaque individu. Seuls des individus de plus de 20 g ont été capturés afin de ne pas dépasser le seuil de 10% de la masse des individus par l'émetteur (1,9 g) approuvé par le comité d'éthique (CREMEAS) et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS #28741-2020121514191399.v4).

2.3. Suivi par télémétrie

De mai à novembre 2021, les individus équipés étaient recherchés sur la zone d'étude à l'aide de récepteurs (Sika, Biotrack[®], Dorset, UK) équipés d'antennes directionnelles Yagi (flexible Yagi antenna, Biotrack[®], Dorset, UK). La méthode de « Homing-In » était utilisée pour rechercher les individus, consistant à rechercher le signal de l'individu à partir de sa dernière position en balayant le paysage avec l'antenne. Lorsque le signal était détecté, l'expérimentateur se dirigeait vers celui-ci afin de retrouver précisément la localisation de l'individu (*e.g.* signal de plus en plus fort). Pendant la période de reproduction (*i.e.* mai à fin juin), le suivi était effectué deux fois par jour : en matinée et de nuit afin de limiter les pertes d'individus. Après la migration post-reproduction (*i.e.* individus éloignés du site de

reproduction) et jusqu'au 26 novembre 2021, les individus étaient recherchés une fois par jour avec un roulement comprenant une semaine avec des localisations en journée (entre 9h et 14h) et la semaine suivante des localisations de nuit (entre 21h et 2h). Ce roulement permettait de travailler à la fois sur les habitats utilisés pour le repos (en journée) et pour le déplacement (de nuit), tout en limitant la fatigue des expérimentateurs. La géolocalisation précise du point de détection était relevée à l'aide d'un GPS (Garmin eTrex 22x, Olathe, USA) ainsi que la date et l'heure. Une description de l'habitat naturel (*e.g.* champs, route, bande herbacée...) et du micro-habitat (*e.g.* terrier de micromammifère, sous une dalle, entre des rangs de cultures...) était effectuée à chaque point de détection avec une prise de la température et de l'humidité ambiante. Pour chaque individu, la distance au bassin de reproduction (BO 195) était mesurée.

2.4. Occupation du sol

Afin d'analyser les préférences d'habitats naturels, une couche d'occupation du sol a été réalisée sur QGIS (v3.10, Development Team, 2020) à partir d'une base existante (**Fig. 1** ; CIGAL 2020 ; 1 : 10 000), des observations de terrain, et des vues satellites de la zone d'étude afin d'obtenir une meilleure précision de l'occupation du sol (**Fig. 2**).

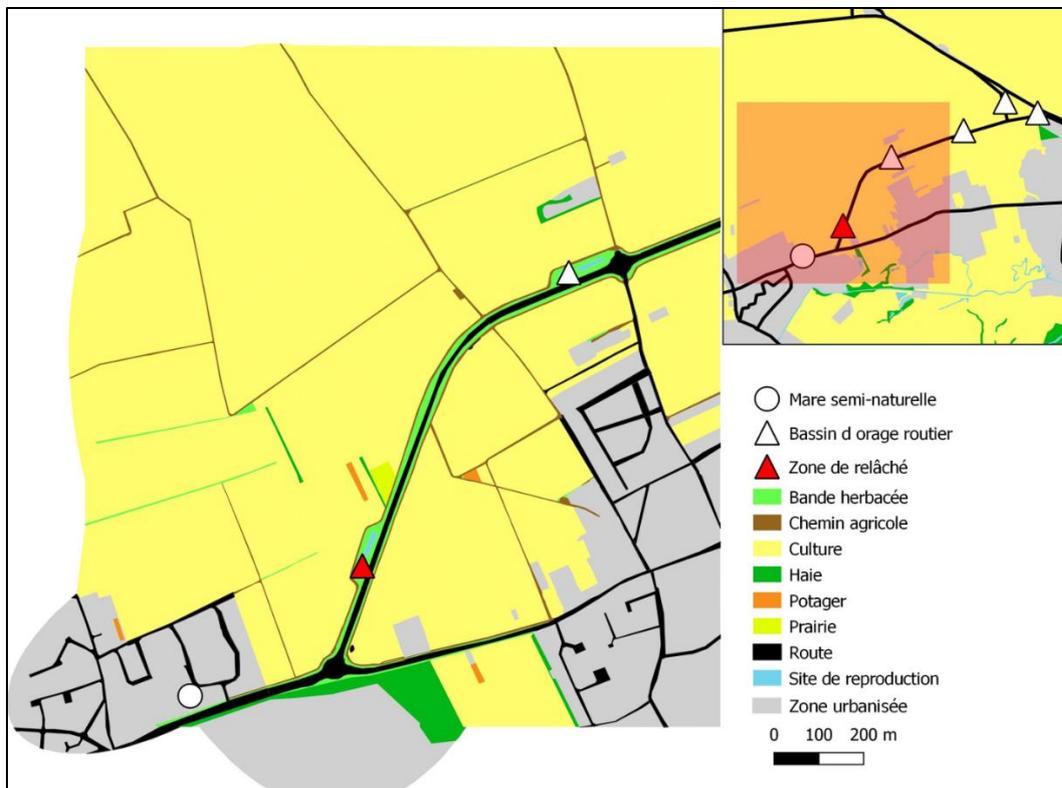


Figure 2 : Cartographie fine des différents types d'habitats naturels localisés au niveau de la zone d'étude

2.5. Analyses statistiques

Les domaines vitaux ont été estimés pour la durée totale de l'étude (reproduction + post-reproduction) ainsi que pour la période post-reproduction uniquement, via la méthode des « Autocorrelated Kernel Density Estimator » (aKDE ; *Estimateur par densité de noyau avec autocorrélation*). Cette méthode est basée sur un modèle de mouvement en temps continu (CTMM ; Calabrese *et al.* 2016), utilisant les coordonnées de géolocalisation GPS, la date et l'heure des points de contact des individus suivis. Le processus stochastique du CTMM utilisé était sélectionné à l'aide de l'AICc. La méthode de l'aKDE basée sur un CTMM a été préférée aux polygones convexes minimum (MCP) et estimateurs par noyau « simples » (KDE) car celle-ci permet de prendre en compte l'autocorrélation des données et est moins sensible à l'effort d'échantillonnage (Crane *et al.* 2021). Seuls les individus présentant assez de données pour obtenir une asymptote du variogramme (sélection stochastique par AICc) de position du CTMM étaient sélectionnés afin de ne conserver que des résultats robustes.

La préférence d'habitats a été évaluée en période post-reproduction à l'aide de l'indice de sélectivité ξ de Chesson (Chesson 1983). Cet indice se base sur l'indice de sélection α de Manly qui calcule pour un individu une probabilité d'utilisation α_i pour chaque type d'habitat i (Manly *et al.* 1972) à partir d'habitats disponibles pour un individu. Ces habitats disponibles ont été obtenus via le calcul des surfaces des différents types d'habitats naturels présents au sein des cercles d'un rayon égal à la distance maximale parcourue en un jour autour des points de détection pour chaque individu (Schai-Braun *et al.* 2013 ; Fiderer *et al.* 2019).

Enfin un test de Friedman a été réalisé pour rechercher une différence dans l'utilisation des gites.

L'ensemble des analyses statistiques et des graphiques a été réalisé sur R (v3.5.3, RStudio v1.2.1335, R Core Team, 2020) et GraphPad Prism 8.2.1 (San Diego, California, USA). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM.

3. Résultats

Sur l'ensemble des individus suivis, la trace de 58% d'entre eux (14/24) a été perdue avant la fin de l'étude, dont 10 ont été perdus en moins de 4 jours après relâché. D'autre part, 4 individus (17%) ont été retrouvés morts pendant le suivi. En période de reproduction, 6 des 10

individus équipés (60%) ont pu être suivis, malheureusement avec un nombre de localisations individuelles insuffisant sur la période de reproduction pour pouvoir estimer le domaine vital de reproduction. Néanmoins, une analyse des distances de déplacement restait possible, tout comme sur 10 des 14 individus (71%) équipés en période post-reproduction.

Concernant la mesure du domaine vital (de reproduction + post-reproduction), seulement 5/24 individus (20,8% ; 4 mâles et 1 femelle) ont été localisés suffisamment de fois pour pouvoir l'estimer de façon fiable. Cela concerne 3 des individus capturés en post-reproduction (pour lesquels les données de localisations pendant la reproduction ne sont donc pas connues, mis à part le site de reproduction : BO 195), et 2 des 10 individus capturés pendant la reproduction. En effet, ces 2 derniers ont interrompu définitivement leurs visites nocturnes au BO de reproduction assez rapidement après l'équipement, une part suffisante de leurs localisations correspond à la période post-reproduction.

3.1. Domaine vital

Sur l'ensemble de l'étude (période de reproduction + post-reproduction concernant $\sim 50,6 \pm 11,5$ jours de suivi par individu pour les 5 individus concernés), le domaine vital était en moyenne de $45,5 \pm 24,5$ ha. En période post-reproduction uniquement ($\sim 47,6 \pm 13,2$ jours), le domaine vital était en moyenne de $37,0 \pm 25,6$ ha (**Tableau 1**). Sur ces 5 individus, 3 d'entre eux ont montré un comportement net de migration vers un site de $16,9 \pm 3,9$ hectares où les individus étaient restés jusqu'à la fin du suivi ($48,5 \pm 17,3$ jours). Pour les 2 autres individus, un d'entre eux a été retrouvé écrasé sur la route et l'autre n'a été suivi qu'à partir du 6 septembre c'est-à-dire après la migration post-reproduction et continuait encore de se déplacer à la fin de l'étude.

3.2. Déplacements

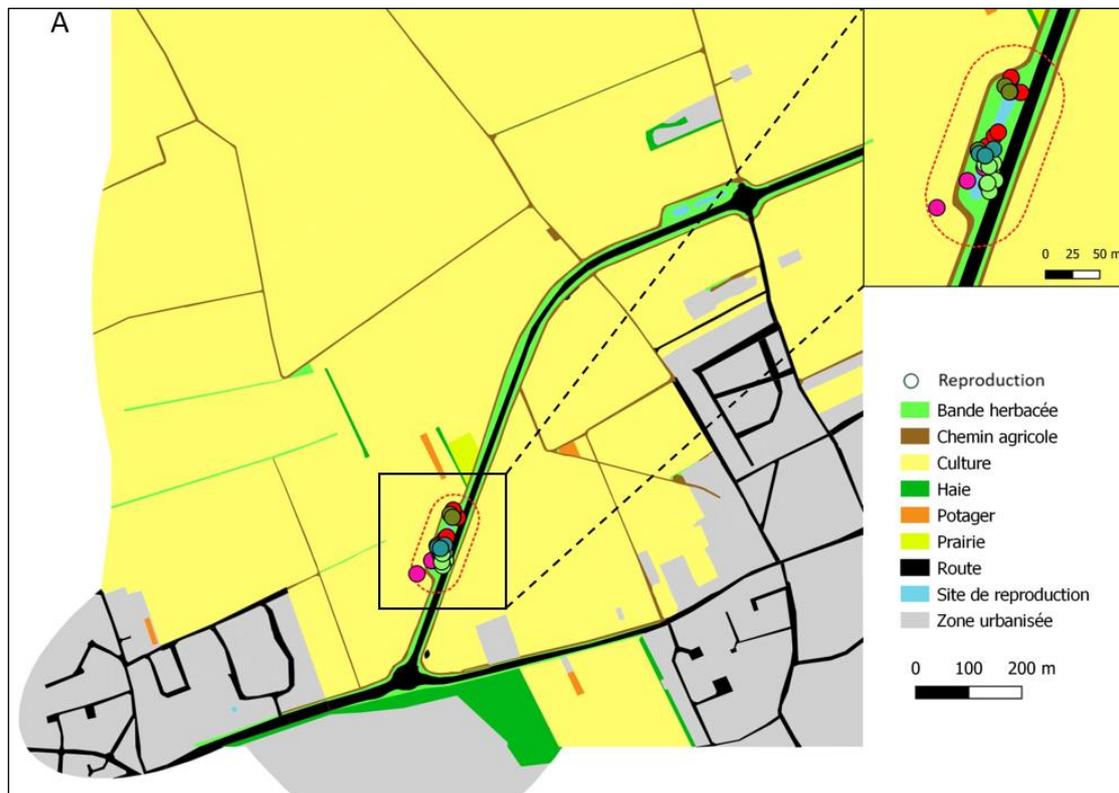
En période de reproduction, les 6 individus concernés s'éloignaient du site de reproduction en moyenne de $31,3 \pm 8,1$ m avec un maximum observé de 77 m (distances maximales moyennes de $47,0 \pm 7,4$ m ; **Tableau 1, Fig. 3A**). En période post-reproduction, les 10 individus concernés s'éloignaient du site de reproduction en moyenne de $472,8 \pm 74,8$ m avec un maximum de 716 m (distances maximales moyennes de $546,8 \pm 63,6$ m ; **Tableau 1, Fig. 3B**). Ces individus étaient majoritairement retrouvés le long des bandes herbacées.

En période de reproduction, les 6 individus concernés ont parcouru en moyenne des distances de $18,8 \pm 4,3$ m par jour, avec une distance maximale observée de 154 m en un jour (**Tableau 1**). En période de post-reproduction, les 10 individus concernés parcouraient en

moyenne des distances de $20,0 \pm 6,4$ m par jour, avec une distance maximale observée de 473 m en un jour (**Tableau 1**). La distance parcourue tout au long du suivi post-reproduction par ces 10 individus était en moyenne de $942,0 \pm 172,3$ m, avec un individu qui a parcouru 1945 m en 120 jours de suivi, se déplaçant jusqu'à 585 m à vol d'oiseau depuis le BO de reproduction (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Résultats obtenus pour les domaines vitaux et distances de déplacements en fonction des périodes de suivi (reproduction et post-reproduction)

| | Période de reproduction (n = 6) | | Période post-reproduction (n = 10) | |
|-------------------------------------|------------------------------------|--------|---------------------------------------|----------|
| | moyenne | max | moyenne | max |
| Domaine vital | ND | ND | $37,0 \pm 25,6$ ha | 138,8 ha |
| Éloignement du site de reproduction | $31,3 \pm 8,1$ m | 77 m | $472,8 \pm 74,8$ m | 716 m |
| Distance parcourue par jour | $18,8 \pm 4,3$ m | 27,8 m | $20,0 \pm 6,4$ m | 473 m |
| Distance totale parcourue | $102,8 \pm 24,9$ m | 154 m | $942,0 \pm 172,3$ m | 1945 m |



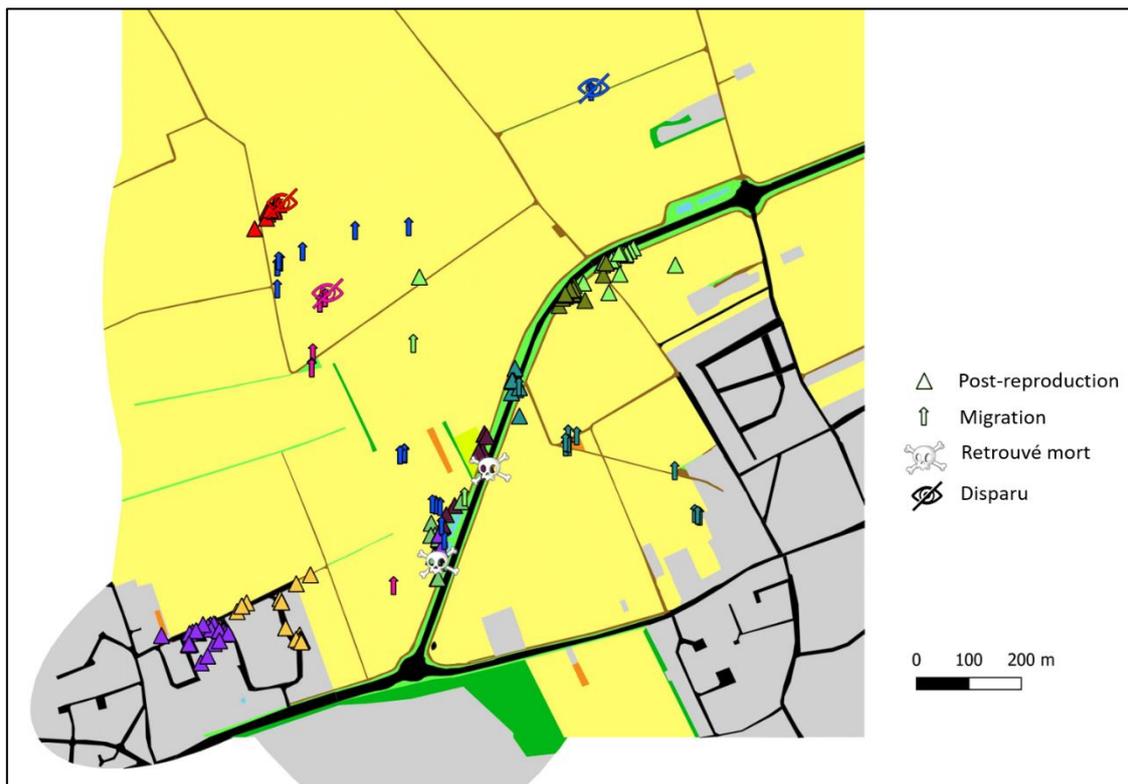


Figure 3 : Cartographie des différentes localisations. Panneau A, pendant la période de reproduction ($n=5$) avec la surface pointillée correspondant à la distance moyenne maximale parcourue par jour en période de reproduction (buffer de 47 m du bord du bassin) un zoom a été effectué afin de visualiser plus aisément la position des 5 individus ; Panneau B, en période de migration et de post-reproduction ($n=10$) dont 2 individus présentent uniquement des points de migration. Un individu est identifiable par sa couleur unique, utilisée dans les différents symboles et les deux panneaux A et B. Pour 3 individus il est possible de mettre en évidence une période de migration. De plus, 3 des individus ont disparu définitivement et 2 sont mort écrasés sur la route.

3.3. Préférence d'habitats

Concernant la préférence des habitats, qui n'a pu être testée que pour la période de post-reproduction ($n=10$ individus), que ce soit de jour ou de nuit, les individus évitaient les routes, les prairies et les haies. Mis à part pour un seul individu, un évitement des potagers était également observé. De jour comme de nuit, une nette préférence pour les bandes herbacées était observée, mis à part un individu qui était majoritairement rencontré en zone urbaine. En journée, aucun individu n'a été détecté sur un chemin agricole ou une route, contrairement à la nuit où les chemins n'étaient plus évités. De jour ou de nuit, les zones urbanisées et les cultures ne semblaient ni évitées ni sélectionnées avec notamment deux individus qui ont passé $82,2 \pm 14,8\%$ de la période post-migration en zone urbaine (Fig. 4).

Toujours pour les 10 individus suivis en post-reproduction, les terriers et galeries de micromammifères étaient majoritairement utilisés comme gîte quotidien dans $60,9 \pm 7,8\%$ des points de détection ($\chi^2=23,8$, $d=6$, $p<0,001$). En ôtant les deux individus ayant majoritairement

séjourné en zone urbaine ($67,2 \pm 5,5\%$ de cachettes liées à des jardins urbains), l'utilisation des terriers et des galeries étaient alors de $71,6 \pm 3,5\%$ (**Fig. 5**). À noter que sur les 9 habitats naturels présents sur la zone d'étude et sélectionnable par les individus, un seul n'a jamais été utilisé en période post-reproduction : les plans d'eau.

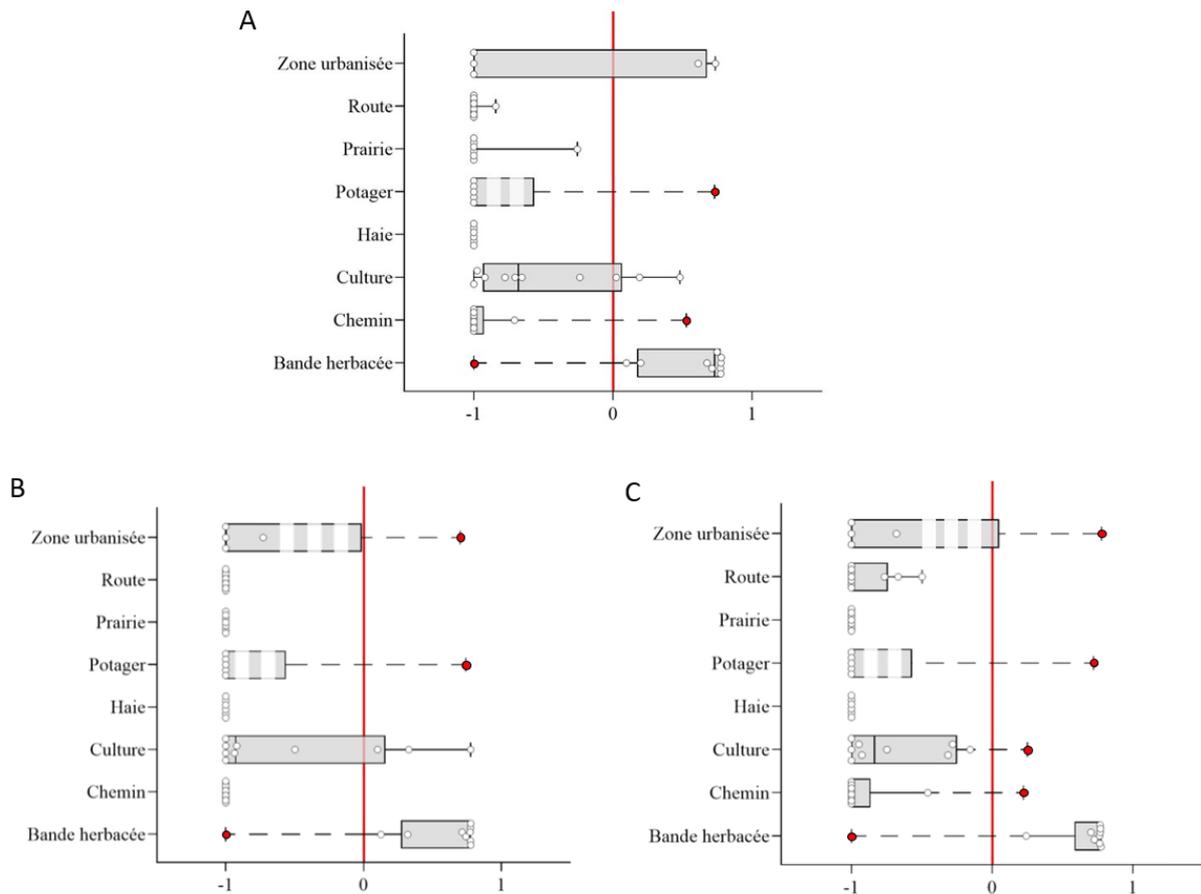


Figure 4 : Préférence d'habitat en période de post-reproduction (n= 10). Indice de sélectivité ζ de Chesson en fonction des différents types d'habitats retrouvés sur notre zone d'étude. (A) de jour comme de nuit, (B) uniquement de jour et (C) uniquement de nuit. Lorsque la boîte de dispersion tend vers 1 l'habitat est considéré comme sélectionné alors qu'il est considéré comme évité lorsque la boîte de dispersion tend vers -1. Si l'intervalle de confiance à 95% (traits pleins sans pointillés, les pointillés étant l'objet d'un seul individu) coupe la ligne rouge (0) alors il n'y a pas de différence significative. Les individus avaient tendance à sélectionner les bandes herbacées et évitaient les routes, prairies, haies et potagers. Les chemins étaient évités de jour uniquement. En revanche, les zones anthropisées et les cultures ne semblaient pas être ni évitées ni sélectionnées.

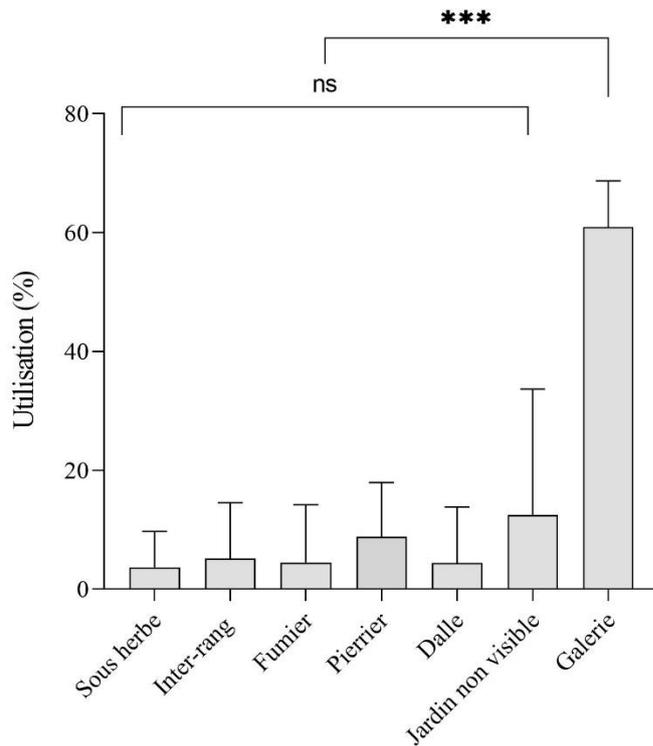


Figure 5 : Répartition et description des gîtes quotidiens utilisés par le Crapaud vert (N=10). La majorité des gîtes quotidiens (de repos) était des terriers et galeries de micromammifères ($\chi^2=23,8$, $d=6$, $p<0,001$ ***).

4. Discussion

La zone d'étude est représentative des paysages modifiés des plaines agricoles (du Bas-Rhin ou non), où le Crapaud vert se retrouve essentiellement dans des habitats de substitution (Michel 2013). Si les sites de reproduction sont plutôt bien connus, ce n'est pas le cas des habitats terrestres de l'espèce. Il est alors aujourd'hui impossible de proposer des actions conservatoires ou même de protection alors que cet habitat est censé être protégé par la loi, au moins en France. Sous cet angle réglementaire, deux questions se posent : Quoi protéger et jusqu'à où ?

4.1. Quels sont les habitats naturels terrestres utilisés préférentiellement par le Crapaud vert en période de post-reproduction ?

Pour des raisons de résolution statistiques liées à des effectifs trop faibles de localisations individuelles pendant la période de reproduction, seuls les résultats de la période post-reproduction seront exposés dans cette première partie de la discussion. Ces premiers résultats indiquent que l'espèce utilise préférentiellement les bandes herbacées retrouvées le long des routes et des parcelles de cultures, quelle que soit la période de la journée (jour vs nuit ;

Fig. 4). Ces bandes sont connues pour servir à la fois de lieu de vie, de chasse et de corridor à de nombreuses espèces d'insectes et de micromammifères, car elles sont similaires à des prairies fauchées tardivement (Bellamy *et al.* 2000 ; Fahrig & Rytwinski 2009). Dans des paysages très modifiés comme c'est le cas dans la présente zone d'étude, ces bandes herbacées peuvent même être les seuls habitats terrestres possédant un couvert végétal suffisant à l'accomplissement du cycle de vie des espèces présentes, aussi bien pour des micromammifères que des amphibiens (Jumeau *et al.* 2017). La sélection de ces bandes herbacées par le Crapaud vert n'est alors pas surprenante. Ce type de couvert végétal offre protection à l'espèce et les densités de terriers et de galeries de micromammifères dans lesquelles ce crapaud peut s'abriter y sont particulièrement élevées (Ernoul *et al.* 2013 ; Jumeau *et al.* 2017), tout comme la densité en insecte (Marshall *et al.* 2006), lui fournissant des ressources alimentaires abondantes. En effet, dans la présente étude, le Crapaud vert utilisait majoritairement ces terriers et galeries comme gîte quotidien (**Fig. 5**). Ils sont utilisés d'ailleurs aussi à proximité immédiats des bassins d'orage pendant la reproduction (observations personnelles). Ces mêmes terriers et galeries peuvent être retrouvés en cultures céréalières et en particulier dans des cultures denses comme le blé, ce qui peut expliquer un non-évitement des cultures annuelles par l'espèce dans notre étude. En revanche, un individu a été localisé à 9 reprises dans un champ de maïs, ce qui est étonnant, car ils sont souvent considérés comme des déserts faunistiques (Jumeau *et al.* 2017). De plus, cet individu a été localisé sous aucun abri, entre deux rangées de maïs, en périphérie de la parcelle : il considérerait peut-être ce couvert végétal suffisant pour le dissimuler de tout prédateur. À noter que le Crapaud vert est également capable de creuser son propre terrier sur sol meuble (Hoffman & Katz 1989), mais cela n'a pas été observé dans la présente étude. Concernant les deux individus retrouvés en zone urbaine, les gîtes exactes n'ont pas pu être précisément décrits car il était difficile d'avoir un visuel au sein de propriétés privées et clôturées (*e.g.* sous le perron, dans les platebandes de jardinets...).

Au regard des résultats de Stöck *et al.* (2008) et des résultats d'une étude parallèle menée en carrière forestière (Morand *et al.* données non publiées) qui montrent que le Crapaud vert utilise des anfractuosités du sol, des dessous de pierre et de souche, nous pouvons en déduire que l'espèce utilise tout type de cachettes pour son repos. Le Crapaud vert pendant sa phase terrestre devrait logiquement sélectionner des habitats naturels qui offrent en même temps le plus d'abris et de ressources alimentaires appropriés à l'espèce (Stevens *et al.* 2006). En accord avec cette étude (Stevens *et al.* 2006), menée sur le Crapaud calamite (*Epidalea calamita*), les haies pourtant si riches en diversité sont plutôt évitées par le Crapaud vert dans notre étude. De

façon surprenante et contrairement au Crapaud calamite (Stevens *et al.* 2006), espèce à écologie proche de notre modèle d'étude, nos résultats de sélection d'habitats montrent que les prairies, abritant de nombreux micromammifères (Butet *et al.* 2006), sont fortement évitées de jour comme de nuit. Toutefois, il est aussi possible qu'il s'agisse d'un biais de la zone d'étude, car les surfaces prairiales y étaient très faiblement représentées, donc avec une faible probabilité de rencontre, et bordant les bandes herbacées plus faciles à creuser. Nos résultats contraires à ceux de la littérature sur le Crapaud calamite renforcent cette hypothèse de biais de zone d'étude (Husté *et al.* 2006).

4.2. Jusqu'à quelle distance du bassin d'orage se trouvent les habitats de post-reproduction du Crapaud vert ?

Conformément aux hypothèses initiales, les domaines vitaux sont étendus, surtout en période post-reproduction ($37,0 \pm 25,6$ ha), qui prend en compte les distances non négligeables observées pendant la migration jusqu'à la zone de post-reproduction ($472,8 \pm 74,8$ m). Toutes ces informations sont primordiales, car c'est bien l'ensemble du cycle de vie qu'il faut bien comprendre dans un objectif de conservation de ces espèces et de protection pertinente de leurs habitats, aquatiques comme terrestres (Indermaur & Schmidt 2011).

Nos résultats de distances parcourues par jour coïncident avec ceux obtenus sur le Crapaud calamite dans des paysages similaires (en Allemagne 200 à 450 m par jour : Sinsch 1988 et en Espagne entre 164 et 1201 m par jour : Miaud *et al.* 2000). Ce n'est toutefois pas le cas pour les domaines vitaux estimés dans des paysages très différents comme en Italie le long de la rivière Tagliamento, où Indermaur *et al.* (2009) ont obtenu des domaines vitaux pour le Crapaud vert 150 fois plus petits que les nôtres ($0,24 \pm 0,03$ ha contre $37,0 \pm 25,6$ ha). Cette différence suggère un effet du paysage où le Crapaud vert devrait parcourir de plus grandes distances pour trouver les ressources nécessaires à son cycle de vie, phénomène déjà observé chez d'autres espèces d'amphibiens (*Lithobates sylvaticus* : Gibbs 1998 ; *Epidalea calamita* : Stevens *et al.* 2006). Cette hypothèse de faible disponibilité locale en ressources (dans la plaine du Bas-Rhin) est toutefois peu probable, car les bandes herbacées que l'espèce utilise pour le gîte sont également intéressantes pour son alimentation (Marshall *et al.* 2006) et, surtout, étaient disponibles en nombre à proximité immédiat des bassins d'orage étudiés. La raison qui a poussé les individus étudiés à parcourir de si grandes distances reste encore peu claire.

4.3. Préconisations

Pour résumer les résultats et leur interprétation, l'habitat terrestre du Crapaud vert peut s'étendre en moyenne jusqu'à $546,8 \pm 63,6$ m du lieu de reproduction (distances maximales individuelle moyenne, sachant qu'un individu s'est éloigné de 716 m du site de reproduction) et concerne tous les habitats naturels pouvant au minimum abriter des cachettes telles que des terriers et galeries de micromammifères. Nous proposons donc, pour tout type de paysage comparable, donc très dégradé, de focaliser les actions de conservation et de protéger l'ensemble des habitats naturels concernés dans un rayon d'au moins 550 m autour du site de reproduction. La gestion de ces habitats au sein de cette zone de protection devrait prendre en compte la présence de l'espèce, par exemple en y aménagement des cachettes artificielles ou en favorisant une trame ou des patchs de couvert végétal permanent favorable aux insectes et aux micromammifères et donc aux ressources nécessaires pour le Crapaud vert. L'utilisation de biocides ainsi que la profondeur de labour devraient également être limitées afin de ne pas détruire chaque année les terriers pouvant être utilisés par l'espèce. Notons que deux cas de mortalité observés correspondaient à des labours récents après récolte du maïs.

Par ailleurs, lors de la création de nouveaux habitats artificiels ou semi-naturels favorables au Crapaud vert (mares, bassins d'orages routiers, bassins industriels...), il devrait être nécessaire de s'assurer de la présence de ces habitats terrestres favorables dans un rayon très proche ($47,0 \pm 7,4$ m ; moyenne des distances maximales parcourues par jour, sachant qu'un individu a parcouru 65 m en un jour). Enfin, installer et maintenir des bandes herbacées est probablement une très bonne préconisation et serait de même nature que celle proposée pour une espèce également en danger d'extinction dans l'Europe de l'Ouest (et en Alsace) ; le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) pour lequel un rayon de 600 m de protection autour de ses terriers est instauré en France depuis une dizaine d'années déjà (arrêté du 31 août 2012).

4.4. Limites de cette étude

Les études de télémétrie sur des espèces si petites et au grand domaine vital sont toujours source de difficultés (grand effort d'échantillonnage nécessaire, fortes pertes d'individus par prédation ou dispersion). Aussi, les limites de l'étude doivent clairement être discutées afin de considérer au mieux les préconisations énoncées. Tout d'abord, certains émetteurs issus d'individus perdus ont été retrouvés après récolte du maïs (réalisé en septembre/octobre dans la zone d'étude). Comme la distance de détection dans un champ de maïs de plus de deux mètres

de haut n'était dans cette étude que de quelques mètres, il est fort possible que l'utilisation des champs de maïs par le Crapaud vert ait été sous-estimée. L'utilisation de radio-émetteurs utilisant une autre fréquence d'émission *e.g.* 30 MHz (vs 150 MHz actuellement) déjà utilisés pour le hamster d'Europe vivant dans des terriers dans les champs de blé et de maïs pourrait être une solution.

Ensuite, les effectifs sur lesquels les analyses de domaines vitaux ont pu être réalisées étaient très faibles : seuls 5 individus (20%) présentaient assez de points de détection. Il est assez probable que les valeurs de distances et de surfaces utilisées soient sous-évaluées. Il aurait été possible d'utiliser plus d'individus en changeant de méthodes, mais celles-ci (MCP et KDE) sous-estiment systématiquement les domaines vitaux (Crane *et al.* 2021), ce qui aurait été contre-productif. Enfin, même si dans l'article définitif l'analyse sera réalisée sur 3 sites et non 1 seul comme dans la présente version, les effectifs de sites restent faibles (perte d'individus pouvant être partis plus loin), également source de potentielles sous-estimations. Une protection à 600 m serait alors plus prudente et serait homogène avec le hamster d'Europe.

5. Conclusion

Au sein d'un paysage fortement dégradé composé majoritairement de terres agricoles fragmentées par un réseau de routes et de zones urbaines très densifié, le Crapaud vert parcourt de grandes distances et possède un domaine vital étendu. De ce fait, nous proposons une zone de protection de l'habitat terrestre sur un rayon de 550 à 600 m autour de chaque site de reproduction avec un accent sur la création et l'entretien de bandes herbacées et la limitation des pratiques agricoles intensives.

Discussion de l'étude 7 :

L'habitat terrestre du Crapaud vert était une étude qui me tenait à cœur depuis la première année de thèse. En effet, compte tenu des résultats de l'étude 6, mais également l'absence de littérature traitant ce sujet, l'envie était forte de réaliser une telle étude via une approche de radio-télémetrie. De plus, le besoin de ce type de données était urgent, sachant que depuis le 8 janvier 2021, même l'habitat de repos du Crapaud vert est protégé. Il me semblait donc indispensable de mieux connaître les caractéristiques de cet habitat terrestre pour pouvoir agir sur la conservation de cette espèce d'amphibien. Ayant déjà réalisé une approche de télémetrie sur différentes espèces (Tortue d'Hermann et Hérisson d'Europe), j'étais d'autant plus motivé pour réaliser cette étude, même si je savais déjà que ce travail de terrain allait demander d'énormes investissements de terrain et de soirées d'insomnies. Mais, grâce aussi à l'investissement de mes deux encadrants et des opportunités qu'ils m'ont fait partager pour obtenir le financement de nombreux stagiaires et CDD, nous avons finalement réussi à réaliser ce terrain, plus difficile encore que prévu.

En effet, plus de la moitié des individus (58,3%) ont été perdus assez rapidement, et certains jamais retrouvés. De plus, nous avons pu confirmer la mort de 4 de ces individus disparus, les émetteurs ayant été retrouvés dans des excréments de hérisson, émettant depuis une couleuvre helvétique, ou retrouvés (intacts ou non) dans des cadavres écrasés sur les routes. Pour finir, 25% des individus ont été suivis sur la totalité de la durée de la batterie de l'émetteur. Ces résultats peuvent paraître frustrants, compte tenu de l'effort d'échantillonnage qui a été mis en place, avec du terrain diurne, nocturne et également pendant les week-ends. Néanmoins, les résultats sont déjà concluants et permettront je l'espère, de mettre en place des mesures de conservations pour l'espèce, du moins à proximité des bassins d'orage routiers et éventuellement dans des paysages similaires au nôtre (majoritairement composé de terres agricoles).

L'analyse des données nous a permis de mettre en évidence que dans ce type de paysage, le Crapaud vert était capable de parcourir de grandes distances. Cela avait déjà été observé dans une autre étude que je réalise depuis 2020. En effet, un suivi par Capture-Marquage-Recapture nous a permis de mettre en évidence le déplacement d'un individu entre une mare et un bassin d'orage séparé d'une distance de 2 km à vol d'oiseau. Néanmoins, ce type de déplacement entre sites a rarement été observé dans cette étude CMR, et jamais lors de l'approche par télémetrie.

Pour finir, nous avons également suivi d'autres individus sur 2 autres sites dont les données seront analysées après la thèse. En outre, l'habitat terrestre de l'espèce est également étudié par nos collègues du CEREMA en Lorraine et nos collègues de BUFO dans le Haut-Rhin. L'objectif final auquel je compte aussi participer après la thèse sera de compiler l'ensemble de ces données afin de mettre en place des mesures de conservation de l'habitat terrestre du Crapaud vert dans le Grand-Est.

Conclusion du troisième chapitre

L'objectif du troisième et dernier chapitre de cette thèse était de mettre en évidence l'utilisation des bassins d'orage routiers comme sites relais, mais également de mettre en évidence les éléments du paysage indispensables au bon déplacement du Crapaud vert en phase terrestre dans un paysage dégradé comme la plaine d'Alsace (Bas-Rhin).

D'après nos résultats, les bassins d'orage sont bien utilisés comme site relais pour coloniser le paysage. Par conséquent, il est primordial de les considérer comme des sites pouvant abriter les amphibiens et en particulier le Crapaud vert. De plus, malgré que certains bassins d'orage soient considérés comme des pièges écologiques, tenter de les clôturer afin d'empêcher les amphibiens d'y pénétrer n'est pas une solution viable, car cela entraînerait un isolement structurel des populations.

Pour finir, nos résultats montrent que le Crapaud vert se déplace sur de grandes distances essentiellement en période post-reproduction en utilisant préférentiellement les bandes herbacées pour se déplacer et les terriers de micromammifères pour se reposer. Ces habitats doivent donc être maintenus et gérés en fonction de l'espèce autour de ses sites de reproduction (rayon de 600m). Il serait également intéressant de mettre en place systématiquement des bandes herbacées à proximité de nouveaux bassins d'orage pouvant être colonisés par le Crapaud vert.

Discussion générale

Le but premier de cette thèse était d'étudier le rôle écologique des bassins d'orage routiers pour les amphibiens. Initialement, cette problématique a émergé à la suite d'une étude réalisée lors de la thèse de Jonathan Jumeau soutenue en 2017, lorsqu'il était sur le terrain au bord des routes pour étudier les micromammifères. Pendant ses études, il entendait régulièrement des amphibiens chanter dans les bassins d'orage routiers. Cette observation lui a donné envie d'y jeter un œil de plus près et de s'intéresser à cette problématique qui commençait récemment à voir le jour dans la littérature scientifique (Scher & Thiéry 2005 ; Snodgrass *et al.* 2008 ; Le Viol *et al.* 2012). Finalement, Jonathan a décidé de réaliser une étude afin d'inventorier les bassins d'orage routiers du Bas-Rhin, ce qui a permis de mettre en évidence la présence de différentes espèces d'amphibiens. Son étude publiée en 2020 (Jumeau *et al.* 2020) montrait une richesse spécifique en amphibiens très importante dans ces sites, pouvant même être similaire à celle des mares semi-naturelles à proximité. Ces résultats coïncidaient avec ceux déjà obtenus en région parisienne par Isabelle Le Viol (2012). De plus cette étude a révélé la présence d'une espèce rare et même en danger d'extinction au niveau régional : le Crapaud vert (*Bufo viridis*). Parallèlement à cette approche quantitative (nombre d'espèces, abondances, nombre de bassins concernés), d'autres études dans le monde portent sur le rôle potentiel de piège écologique des bassins d'orage, dont la fonction principale est de collecter, stocker et dépolluer les eaux de ruissellement de la chaussée (Brand *et al.* 2010 ; Clevenot *et al.* 2018 ; Sievers *et al.* 2018). En effet ces sites pollués abritant de la biodiversité peuvent avoir un impact négatif sur le maintien de populations qui s'y trouvent. C'est pourquoi une approche qualitative était nécessaire afin de compléter les observations faites par Jonathan. Cette présente thèse a alors été imaginée puis financée à la fois par la Région Grand-Est, la DREAL Grand-Est et la Collectivité européenne d'Alsace.

Cette thèse a débuté en décembre 2018 et a été prolongée suite au confinement induit par la crise sanitaire de 2020. Pendant ces 3 ans et 9 mois, j'ai monté et mené différentes études, dont une grande partie a été détaillée dans ce manuscrit. Cela a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les bassins d'orage du département du Bas-Rhin, mais également sur le Crapaud vert, espèce peu étudiée sur son aire de répartition et encore moins en France. Les résultats obtenus vont essentiellement pouvoir être utilisés pour donner des recommandations

aux aménageurs routiers, aux associations de protection de la Nature, mais également aux autorités compétentes (DREAL-DDT) et aux conseils scientifiques (CNPN-CSRPN). Enfin, les différentes démarches scientifiques entreprises pendant ces trois années nous ont menés à nous questionner sur d'autres perspectives de recherche qui pourraient suivre ce travail de thèse.

I) Apport de nouvelles connaissances

1) Les bassins d'orage routiers et les amphibiens

Les résultats obtenus dans cette thèse ne nous permettent étonnamment pas d'affirmer clairement que les bassins d'orage routiers sont des pièges écologiques pour les amphibiens. Par définition, un piège écologique est un habitat présentant une forte attractivité, alors que sa mauvaise qualité environnementale entraîne un effet négatif sur la valeur sélective des individus « piégés » (*fitness*, e.g. survie, reproduction ; Schlaepfer *et al.* 2002). Or il a été constaté que la qualité individuelle des grenouilles vertes adultes n'était pas plus faible dans les bassins d'orage que dans les mares semi-naturelles. Néanmoins, la reproduction du Crapaud vert était négativement impactée, avec une survie larvaire quasiment nulle dans les bassins. Bien que plusieurs études affirment que la pollution des bassins d'orage impacte négativement la survie, la croissance et le comportement de nage des têtards (Snodgrass *et al.* 2008 ; Brand *et al.* 2010 ; Dorchin & Shanas 2010 ; Gallagher *et al.* 2014 ; Sievers *et al.* 2018), les résultats montrent que la survie larvaire dans les bassins semble non pas être influencée par la pollution, mais plutôt par la présence d'une espèce de sangsue prédatrice des têtards (*Helobdella stagnalis*).

Les têtards de Crapaud vert exposés à du sédiment pollué sembleraient alors ne pas être impactés. Or on retrouve dans la littérature un impact de la pollution du sédiment sur la survie et le comportement des têtards chez d'autres espèces d'amphibiens (*Dryophytes versicolor*, *Lihobates pipiens* & *Limnodynastes tasmaniensis*) (Brand *et al.* 2010 ; Leduc *et al.* 2016 ; Sievers *et al.* 2018). De plus les concentrations en polluants testées dans le cadre de nos travaux étaient supérieures aux doses sublétales connues pour certains amphibiens (MacDonald *et al.* 2000), mais également aux doses utilisées dans les précédentes études. Par conséquent, il serait possible que le Crapaud vert soit une espèce plus tolérante aux polluants. Par ailleurs il a déjà été montré qu'il s'agissait d'une espèce très tolérante aux concentrations en sel élevées dans l'environnement (~15g/L i.e. 50 % d'eau de mer, Katz 1973, 1975 ; Katz *et al.* 1984).

Ce second résultat qui prouve que la survie est négativement impactée uniquement par la présence d'une sangsue prédatrice des têtards était inattendu et très intéressant. En effet, cela met en évidence un comportement de prédation d'une espèce de sangsue commune (*Helobdella*

stagnalis) sur des têtards d'un amphibien, chose qui n'avait jamais été observée chez cette espèce. Bien qu'il ait déjà été montré que cette sangsue commune est capable de s'attacher aux amphibiens adultes (Zimic 2015 ; Stark *et al.* 2017), aucune preuve indique un réel comportement de parasitisme. Par ailleurs il n'est nullement fait mention de relation avec les têtards et encore moins de prédation. Néanmoins, la prédation des têtards par d'autres espèces de sangsues a déjà été mise en évidence dans d'autres pays (Berven & Bolt 2001 ; Schalk *et al.* 2002 ; Maglangit *et al.* 2020).

Occurrence/abondance d'*Helobdella stagnalis* dans les sites de reproduction du Crapaud vert

Ainsi une autre étude est menée sur les bassins d'orage, dans le but d'estimer l'occurrence et l'abondance d'*Helobdella stagnalis* sur les sites de reproduction du Crapaud vert. Ces résultats à venir permettront de montrer si l'espèce influence la survie et la reproduction des individus adultes de Crapaud vert. En parallèle, cette étude cherche également des moyens de lutte contre cette espèce de sangsue afin de limiter son impact sur la survie des têtards d'amphibiens présents dans ces bassins d'orage. Les premières données de cette étude ont permis d'affirmer que cette espèce est présente dans des bassins très récents (< 2ans). De ce fait, une question se pose sur son pouvoir de colonisation. Il faut alors tempérer la survie nulle observée dans le cadre de nos études au sein des bassins. Lors de nos prospections sur les sites, certains bassins d'orage hébergeaient de jeunes individus métamorphosés de Crapaud vert. On peut alors supposer que certaines années la survie larvaire est positive. Il serait donc possible de discerner différents cycles annuels, (i) avec une forte reproduction du Crapaud vert, un nombre important de pontes et de têtards permettant à certains d'entre-deux d'atteindre la métamorphose malgré la prédation ; soit (ii) des cycles d'abondances de sangsues avec des années à forte densité et d'autres moins. Il a déjà été montré qu'à la suite d'épisodes de chaleur cette espèce pouvait proliférer dans les lacs (SudOuest 2010). Ainsi le climat extrêmement variable d'une année à l'autre avec une alternance de printemps chaud et sec (2020 et 2022), de printemps tempéré et humide (2019 et 2021), pourrait influencer sur la présence, mais surtout l'abondance de sangsues. Pour finir, il a également été montré que les premières années après la création des bassins d'orage, des pics de reproduction de Crapaud vert ont été observés avec une quantité importante de jeunes individus métamorphosés (Berna *et al.* 2021). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la sangsue *Helobdella stagnalis* mettrait au moins 2 ans pour coloniser un site (observation personnelle) et que cela doit aussi dépendre d'autres bassins se

trouvant à proximité. Finalement, s'il est possible de discerner des années à forte reproduction, cela peut permettre aux populations de Crapaud vert de se maintenir dans le temps.

Voici alors la réponse à la question centrale de la thèse : les bassins sont-ils des sources ou des pièges écologiques ? Pour le Crapaud vert, durant les premières années après la construction d'un bassin, celui-ci peut être considéré comme une source car l'habitat correspond parfaitement aux besoins écologiques de l'espèce. Puis après colonisation du bassin par la sangsue *Helobdella stagnalis*, celui-ci devient un piège, tant que cette espèce y est présente en fortes densités. Il est possible que les bassins d'orage redeviennent des sources, mais les mécanismes d'un tel changement sont peu clairs et nécessitent de plus grandes investigations, actuellement au sein du laboratoire.

Mise en évidence d'un comportement de parasitisme d'une espèce de sangsue sur le Crapaud vert

Une autre étude a également été réalisée en 2022 par notre équipe, mais non intégrée dans cette thèse pour ne pas l'alourdir. Cette étude consistait à tester si cette espèce de sangsue était capable de parasiter les crapauds adultes ou s'il s'agissait exclusivement d'un comportement de phorésie (*i.e.* déplacement en utilisant un autre individu). Effectivement, nous avons déjà validé un comportement de prédation des sangsues sur les têtards et également la présence de sangsues attachées à des adultes en milieu naturel, mais nous n'avons pas étudié le comportement de parasitisme/phorésie des sangsues sur les adultes. Pour cette étude, réfléchi en amont avec un expert des sangsues d'Europe (Benoit LeCaplain), nous avons dans un premier temps fait jeûner une centaine de sangsues (*Helobdella stagnalis*) afin qu'elles vident entièrement leur tube digestif et montrent une coloration claire quasiment translucide. Ensuite, nous avons mis en place 2 conditions : une où 7 Crapauds verts étaient exposés à 20 sangsues à jeun, et une condition contrôle où les crapauds n'étaient pas exposés à des sangsues. Nous avons également un aquarium où nous gardions des sangsues à jeun. Dans cette étude, qui a duré 1 mois, aucune sangsue n'a été observée accrochée aux crapauds alors que nous l'avons observé à plusieurs reprises dans le milieu naturel. De plus, les crapauds ne semblaient pas impactés par la présence de sangsue (*i.e.* pas de différence de masse entre conditions). Des analyses colorimétriques des sangsues nous ont toutefois permis de mettre en évidence que les sangsues exposées avec des crapauds avaient une coloration qui évoluait positivement au cours du temps avec un assombrissement qui pourrait traduire une éventuelle prise alimentaire. En revanche, le fait de n'avoir pas observé de sangsue sur les crapauds nous laisse perplexes devant

ces résultats qui nécessiteraient des études complémentaires.

2) Les amphibiens face à des obstacles physiques pour leur conservation

Comme évoqué dans l'introduction (§II), de nombreux amphibiens sont écrasés chaque année sur les routes. Ces infrastructures fragmentent le paysage et se trouvent parfois au niveau de couloirs de dispersion des amphibiens, avec un impact non négligeable sur ces populations (Bruinderink & Hazebroek 1996 ; Laist *et al.* 2001 ; Rao & Girish 2007). Afin de réduire cette mortalité et limiter l'isolement des populations induit par la construction d'infrastructures de transport (*e.g.* routes et voies ferrées), des passages à faunes sont installés (Yanes *et al.* 1995 ; Clevenger *et al.* 2001 ; Testud & Miaud 2018). Ces passages à faunes sont équipés d'une clôture et d'un tunnel ou d'un pont en fonction des espèces cibles (grande faune *vs* petite faune). Dans notre cas, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la petite faune.

Ces passages à petite faune sont construits dans le monde entier pour limiter les effets directs induits par les routes. Malheureusement, mis à part le tunnel en lui-même (Beebee 2013 ; Testud 2020) peu d'études s'intéressent à l'efficacité des clôtures petite faune (Dodd *et al.* 2004 ; Brehme *et al.* 2021). Malgré ce constat, de nombreuses mesures sont mises en place le long des routes, mais également autour des bassins d'orage sans réelles informations sur leur efficacité pour stopper la petite faune comme les amphibiens (*e.g.* grillage métallique).

Ce constat nous a poussés à étudier l'efficacité de différents types de clôtures petite faune utilisées le long des routes à travers le monde. Pour ce faire, nous avons mis au point un protocole complexe élaboré dans le but de motiver au maximum les individus testés à franchir la clôture. En effet, d'après la littérature les amphibiens sont attirés par l'odeur, mais également le chant d'autres individus (Gerhardt 1995 ; Muller & Schwarzkopf 2017). De ce fait, nous avons installé au sein d'une arène de test un haut-parleur diffusant des chants d'amphibiens, mais également des individus de l'espèce testée pour la diffusion de molécules olfactives. D'après nos résultats, ces mesures prises sont efficaces, car les individus ont tous tenté de franchir les clôtures testées toute la nuit et sans s'arrêter. De plus, notre protocole a permis de mettre en évidence qu'il était indispensable de réaliser des répliques, car nous avons observé des succès de franchissement à partir d'une seconde nuit de test. Dans l'avenir, si des tests d'efficacité doivent être réalisés sur les amphibiens, il est primordial de les répliquer.

Les résultats obtenus lors de ces études concernant les amphibiens permettent d'affirmer que le grillage métallique utilisé majoritairement le long des routes françaises est peu efficace

pour les amphibiens qui arrivent à l'escalader aisément. En revanche, l'ajout d'un bavolet de 10 cm au sommet de cette clôture améliore son efficacité mais comme le grillage métallique est facilement altérable, la présence de brèches le long du grillage permet aux individus de traverser la clôture. De plus, les juvéniles sont capables de passer au travers la maille de 6x6 mm. Les clôtures en grillage métallique ne sont pas des clôtures à recommander pour stopper la petite faune.

D'autres types de clôtures existent, c'est le cas des clôtures en béton, en tôle métallique en PVC ou encore en bois. Parmi ces clôtures celles en béton et en tôle métallique sont les plus résistantes et pérennes. Notre étude a permis de prouver que les clôtures en béton et en tôle métallique d'une hauteur de 40 cm munis d'un bavolet de 10 cm permettaient de stopper une majorité des espèces testées. De plus, nous avons mis en évidence qu'en fonction du mode de locomotion l'efficacité de ces clôtures était différente. En effet, une clôture d'une hauteur de 40 cm munie d'un bavolet de 10 cm n'est pas suffisante pour stopper les amphibiens capables d'effectuer de grand saut (*e.g.* famille des *Ranidae*). En revanche ce type de clôture permet bien de stopper les autres espèces testées. Il est donc possible qu'il en aille de même pour les espèces ayant un type de locomotion similaire (*e.g.* famille des *Bufo*nidae, *Alytidae*, *Pelobatidae*, *Pelodytidae*, *Bombinatoridae*, *Hylidae*, *Salamandridae*). De plus, ces clôtures opaques ne permettent pas aux individus de voir l'autre côté, de ce fait, et comme le précise Breheme *et al.* (2021), les individus peuvent plus facilement longer la clôture jusqu'au passage à faune, même si pour certaines espèces ce comportement peut parfois être très limité (Matos *et al.* 2018).

3) Le Crapaud vert (*Bufo*tes *viridis*) hors de l'eau

Peu d'études se sont intéressées aux déplacements en phase terrestre des amphibiens, et encore moins à ceux du Crapaud vert. Malgré son statut de protection, son utilisation de l'habitat terrestre reste méconnue ce qui induit des biais dans les mesures de conservation associées à ces habitats.

De plus, les bassins d'orage routiers étant des sites pollués, ne sont pas considérés comme des sites abritant les amphibiens. De ce fait, les mesures de gestion de ces bassins (fauche de la végétation, curage et faucardage) ne sont pas réalisées en fonction de la présence des amphibiens. Les autorités compétentes sous pression des associations de protection de la nature veulent alors clôturer ces bassins même si les clôtures utilisées (*e.g.* grillage métallique)

sont inefficaces. Cloisonner ces bassins alors qu'il ne reste quasiment plus de zones humides dans la plaine d'Alsace est problématique.

À l'aide de modèles de déplacement, nous avons simulé le cloisonnement des bassins d'orage, mais également l'ajout de nouveaux bassins d'orage couplés à de nouvelles routes. Ces résultats nous permettent de dire que le cloisonnement des bassins d'orage entraînerait un isolement important des populations de Crapaud vert dans le Bas-Rhin, isolement similaire à ce que l'on observerait en enlevant les mares semi-naturelles utilisées par l'espèce. Nos résultats prouvent également que ces bassins d'orage peuvent être utilisés comme sites relais afin de coloniser le paysage et sont donc très importants même s'ils semblent peu appropriés à la reproduction. Par conséquent, les cloisonner n'est pas une solution viable pour l'espèce. Il est donc important de prendre en compte les bassins d'orage au sein des unités fonctionnelles du Crapaud vert.

Ce constat nous a donc amenés à étudier les déplacements du Crapaud vert en phase terrestre en utilisant la méthode de radio-téléométrie. Cette méthode nous a permis de localiser précisément chaque individu et *in fine* d'obtenir des domaines vitaux estimés et des préférences d'utilisation d'habitat. Les résultats de cette étude, très attendus par la DREAL, nous montrent que le Crapaud vert se déplace sur de grandes distances, du moins dans le paysage de notre zone d'étude composé majoritairement de terres arables, de zones urbaines, et de routes couplées à des bassins d'orage où l'espèce se reproduit. En effet, les individus s'éloignaient en moyenne de $546,8 \pm 63,6$ m de leur site de reproduction, et avaient un domaine vital moyen en période post reproduction de $37,0 \pm 25,6$ ha. De plus, nous avons également montré qu'ils sélectionnent les bandes herbacées pour se déplacer, et utilisent majoritairement les terriers de micromammifères comme gîtes quotidiens.

Ces résultats sont les seuls obtenus sur cette espèce en France dans ce type de paysage. Dans la littérature, à notre connaissance seul Indermaur *et al.* (2011) avait étudié précisément les déplacements de *Bufo viridis* en phase terrestre, mais dans un paysage naturel spécifique localisé à proximité de la rivière Tagliamento en Italie et non soumis à la pression humaine. D'après la littérature, il semblerait que la répartition du Crapaud vert est distribuée dans des pays industrialisés, présentant une surface importante de terre agricole (Europe de l'Est ; Bazin & Bourdeau-Lepage 2011). De ce fait, nos résultats pourront éventuellement être transposables sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce.

II) Recommandations

Cette thèse a débuté par une période intense de terrain afin de rechercher et mettre en évidence de la manière la plus exhaustive possible la localisation des sites de reproduction du Crapaud vert. Lors des prospections de 2019, 69 bassins d'orage routiers et 56 mares semi-naturelles ont été inventoriés. Sur l'ensemble de ces sites, seuls 15 bassins d'orage routiers et 25 mares semi-naturelles abritaient des individus de Crapaud vert. En revanche, l'ensemble de ces sites n'ont pas abrité des crapauds verts sur l'ensemble du suivi (2020 à 2022). Cela était majoritairement dû à la fermeture du milieu et à l'assèchement de certaines mares semi-naturelles. De plus, chaque année, de nouveaux sites de reproductions sont découverts (nouveaux bassins d'orage et nouvelles mares). Il est donc difficile d'établir une carte de répartition exhaustive du Crapaud vert. Par conséquent, il serait intéressant de mettre en place des mesures de gestions des mares semi-naturelles retrouvées dans les zones de présences de l'espèce afin de les rendre les plus attractives possible et permettre une meilleure reproduction. De plus, comme c'est le cas pour de nombreuses espèces d'amphibiens, les conditions météorologiques jouent un rôle important dans la détection des individus. En effet, durant nos différentes années de suivi, des années pluvieuses et sèches se sont enchaînées. Ce constat a entraîné un nombre réduit de captures durant les sécheresses alors qu'à la même période sur les mêmes sites, une année favorable, il était possible de capturer entre 30 et 100 individus en une session. De ce fait, il peut être recommandé aux personnes réalisant des inventaires crapauds verts et autre (bureau d'étude, association), de favoriser les nuits lors de la période de reproduction de l'espèce (*e.g.* avril à juillet pour le Crapaud vert) après de gros orages surtout durant les années sèches afin d'éviter de réaliser des sorties à blanc. De plus, chaque année de nouvelles mares sont créées pour le Crapaud vert (*e.g.* mare de compensation du Contournement Ouest de Strasbourg), il serait intéressant de mettre au courant l'ensemble des acteurs travaillant sur l'espèce afin de pouvoir suivre ces mares dès leur mise en place. Une recommandation forte que nous faisons serait alors de rendre public l'ensemble des sites colonisés par le Crapaud vert et d'alerter l'ensemble des acteurs concernés lors de la création d'un point d'eau à proximité d'un point connu.

Les études réalisées pendant cette thèse me permettent de dire que les bassins d'orage routiers en tant que tels ne sont pas toujours favorables pour les amphibiens et notamment pour le Crapaud vert. En revanche, les clôturer de manière efficace entrainerait un isolement important des populations déjà grandement impactées par les infrastructures routières. Il faut donc focaliser les actions de conservation sur la gestion des bassins sans en interdire l'accès. Il

faut trouver des mesures pour lutter contre la sangsue *Helobdella stagnalis*. La seule méthode naturelle (*i.e.* sans produit chimique) pour limiter la présence de sangsues dans les bassins d'orage serait de diminuer le niveau d'eau en hiver ce qui permettrait à celle-ci de geler et entraînerait la mort des sangsues (Sawyer 1973), ce qui est observé dans les mares semi-naturelles n'ayant pas une hydropériode permanente. Néanmoins, avec le réchauffement climatique et les hivers moins rigoureux, cette solution peut ne pas fonctionner. Une autre solution serait alors d'assécher les bassins en été en s'inspirant des mares semi-naturelles mais les capacités de résistance à la dessiccation de la sangsue devraient alors être testées.

Outre ce problème de sangsue, il serait intéressant d'améliorer la conception, l'entretien et la maintenance des bassins d'orage en prenant en compte les amphibiens. Dans un premier temps, les nouveaux bassins d'orage devraient être peu profonds et présenter des pentes de berge douces (la pente d'accès est idéale pour cela). Afin de favoriser une majorité des espèces d'amphibiens et autres taxons, il est préférable de laisser une partie de ces bassins se végétaliser ($\sim 1/3$). De plus, il est primordial que le calendrier d'entretien de ces bassins, que ce soit dans l'eau, mais également autour de celui-ci (*e.g.* fauchage de la végétation) prenne en compte la présence des amphibiens et de la faune en générale. Enfin, la construction de mares semi-naturelles à proximité des bassins d'orage routiers devrait être systématique, cela permettrait de diluer l'effet négatif que pourraient avoir certains bassins sur la reproduction des amphibiens. De plus, il est important que ces mares soient en eau tout au long de la période de reproduction et de développement larvaire, mais il faudrait également que celles-ci s'assèchent sur une période (*e.g.* hiver) afin de limiter la présence de sangsues (Sawyer 1973).

Pour finir, les résultats obtenus durant notre étude concernant l'habitat terrestre du Crapaud vert nous permettent de proposer des recommandations pour la protection de l'ensemble de l'habitat de cette espèce. En effet, le Crapaud vert sélectionne majoritairement les bandes herbacées pour se déplacer, mais également pour se reposer en utilisant des terriers de micromammifères. Par conséquent, il est primordial que ces bandes herbacées soient maintenues et entretenues en fonction de la présence du Crapaud vert. Le domaine vital moyen du Crapaud vert sur notre zone d'étude s'étend sur $37,0 \pm 25,6$ ha avec un éloignement moyen du site de reproduction de $546,8 \pm 63,6$ m, de ce fait, les bandes herbacées sur un rayon de 550 m autour des bassins d'orage et autres sites de reproductions doivent être strictement protégées, notamment à proximité des champs où la superficie de ces bandes herbacées diminue chaque année au profit de terrains agricoles (observation personnelle). De plus, la création de nouvelles bandes herbacées lors de la construction de nouvelles infrastructures de transport est également

une solution à envisager en faveur du Crapaud vert. En effet, la création de ces bandes herbacées entrainera une prolifération de micromammifères et par conséquent de galeries pouvant être utilisées par le Crapaud vert. Pour finir, nous avons retrouvé des émetteurs dans des champs de maïs fraîchement récoltés et labourés, il est impossible de confirmer que les individus soient morts avant ou après le labour. Étant donné que ces labours sont réalisés sur une profondeur moyenne de 20 cm et que le travail du sol comme le sous-solage peut atteindre 60 cm (Lamérand communication personnelle), si les gîtes des crapauds se trouvent dans les champs, la probabilité de mortalité est importante. Par conséquent, dans les champs à proximité des sites de reproduction du Crapaud vert, il faudrait mettre en place des mesures concernant le travail du sol comme ça l'est déjà pour le Hamster d'Europe avec une préconisation de labour maximale de 30 cm (OFB communication personnelle).

III) Perspectives

Étude d'autres Infrastructures Linéaires de Transport

Cette thèse traite en partie des Infrastructures Linéaires de Transport (ILT) et notamment des routes. Néanmoins, ces ILT comportent également les voies ferrées, les lignes électriques et également les canaux fluviaux. Ces derniers sont d'ailleurs peu étudiés pour les amphibiens. Même si quelques études parlent de mortalité de mammifères dans certains canaux (Peris & Morales 2004), aucune ne traite d'amphibiens piégés dans ces canaux et d'un potentiel effet négatif sur leurs populations. Seul un article sur le site des voies navigables de France (VNF) traite du suivi des amphibiens présents dans le canal de la Marne au Rhin Ouest. En effet, depuis 2019 les VNF de l'Est de la France ont mis en place des rampes permettant aux amphibiens de ressortir du canal. Un suivi sur 15 ans est prévu avec des comptages réalisés de mars à juillet. Lors de ma thèse, nous avons étudié l'efficacité de différents types d'échappatoires à amphibiens qui pourraient également être utilisés le long des canaux fluviaux pour éviter que les amphibiens s'y retrouvent piégés. Généraliser ces pratiques en effectuant des suivis réguliers (avant et après mise en place du dispositif) permettrait d'obtenir plus de connaissances sur ces ILT particulières qui pourraient être tout autant mortelles que les routes.

Suivi par Capture-Marquage-Recapture du Crapaud vert dans le Bas-Rhin

Une autre étude de terrain, réalisé pendant ma thèse, mais dont les données n'ont pas encore été exploitées s'est déroulé d'avril à juillet de 2020 à 2022 et était composé majoritairement d'un suivi par la méthode de capture marquage recapture (CMR) du Crapaud vert. Ce suivi réalisé sur 22 bassins d'orage routiers et 19 mares semi-naturelles nous a permis de capturer et d'identifier au 29/06/2022 un total de 1687 individus différents. L'analyse de ces données se fera après la thèse lors de mon contrat d'ATER à l'Université de Strasbourg. Avec ces données, nous allons pouvoir estimer des taux de migration, de survie ainsi que des tailles de populations, le tout en lien avec l'occurrence et l'abondance des sangsues sur nos sites, mais également en intégrant le gradient d'urbanisation présent sur notre zone d'étude. De plus, lors de ma thèse j'ai mis en place un protocole de photo-identification. Ce protocole, ainsi que les photos de l'ensemble de mes individus pourront être mises à disposition des organismes qui pourront reprendre cette étude afin de réaliser un suivi sur le long terme.

Recherche de lutte contre *Helobdella stagnalis*

Notre étude sur les sangsues nous a amenés à rechercher des méthodes afin de lutter contre l'espèce s'attaquant aux têtards. En effet, une diminution du niveau d'eau pourrait avec les épisodes de gels hivernaux tuer les sangsues (Sawyer 1973), il serait intéressant de mettre cela en place dans plusieurs bassins présentant une concentration importante en sangsues afin de s'assurer de l'efficacité de cette mesure. Néanmoins, d'autres méthodes existent, rechercher la plus efficace et la plus écologique est donc une priorité.

Utilisation des terriers par le Crapaud vert

Enfin, la mise en évidence de l'utilisation de terriers de micromammifères par le Crapaud vert comme gîte quotidien soulève plusieurs questions. Une des problématiques principales serait de savoir à quelle profondeur le Crapaud vert est capable d'aller au sein même d'une galerie. Cette information est primordiale dans les champs pouvant être labourés. En effet, la possibilité d'estimer une profondeur moyenne permettrait de donner des recommandations sur les profondeurs de labours sachant que des études récentes indiquent que l'absence de travail du sol permet à terme d'obtenir un meilleur rendement (Fiorini *et al.* 2020 ; Kletty 2020).

Collaborations et dynamisme autour des études amphibiens

Avant 2017, seule l'association BUFO étudiait les amphibiens dans le Bas-Rhin. Aujourd'hui, une mobilisation importante autour de différentes espèces d'amphibiens a vu le jour dans la région Grand-Est. En effet, en plus des études que j'ai pu réaliser durant ma thèse, le CEREMA et BUFO étudient également l'habitat terrestre du Crapaud vert dans différents milieux à proximité de terrils miniers, en Lorraine et dans le Haut-Rhin. De plus, j'étudie avec Jonathan Jumeau (CeA) l'efficacité de pièges photographiques, d'échappatoires à amphibiens et également de crapaudrômes temporaires le long des routes. Enfin, l'arrivée récente de Claude Miaud (CEFE/CNRS), Vincent Vignon (OGE), ainsi que leur étudiante en thèse Julia Dayon, amène de nouvelles perspectives d'études sur les amphibiens et notamment sur une autre espèce en danger d'extinction au niveau régional : Le Pélobate brun (Grand-Est ; IUCN 2015). Cet engouement récent sur les amphibiens du Grand-Est nous a permis de réaliser plusieurs réunions autour de ces thématiques, afin de mettre en commun nos résultats et de programmer d'éventuelles collaborations futures.

Pour finir, la DREAL attend avec impatience les résultats de l'ensemble de nos études et notamment celle concernant l'habitat terrestre du Crapaud vert dans le but de mettre à jour un nouveau Plan National d'Action pour l'espèce, prévu pour 2024.

Cet enthousiasme autour de ces études et de ces résultats qui pourront directement être appliqués à la conservation d'une espèce est très encourageant pour un jeune chercheur et permet de prendre conscience de l'utilité du travail accompli.

Bibliographie

A

Ackley JW, Meylan PA. 2010. Watersnake Eden: use of stormwater retention ponds by mangrove salt marsh snakes (*Nerodia clarkii compressicauda*) in urban Florida. *Herpetological Conservation and Biology* 5:17–22.

Adriaensen F, Chardon JP, De Blust G, Swinnen E, Villalba S, Gulinck H, Matthysen E. 2003. The application of “least-cost” modelling as a functional landscape model. *Landscape and Urban Planning* 64:233–247. Elsevier.

Alsace-Nature. 2010. Propositions des associations de protection de la nature pour la sauvegarde du Rhin et des forêts rhénanes.

AmphibiaWeb. <https://amphibiaweb.org/> [Accessed on 10.04.2022].

Arntzen JW, Abrahams C, Meilink WRM, Iosif R, Zuiderwijk A. 2017. Amphibian decline, pond loss and reduced population connectivity under agricultural intensification over a 38 year period. *Biodiversity and Conservation* 26:1411–1430.

Arntzen JW, Oldham RS, Latham DM. 1995. Cost effective drift fences for toads and newts. *Amphibia-Reptilia* 16:137–145. Brill.

B

Balbi M. 2017. Validation de la fonctionnalité des continuités écologiques en milieu urbain : approches plurispécifiques et multi-sites:180.

Battin J. 2004. When Good Animals Love Bad Habitats: Ecological Traps and the Conservation of Animal Populations. *Conservation Biology* 18:1482–1491.

Baumberger KL, Eitzel M V., Kirby ME, Horn MH. 2019. Movement and habitat selection of the western spadefoot (*Spea hammondi*) in southern California. *PLOS ONE* 14: e0222532.

Baumgart G. 2003. Die Wechselkröte (*Bufo viridis*) in Frankreich: Allgemeine Angaben unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung im Elsass. *Mertensiella* 14:109–122.

- Baxter-Gilbert JH, Riley JL, Lesbarrères D, Litzgus JD. 2015. Mitigating Reptile Road Mortality: Fence Failures Compromise Ecopassage Effectiveness. *PLOS ONE* 10: e0120537.
- Bazin G, Bourdeau-Lepage L. 2011. L'agriculture dans les pays d'Europe centrale et orientale. Continuité et adaptation. *OpenEdition journals*: 10–24. Société Française d'Économie rurale.
- Beebee TJC. 2013. Effects of Road Mortality and Mitigation Measures on Amphibian Populations. *Conservation Biology* 27:657–668.
- Bellamy PE, Shore RF, Ardeshir D, Treweek JR, Sparks TH. 2000. Road verges as habitat for small mammals in Britain. *Mammal Review* 30:131–139.
- Bergeron CM, Bodinof CM, Unrine JM, Hopkins WA. 2010. Bioaccumulation and maternal transfer of mercury and selenium in amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:989–997.
- Berna A, Fizesan A, Gosselin F, Thiriet J. 2021. Plan Régional d'Actions Crapaud vert ; Action n°3 : Suivre les indicateurs d'évolution des populations des habitats et de leur état de conservation, Rapport 2020.
- Berna A, Gosselin F, Thiriet J, Vacher J-P. 2018. Evolution de la population du Crapaud vert en Alsace.
- Berven KA, Boltz RS. 2001. Interactive effects of leech (*Desserobdella picta*) infection on wood frog (*Rana sylvatica*) tadpole fitness traits. *Copeia* 2001:907–915.
- Beshkov V, Angelova B. 1981. An Unusual Reproductive Migration of the Common Frog *Rana temporaria* L. *Ekologiya (Sofia)* 8:34–42.
- Bishop CA, Struger J, Shirose LJ, Dunn L, Campbell GD. 2000. Contamination and Wildlife Communities in Stormwater Detention Ponds in Guelph and the Greater Toronto Area, Ontario, 1997 and 1998 Part II — Contamination and Biological Effects of Contamination. *Water Quality Research Journal* 35:437–474.
- Bolund P, Hunhammar S. 1999. Ecosystem services in urban areas. *Ecological economics* 29:293–301.
- Brand AB, Snodgrass JW. 2010. Value of Artificial Habitats for Amphibian Reproduction in Altered Landscapes. *Conservation Biology* 24:295–301.

Brand AB, Snodgrass JW, Gallagher MT, Casey RE, Van Meter R. 2010. Lethal and sublethal effects of embryonic and larval exposure of *Hyla versicolor* to stormwater pond sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58:325–331.

Brehme CS, Tracey JA, Ewing BAI, Hobbs MT, Launer AE, Matsuda TA, Cole Adelsheim EM, Fisher RN. 2021. Responses of migratory amphibians to barrier fencing inform the spacing of road underpasses: a case study with California tiger salamanders (*Ambystoma californiense*) in Stanford, CA, USA. *Global Ecology and Conservation* 31:e01857.

Breno M, Bots J, De Schaepdrijver L, Van Dongen S. 2013. Fluctuating Asymmetry as Risk Marker for Stress and Structural Defects in a Toxicologic Experiment. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 98:310–317.

Brommer JE, Merilä J, Kokko H. 2002. Reproductive timing and individual fitness. *Ecology Letters* 5:802–810.

Browne R., Pomeroy M, Hamer A. 2003. High density effects on the growth, development and survival of *Litoria aurea* tadpoles. *Aquaculture* 215:109–121.

Bruinderink GWTAG, Hazebroek E. 1996. Ungulate Traffic Collisions in Europe. *Conservation Biology* 10:1059–1067.

Buckley LB, Jetz W. 2007. Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:1167–1173.

Bunn AG, Urban DL, Keitt TH. 2000. Landscape connectivity: A conservation application of graph theory. *Journal of Environmental Management* 59:265–278.

Burgstaller S, Gollmann G, Landler L. 2020. The Green Toad Example: A Comparison of Pattern Recognition Software.

Burt WH. 1943. Territoriality and Home Range Concepts as Applied to Mammals. *Journal of Mammalogy* 24:346–352.

C

Calabrese JM, Fleming CH, Gurarie E. 2016. ctmm: an r package for analyzing animal relocation data as a continuous-time stochastic process. *Methods in Ecology and Evolution* 7:1124–1132.

- Carroll RL. 2009. The rise of amphibians: 365 million years of evolution. Johns Hopkins University Press Baltimore, MD.
- Carsignol J. 2005. Aménagements et mesures pour la petite faune : guide technique. [SETRA].
- Carsignol J, Tekielak G. 2018. Note d'information - Clôture routière et faune.
- Carvajal-Castro JD, López-Aguirre Y, Ospina-L AM, Santos JC, Rojas B, Vargas-Salinas F. 2020. Much more than a clasp: evolutionary patterns of amplexus diversity in anurans. *Biological Journal of the Linnean Society* 129:652–663.
- Carvalho F, Santos SM, Mira A, Lourenço R. 2017. Methods to Monitor and Mitigate Wildlife Mortality in Railways. Pages 23–42 *Railway Ecology*.
- Cayuela H et al. 2020a. Determinants and Consequences of Dispersal in Vertebrates with Complex Life Cycles: A Review of Pond-Breeding Amphibians. *The Quarterly Review of Biology* 95:1–36.
- Cayuela H, Arsovski D, Bonnaire E, Duguet R, Joly P, Besnard A. 2016. The impact of severe drought on survival, fecundity, and population persistence in an endangered amphibian. *Ecosphere* 7: e01246.
- Cayuela H, Besnard A, Cote J, Laporte M, Bonnaire E, Pichenot J, Schtickzelle N, Bellec A, Joly P, Léna JP. 2020b. Anthropogenic disturbance drives dispersal syndromes, demography, and gene flow in amphibian populations. *Ecological Monographs* 90: e01406.
- Cayuela H, Bonnaire É, Astruc G, Besnard A. 2019. Transport infrastructure severely impacts amphibian dispersal regardless of life stage. *Scientific Reports* 9:1–10.
- CGDD. 2012. Urbanisation et consommation de l'espace, une question de mesure. Page La revue du CGDD.
- Chelgren ND, Rosenberg DK, Heppell SS, Gitelman AI. 2006. Carryover Aquatic Effects On Survival Of Metamorphic Frogs During Pond Emigration. *Ecological Applications* 16:250–261.
- Chen T-H, Gross JA, Karasov WH. 2007. Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:1470–1475.
- Chery JP, Deshayes M. 2011. La fragmentation des espaces naturels.

- Chesson J. 1983. The Estimation and Analysis of Preference and Its Relationship to Foraging Models. *Ecology* 64:1297–1304.
- Clarke GM. 1998. Developmental Stability and Fitness: The Evidence Is Not Quite So Clear. <https://doi.org/10.1086/286207> 152:762–766.
- Clarke RD. 1972. The Effect of Toe Clipping on Survival in Fowler’s Toad (*Bufo woodhousei fowleri*). *Copeia* 1972: 182.
- Clevenger AP, Chruszcz B, Gunson KE. 2001. Highway Mitigation Fencing Reduces Wildlife-Vehicle Collisions.
- Clevenot L. 2020. Bassins autoroutiers et amphibiens en France: des fonctionnalités écologiques aux pratiques de gestion. Approche géographique d’un complexe socio-écologique. Université Paris 1-Panthéon Sorbonne; Ladyss UMR CNRS 7533.
- Clevenot L, Carré C, Pech P. 2018. A Review of the Factors That Determine Whether Stormwater Ponds Are Ecological Traps And/or High-Quality Breeding Sites for Amphibians. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6:40.
- Clobert J, Le Galliard JF, Cote J, Meylan S, Massot M. 2009. Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndromes and the dynamics of spatially structured populations. *Ecology Letters* 12:197–209.
- Collins SJ, Russell RW. 2009. Toxicity of road salt to Nova Scotia amphibians. *Environmental Pollution* 157:320–324.
- Conan A, Fleitz J, Garnier L, Brishoual M Le, Handrich Y, Jumeau J. 2022. Effectiveness of wire netting fences to prevent animal access to road infrastructures: an experimental study on small mammals and amphibians. *Nature Conservation* 47: 271-281 47:271–281.
- Conan A, Jumeau J, Dehaut N, Enstipp M, Georges J-Y, Handrich Y. 2021. Can road stormwater ponds be successfully exploited by the European green frog (*Pelophylax sp.*)? *Urban Ecosystems* 2021:1–13.
- Corlatti L, Hackländer K, Frey-Roos F. 2009. Ability of Wildlife Overpasses to Provide Connectivity and Prevent Genetic Isolation. *Conservation Biology* 23:548–556.
- Crane M, Silva I, Marshall BM, Strine CT. 2021. Lots of movement, little progress: a review of reptile home range literature. *PeerJ* 9: e11742.

Cushman SA. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation* 128:231–240.

D

da Silva FR, Almeida-Neto M, do Prado VHM, Haddad CFB, de Cerqueira Rossa-Feres D. 2012. Humidity levels drive reproductive modes and phylogenetic diversity of amphibians in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* 39:1720–1732.

Dalibard M, Buisson L, Calvez O, Nguyen-Hong M, Trochet A, Laffaille P. 2021. Can ventral pattern be used for individual recognition of the vulnerable pyrenean brook newt (*Calotriton asper*)? *Herpetological Journal* 31:99–110.

Dall'antonia P, Sinsch U. 2001. In search of water: Orientation behaviour of dehydrated natterjack toads, *Bufo calamita*. *Animal Behaviour* 61:617–629.

Daneri MF, Papini MR, Muzio RN. 2007. Common toads (*Bufo arenarum*) learn to anticipate and avoid hypertonic saline solutions. *Journal of Comparative Psychology* 121:419.

Davidson NC. 2014. How much wetland has the world lost? Long-term and recent trends in global wetland area. *Marine and Freshwater Research* 65:934.

Davis AP, Shokouhian M, Ni S. 2001. Loading estimates of lead, copper, cadmium, and zinc in urban runoff from specific sources. *Chemosphere* 44:997–1009.

Dejean T, Valentini A, Miquel C, Taberlet P, Bellemain E, Miaud C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* 49:953–959.

Dessauer HC, Nevo E, Chuang KC. 1975. High genetic variability in an ecologically variable vertebrate, *Bufo viridis*. *Biochemical Genetics* 13:651–661.

Diniz MF, Cushman SA, Machado RB, De Marco Júnior P. 2019. Landscape connectivity modeling from the perspective of animal dispersal. *Landscape Ecology* 2019 35:1 35:41–58.

Dobkin DS, Gettinger RD. 1985. Thermal aspects of anuran foam nests. *Journal of Herpetology*:271–275.

Dodd CK. (Ed). 2010. *Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques*. Oxford University Press.

Dodd CK, Barichivich WJ, Smith LL. 2004. Effectiveness of a barrier wall and culverts in reducing wildlife mortality on a heavily traveled highway in Florida. *Biological Conservation* 118:619–631.

Dorchin A, Shanas U. 2010. Assessment of pollution in road runoff using a *Bufo viridis* biological assay. *Environmental Pollution* 158:3626–3633.

Drechsler A, Helling T, Steinfartz S. 2015. Genetic fingerprinting proves cross-correlated automatic photo-identification of individuals as highly efficient in large capture-mark-recapture studies. *Ecology and Evolution* 5:141–151.

Duellman WE, Trueb L. 1994. *Biology of amphibians*. JHU press.

Dwernychuk LW, Boag DA. 1972. Ducks nesting in association with gulls—an ecological trap? *Canadian Journal of Zoology* 50:559–563.

E

Egea-Serrano A, Relyea RA, Tejedo M, Torralva M. 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution* 2:1382–1397.

Eggert C. 2002. Use of fluorescent pigments and implantable transmitters to track a fossorial toad (*Pelobates fuscus*). *Herpetological journal* 12:69–74.

Eggert C, Peyret P-H, Guyétant R. 1999. Two complementary methods for studying amphibian terrestrial movements. *Current Studies in Herpetology*:95–97.

EPA. 2009. *Stormwater wet pond and wetland management guidebook*. Center For Watershed Protection. United States Environmental Protection Agency:80.

Ernoult A, Vialatte A, Butet A, Michel N, Rantier Y, Jambon O, Burel F. 2013. Grassy strips in their landscape context, their role as new habitat for biodiversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 166:15–27.

F

Fahrig L. 2003. Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:487–515.

- Fahrig L. 2017. Ecological responses to habitat fragmentation per se. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 48:1–23.
- Fahrig L, Pedlar JH, Pope SE, Taylor PD, Wegner JF. 1995. Effect of road traffic on amphibian density. *Biological Conservation* 73:177–182.
- Fahrig L, Rytwinski T. 2009. Effects of roads on animal abundance: an empirical review and synthesis. *Ecology and society* 14.
- Feder ME, Burggren WW. 1985. Skin breathing in vertebrates. *Scientific American* 253:126–143.
- Fiderer C, Göttert T, Zeller U. 2019. Spatial interrelations between raccoons (*Procyon lotor*), red foxes (*Vulpes vulpes*), and ground-nesting birds in a Special Protection Area of Germany. *European Journal of Wildlife Research* 65:1–19.
- Fink AH, Brücher T, Krüger A, Leckebusch GC, Pinto JG, Ulbrich U. 2004. The 2003 European summer heatwaves and drought-synoptic diagnosis and impacts. *Weather* 59:209–216.
- Fiorini A, Boselli R, Maris SC, Santelli S, Ardenti F, Capra F, Tabaglio V. 2020. May conservation tillage enhance soil C and N accumulation without decreasing yield in intensive irrigated croplands? Results from an eight-year maize monoculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 296:106926.
- Fleming CH, Fagan WF, Mueller T, Olson KA, Leimgruber P, Calabrese JM, Cooch EG. 2015. Rigorous home range estimation with movement data: a new autocorrelated kernel density estimator. *Ecology* 96:1182–1188.
- Foltête JC, Vuidel G, Savary P, Clauzel C, Sahraoui Y, Girardet X, Bourgeois M. 2021. Graphab: An application for modeling and managing ecological habitat networks. *Software Impacts* 8:100065.
- Forman RTT, Alexander LE. 1998. Roads and their major ecological effects. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:207–238.
- Frankham R, Ballou SEJD, Briscoe DA, Ballou JD. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press.
- Freestone AL, Osman RW, Ruiz GM, Torchin ME. 2011. Stronger predation in the tropics shapes species richness patterns in marine communities. *Ecology* 92:983–993.

G

Gallagher MT, Snodgrass JW, Brand AB, Casey RE, Lev SM, Van Meter RJ. 2014. The role of pollutant accumulation in determining the use of stormwater ponds by amphibians. *Wetlands Ecology and Management* 22:551–564.

Galloy V, Denoël M. 2010. Detrimental effect of temperature increase on the fitness of an amphibian (*Lissotriton helveticus*). *Acta Oecologica* 36:179–183.

Garey M V., Costa TRN, de Lima AMX, Toledo LF, Hartmann MT. 2012. Advertisement call of *Scinax littoralis* and *S. angrensis* (Amphibia: Anura: Hylidae), with notes on the reproductive activity of *S. littoralis*. *Acta Herpetologica* 7:297–308.

Gaston KJ, Davies TW, Nedelec SL, Holt LA. 2017. Impacts of artificial light at night on biological timings. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 48:49–68.

Gaston KJ, Holt LA. 2018. Nature, extent and ecological implications of night-time light from road vehicles. *Journal of Applied Ecology* 55:2296–2307.

Gerhardt HC. 1995. Phonotaxis in Female Frogs and Toads: Execution and Design of Experiments. *Methods in Comparative Psychoacoustics*: 209-220.

Gibbs JP. 1998. Amphibian Movements in Response to Forest Edges, Roads, and Streambeds in Southern New England. *The Journal of Wildlife Management* 62:584.

Gibbs JP, Shriver WG. 2005. Can road mortality limit populations of pool-breeding amphibians? *Wetlands Ecology and Management* 13:281–289.

Gillespie GR. 2002. Impacts of sediment loads, tadpole density, and food type on the growth and development of tadpoles of the spotted tree frog *Litoria spenceri*: an in-stream experiment. *Biological conservation* 106:141–150.

Glista DJ, DeVault TL, DeWoody JA. 2009, May 30. A review of mitigation measures for reducing wildlife mortality on roadways. *Landscape and urban planning*, 91: 1-7

Gottlieb G, Jackson DC. 1976. Importance of pulmonary ventilation in respiratory control in the bullfrog. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 230: 608-613.

Govindarajulu PP, Anholt BR. 2016. Interaction between biotic and abiotic factors determines tadpole survival rate under natural conditions. *Ecoscience*, 13 : 413-421.

Green AJ. 2001. Mass/length residuals: Measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82:1473–1483.

Grillakis MG. 2019. Increase in severe and extreme soil moisture droughts for Europe under climate change. *Science of The Total Environment* 660:1245–1255.

Groff LA, Calhoun AJK, Loftin CS. 2017. Amphibian terrestrial habitat selection and movement patterns vary with annual life-history period. *Canadian Journal of Zoology* 95:433–442.

Guarino FM, Angelini F, Cammarota M. 1995. A skeletochronological analysis of three syntopic amphibian species from southern Italy. *Amphibia-Reptilia* 16:297–302.

Guo R, Zhang W, Ai S, Ren L, Zhang Y. 2017. Fluctuating asymmetry rather than oxidative stress in *Bufo raddei* can be an accurate indicator of environmental pollution induced by heavy metals. *Environmental Monitoring and Assessment* 189.

H

Hamer AJ, Parris KM. 2011. Local and landscape determinants of amphibian communities in urban ponds. *Ecological Applications* 21:378–390.

Hassall C, Anderson S. 2015. Stormwater ponds can contain comparable biodiversity to unmanaged wetlands in urban areas. *Hydrobiologia* 745:137–149.

Hayes TB, Falso P, Gallipeau S, Stice M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of experimental biology* 213:921–33.

Hegna RH, Saporito RA, Donnelly MA. 2013. Not all colors are equal: Predation and color polytypism in the aposematic poison frog *Oophaga pumilio*. *Evolutionary Ecology* 27:831–845.

Herbert ER et al. 2015. A global perspective on wetland salinization: ecological consequences of a growing threat to freshwater wetlands. *Ecosphere* 6:1–43.

Herrera LP, Sabatino MC, Jaimes FR, Saura S. 2017. Landscape connectivity and the role of small habitat patches as stepping stones: an assessment of the grassland biome in South America. *Biodiversity and Conservation* 26:3465–3479.

Hill MJ, Biggs J, Thornhill I, Briers RA, Gledhill DG, White JC, Wood PJ, Hassall C. 2017. Urban ponds as an aquatic biodiversity resource in modified landscapes. *Global Change Biology* 23:986–999.

Hoffman J, Katz U. 1989. The ecological significance of burrowing behaviour in the toad (*Bufo viridis*). *Oecologia* 81:510–513.

Holzer KA. 2014. Amphibian use of constructed and remnant wetlands in an urban landscape. *Urban Ecosystems* 17:955–968.

Hopkins WA, DuRant SE, Staub BP, Rowe CL, Jackson BP. 2006. Reproduction, Embryonic Development, and Maternal Transfer of Contaminants in the Amphibian *Gastrophryne carolinensis*. *Environmental Health Perspectives* 114:661–666.

Husté A, Clobert J, Miaud C. 2006. The movements and breeding site fidelity of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in an urban park near Paris (France) with management recommendations. *Amphibia-Reptilia* 27:561–568.

I

Ibisch PL, Hoffmann MT, Kreft S, Pe'Er G, Kati V, Biber-Freudenberger L, DellaSala DA, Vale MM, Hobson PR, Selva N. 2016. A global map of roadless areas and their conservation status. *Science* 354:1423–1427.

Indermaur L, Schmidt BR. 2011. Quantitative recommendations for amphibian terrestrial habitat conservation derived from habitat selection behavior. *Ecological Applications* 21:2548–2554.

Indermaur L, Winzeler T, Schmidt BR, Tockner K, Schaub M. 2009. Differential resource selection within shared habitat types across spatial scales in sympatric toads. *Ecology* 90:3430–3444.

INSEE, 2020. Estimation de la population au 1^{er} janvier 2022. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/1893198> [Accessed on 10.04.2022].

IUCN 2015. La Liste rouge des espèces menacées en France. <https://uicn.fr/wp-co> [Accessed on 10.04.2022]

IUCN 2021. IUCN Red List of Threatened Species, Summary Statistics <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics> [Accessed on 13.12.2021].

J

James SM, Little EE. 2003. The effects of chronic cadmium exposure on American toad (*Bufo americanus*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:377–380.

Janin A, Léna J-P, Ray N, Delacourt C, Allemand P, Joly P. 2009. Assessing landscape connectivity with calibrated cost-distance modelling: predicting common toad distribution in a context of spreading agriculture. *Journal of Applied Ecology* 46:833–841.

Janin A, Léna JP, Joly P. 2011. Beyond occurrence: Body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. *Biological Conservation* 144:1008–1016.

Jetz W, Pyron RA. 2018. The interplay of past diversification and evolutionary isolation with present imperilment across the amphibian tree of life. *Nature ecology & evolution* 2:850–858.

Joly P. 2019. Behavior in a Changing Landscape: Using Movement Ecology to Inform the Conservation of Pond-Breeding Amphibians. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7:155.

Jumeau J. 2017. Les possibilités de dispersion et éléments d’habitat-refuge dans un paysage d’agriculture intensive fragmenté par un réseau routier dense : le cas de la petite faune dans la plaine du Bas-Rhin.

Jumeau J, Boucharel P, Handrich Y, Burel F. 2017. Road-related landscape elements as a habitat: A main asset for small mammals in an intensive farming landscape. *Basic and Applied Ecology* 25:15–27.

Jumeau J, Lopez J, Morand A, Petrod L, Burel F, Handrich Y. 2020. Factors driving the distribution of an amphibian community in stormwater ponds: a study case in the agricultural plain of Bas-Rhin, France. *European Journal of Wildlife Research* 66:33.

K

Karakousis Y, Kyriakopoulou-Sklavounou P. 1995. Genetic and morphological differentiation among populations of the green toad *Bufo viridis* from Northern Greece. *Biochemical Systematics and Ecology* 23:39–45.

Katz U. 1973. Studies on the adaptation of the toad *Bufo viridis* to high salinities: oxygen consumption, plasma concentration and water content of the tissues. *Journal of Experimental Biology* 58: 785-796.

Katz U. 1975. NaCl adaptation in *Rana ridibunda* and a comparison with the euryhaline toad *Bufo viridis*. *Journal of Experimental Biology* 63:763–773.

Katz U, Gabbay S. 1986. Water retention and plasma and urine composition in toads (*Bufo viridis* Laur.) under burrowing conditions. *Journal of Comparative Physiology B* 156:735–740.

Kletty F. 2020. Alimentation du grand hamster (*Cricetus cricetus*), effet sur sa biologie et liens avec les pratiques agricoles et la biodiversité. Université de Strasbourg.

Kloas W, Lutz I. 2006. Amphibians as model to study endocrine disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130:16–27.

Knight K. 2019. Poison frogs keep a mental map. *Journal of Experimental Biology* 222.

Köhler J, Jansen M, Rodríguez A, Kok PJR, Toledo LF, Emmrich M, Glaw F, Haddad CFB, Rödel MO, Vences M. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251:1–124–1–124.

L

Laist DW, Knowlton AR, Mead JG, Collet AS, Podesta M. 2001. Collisions between ships and whales. *Marine Mammal Science* 17:35–75.

Lerner MA, Potter DWB. 1974. Life-history and Production of the Leech *Helobdella stagnalis* (L.) (Hirudinea) in a Shallow Eutrophic Reservoir in South Wales. *The Journal of Animal Ecology* 43:199.

- Le Chevalier H, Calvez O, Martinez-Silvestre A, Picard D, Guérin S, Isselin-Nondedeu F, Ribéron A, Trochet A. 2017. Marking techniques in the Marbled Newt (*Triturus marmoratus*): PIT-Tag and tracking device implant protocols. *Acta Herpetologica* 12:79–88.
- Le Viol I, Chiron F, Julliard R, Kerbiriou C. 2012. More amphibians than expected in highway stormwater ponds. *Ecological Engineering* 47:146–154.
- Le Viol I, Mocq J, Julliard R, Kerbiriou C. 2009. The contribution of motorway stormwater retention ponds to the biodiversity of aquatic macroinvertebrates. *Biological Conservation* 142:3163–3171.
- Leduc J, Echaubard P, Trudeau V, Lesbarrères D. 2016. Copper and nickel effects on survival and growth of northern leopard frog (*Lithobates pipiens*) tadpoles in field-collected smelting effluent water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35:687–694.
- Lefcort H, Meguire RA, Wilson LH, Ettinger WF. 1998. Heavy Metals Alter the Survival, Growth, Metamorphosis, and Antipredatory Behavior of Columbia Spotted Frog (*Rana luteiventris*) Tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1998 35:3 35:447–456.
- Leimar O. 1996. Life-history analysis of the Trivers and Willard sex-ratio problem. *Behavioral Ecology* 7:316–325.
- Lens L, Van Dongen S, Kark S, Matthysen E. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biological Reviews* 77:27–38.
- Lesbarrères D, Fahrig L. 2012. Measures to reduce population fragmentation by roads: what has worked and how do we know? *Trends in Ecology & Evolution* 27:374–380.
- Lesbarrères D, Fowler MS, Pagano A, Lodé T. 2010. Recovery of anuran community diversity following habitat replacement. *Journal of Applied Ecology* 47:148–156.
- Leskovar C, Oromi N, Sanuy D, Sinsch U. 2006. Demographic life history traits of reproductive natterjack toads (*Bufo calamita*) vary between northern and southern latitudes. *Amphibia-Reptilia*, 27(3), 365-375.
- Leung B, Forbes MR. 1996. Fluctuating asymmetry in relation to stress and fitness: Effects of trait type as revealed by meta-analysis. *Ecoscience* 3:400–413.

Leung B, Forbes MR, Houle D. 2000. Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: Comparing efficacy of analyses involving multiple traits. *American Naturalist* 155:101–115.

Lighton JRB. 2008. *Measuring metabolic rates: a manual for scientists*. Oxford University Press.

Lowder SK, Scoet J, Raney T. 2016. The Number, Size, and Distribution of Farms, Smallholder Farms, and Family Farms Worldwide. *World Development* 87:16–29.

Ludwig D. 1945. The Effects of Atmospheric Humidity on Animal Life. *Physiological Zoology* 18:103–135.

M

MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA. 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39:20–31.

Macdonald DW. 1978. Radio-tracking: some applications and limitations. *Animal Marking*:192–204.

Mader HJ. 1984. Animal habitat isolation by roads and agricultural fields. *Biological Conservation* 29:81–96.

Maglangit EPT, Venturina REL, Caguimbal NALE, Warguez DA, Diesmos MLL, Diesmos AC. 2020. Leech parasitism on the Mindanao foot flagging frog *Staurois natator* (Günther, 1858) on Mindanao Island, Philippines. *Herpetology Notes* 13:313–316.

Manly BFJ, Miller P, Cook LM. 1972. Analysis of a Selective Predation Experiment. *The American Naturalist* 106:719–736.

Marshall EJP, West TM, Kleijn D. 2006. Impacts of an agri-environment field margin prescription on the flora and fauna of arable farmland in different landscapes. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 113:36–44.

Martins FMS, Oom M do M, Rebelo R, Rosa GM. 2013. Differential effects of dietary protein on early life-history and morphological traits in natterjack toad (*Epidalea calamita*) tadpoles reared in captivity. *Zoo Biology* 32:457–462.

- Matos C, Petrovan SO, Wheeler PM, Ward AI. 2018. Short-term movements and behaviour govern the use of road mitigation measures by a protected amphibian. *Animal Conservation*, 22: 285-296.
- Matthé M, Sannolo M, Winiarski K, Spitzen - van der Sluijs A, Goedbloed D, Steinfartz S, Stachow U. 2017. Comparison of photo-matching algorithms commonly used for photographic capture-recapture studies. *Ecology and Evolution* 7:5861–5872.
- Maxwell SL, Fuller RA, Brooks TM, Watson JEM. 2016. Biodiversity: The ravages of guns, nets and bulldozers. *Nature* 536: 143-145.
- McCarthy K, Lathrop RG. 2011. Stormwater basins of the New Jersey coastal plain: Subsidies or sinks for frogs and toads? *Urban Ecosystems* 14:395–413.
- Miaud C. 2014. Protocole d'hygiène pour le contrôle des maladies des amphibiens dans la nature à destination des opérateurs de terrain.
- Miaud C, Muratet J. 2018. Identifier les œufs et les larves des amphibiens de France. Editions Quae.
- Miaud C, Sanuy D, Avrillier J-N. 2000. Terrestrial movements of the natterjack toad *Bufo calamita* (Amphibia, Anura) in a semi-arid, agricultural landscape. *Amphibia-Reptilia* 21:357–369.
- Michel V. 2013. Le Crapaud vert (*Bufo viridis*) en Alsace : statut, menaces et plan régional d'actions. *Ciconia* 37:72–80.
- Michel V, Gosselin F, Fizesan A. 2017. Convention pluriannuelle d'objectifs : Suivi des populations de crapaud vert, *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) dans le Bas-Rhin.
- Mollov IA, Stojanova AM, Boyadzhiev PS. 2020. Feeding Ecology of the Green Toad (*Bufo viridis* complex) in Urban Environments. *Acta Zoologica Bulgarica Supplement*:189–198.
- Morand A, Carsignol J. 2019. Amphibiens et dispositifs de franchissement des infrastructures de transport terrestre. CEREMA, Connaissances 58.
- MTES 2022 Mémento de statistiques des transports : Observation et statistiques. <https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/donnees-densemble-0> [Accessed on 10.04.2022].

Muller BJ, Schwarzkopf L. 2017. Success of capture of toads improved by manipulating acoustic characteristics of lures. *Pest Management Science* 73:2372–2378.

N

Neff JM, Stout SA, Gunster DG. 2005. Ecological Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments: Identifying Sources and Ecological Hazard. *Integrated Environmental Assessment and Management* 1:22.

Ninh HT, Nguyen TT, Nguyen HQ, Hoang N Van, Siliyavong S, Nguyen T Van, Le DT, Le QK, Ziegler T. 2022. A new species of mossy frog (Anura: Rhacophoridae) from Northeastern Vietnam. *European Journal of Taxonomy* 794:72–90–72–90.

Nunes AL, Fill JM, Davies SJ, Louw M, Rebelo AD, Thorp CJ, Vimercati G, Measey J. 2019. A global meta-analysis of the ecological impacts of alien species on native amphibians. *Proceedings of the Royal Society B* 286.

O

Oficialdegui FJ, Sánchez MI, Monsalve-Carcaño C, Boyero L, Bosch J. 2019. The invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) increases infection of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Biological Invasions* 21:3221–3231.

Oromi N, Sanuy D, Sinsch U. 2012. Altitudinal variation of demographic life-history traits does not mimic latitudinal variation in natterjack toads (*Bufo calamita*). *Zoology* 115:30–37.

Osbourn MS, Hocking DJ, Conner CA, Peterman WE, Semlitsch RD. 2011. Use of fluorescent visible implant alphanumeric tags to individually mark juvenile ambystomatid salamanders. *Herpetological Review* 42:43–47.

Ottburg FGWA, van der Grift EA. 2019. Effectiveness of Road Mitigation for Common Toads (*Bufo bufo*) in the Netherlands. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7:23.

P

- Pagano A, Dubois A, Lesbarrères D, Lodé T. 2003. Frog alien species: a way for genetic invasion? *Comptes Rendus Biologies* 326:85–92.
- Palmer AR, Strobeck C. 1986. Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17:391–421.
- Palomares F, Godoy JA, López-Bao JV, Rodríguez A, Roques S, Casas-Marce M, Revilla E, Delibes M. 2012. Possible Extinction Vortex for a Population of Iberian Lynx on the Verge of Extirpation. *Conservation Biology* 26:689–697.
- Paton DG. 2012. Connectivity of elk migration in southwestern Alberta. *Graduate Studies*.
- Patrelle C, Ohst T, Picard D, Pagano A, Sourice S, Dallay M-G, Plötner J. 2011. A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs. *Molecular Ecology Resources* 11:200–205.
- Peadar JM, Tuberville TD, Buhlmann KA, Nafus MG, Todd BD. 2015. Delimiting road-effect zones for threatened species: implications for mitigation fencing. *Wildlife Research* 42:650–659.
- Percsy C, Percsy N. 2013. Identification des grenouilles « vertes » *Pelophylax* spp. (Anura, Ranidae) en Wallonie (Belgique): confrontation de critères morphologiques et acoustiques avec des analyses enzymatiques et d'ADNmt. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* 147:249–278.
- Peris S, Morales J. 2004. Use of passages across a canal by wild mammals and related mortality. *European Journal of Wildlife Research* 50:67–72.
- Petranka JW, Just JJ, Crawford EC. 1982. Hatching of Amphibian Embryos: The Physiological Trigger. *Science* 217:257–259.
- Phillott AD, Skerratt LF, McDonald KR, Lemckert FL, Hines HB, Clarke JM, Alford RA, Speare R. 2007. Toe-clipping as an acceptable method of identifying individual anurans in mark recapture studies. *Herpetological Review* 38:305–308.

Plötner J, Uzzell T, Beerli P, Spolsky C, Ohst T, Litvinchuk SN, Guex GD, Reyer HU, Hotz H. 2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaeartic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology* 21:668–681.

Pounds JA. 2001. Climate and amphibian declines. *Nature* 410:639–640.

R

Raffaelli J. 2013. *Les Urodèles du monde*. 2 ème édition. Penclen Editions, France.

Ramsar. 2018. Ramsar convention on wetlands: Scope and implementation. *The Wetland Book: I: Structure and Function, Management, and Methods*:451–458.

Rao RSP, Girish MKS. 2007. Road kills: Assessing insect casualties using flagship taxon. *Current Science*:830–837.

Ravansari R, Wilson SC, Tighe M. 2020. Portable X-ray fluorescence for environmental assessment of soils: Not just a point and shoot method. *Environment International* 134:105250.

Redon (de) L, Le Viol I, Jiguet F, Machon N, Scher O, Kerbiriou C. 2015. Road network in an agrarian landscape: Potential habitat, corridor or barrier for small mammals? *Acta Oecologica* 62:58–65.

Reeves MK, Jensen P, Dolph CL, Holyoak M, Trust KA. 2010. Multiple stressors and the cause of amphibian abnormalities. *Ecological Monographs* 80:423–440.

Reznick D, Butler IV MJ, Rodd H. 2001. Life-History Evolution in Guppies. VII. The Comparative Ecology of High- and Low-Predation Environments. *The American Naturalist* 157:126–140.

Riley JW, Calhoun DL, Barichivich WJ, Walls SC. 2017. Identifying Small Depressional Wetlands and Using a Topographic Position Index to Infer Hydroperiod Regimes for Pond-Breeding Amphibians. *Wetlands* 2017 37:2 37:325–338.

Robertson BA, Hutto RL. 2006. A framework for understanding ecological traps and an evaluation of existing evidence. *Ecology* 87:1075–1085.

Robertson BA, Rehage JS, Sih A. 2013, September 1. Ecological novelty and the emergence of evolutionary traps. *Trends in ecology & evolution* 28: 552-560.

Rowe G, Beebee TJC. 2003. Population on the verge of a mutational meltdown ? Fitness costs of genetic load for an amphibian in the wild. *Evolution* 57:177–181.

Rudnick D et al. 2012. The Role of Landscape Connectivity in Planning and Implementing Conservation and Restoration Priorities. *Issues in Ecology*.

Ruiz-Capillas P, Mata C, Malo JE. 2013. Road verges are refuges for small mammal populations in extensively managed Mediterranean landscapes. *Biological Conservation* 158:223–229.

Rytwinski T, Soanes K, Jaeger JAG, Fahrig L, Findlay CS, Houlahan J, Van Der Ree R, van der Grift EA. 2016. How effective is road mitigation at reducing road-kill? A meta-analysis. *PLoS one* 11.

S

Sanuy D, Avriillier J-N, Miaud C. 2000. Terrestrial movements of the natterjack toad *Bufo calamita* (Amphibia, Anura) in a semi-arid, agricultural landscape. *Amphibia-Reptilia* 21:357–369.

Sawyer RT. 1973. Bloodsucking Freshwater Leeches: Observations on Control. *Journal of Economic Entomology* 66:537–537

Schai-Braun SC, Weber D, Hackländer K. 2013. Spring and autumn habitat preferences of active European hares (*Lepus europaeus*) in an agricultural area with low hare density. *European Journal of Wildlife Research* 59:387–397.

Schalk G, Forbes MR, Weatherhead PJ. 2002. Developmental plasticity and growth rates of green frog (*Rana clamitans*) embryos and tadpoles in relation to a leech (*Macrobdella decora*) predator. *Copeia* 2002: 445–449.

Scher O, Thiéry A. 2005. Odonata, Amphibia and environmental characteristics in motorway stormwater retention ponds (Southern France). *Hydrobiologia* 551:237–251.

Schlaepfer MA, Runge MC, Sherman PW. 2002. Ecological and evolutionary traps. *Trends in ecology & evolution* 17: 474-480.

Schmidt S, Schmidt BR, Zumbach S. 2008. Amphibian Road Mortality and How to Prevent It: A Review. *Herpetological conservation* 3: 157-167.

- Schoch RR. 2014. Amphibian evolution: the life of early land vertebrates. John Wiley & Sons.
- Schulte-Hostedde AI, Zinner B, Millar JS, Hickling GJ. 2005. Restitution of mass-size residuals: Validating Body Condition Indices. *Ecology* 86:155–163.
- Schwartz T, Genouville A, Besnard A. 2020. Increased microclimatic variation in artificial nests does not create ecological traps for a secondary cavity breeder, the European roller. *Ecology and Evolution* 10:13649–13663.
- Secondi J, Mondy N, Gippet JMW, Touzot M, Gardette V, Guillard L, Lengagne T. 2021. Artificial light at night alters activity, body mass, and corticosterone level in a tropical anuran. *Behavioral Ecology* 32:932–940.
- Semlitsch RD. 2008. Differentiating Migration and Dispersal Processes for Pond-Breeding Amphibians. *Journal of Wildlife Management* 72:260–267.
- Severns PM. 2011. Habitat restoration facilitates an ecological trap for a locally rare, wetland-restricted butterfly. *Insect Conservation and Diversity* 4:184–191.
- Sheehy J, Taylor CM, Norris DR. 2011. The importance of stopover habitat for developing effective conservation strategies for migratory animals. *Journal of Ornithology* 152:161–168.
- SHF. 2021. Status des amphibiens de France métropolitaine.
- Sievers M. 2017. Sand quarry wetlands provide high-quality habitat for native amphibians. *Web Ecology* 17: 19-27.
- Sievers M, Hale R, Parris KM, Melvin SD, Lanctôt CM, Swearer SE. 2019. Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: A meta-analysis. *Science of Total Environment* 963: 133570.
- Sievers M, Hale R, Parris KM, Swearer SE. 2018a. Impacts of human-induced environmental change in wetlands on aquatic animals. *Biological Reviews* 93:529–554.
- Sievers M, Hale R, Swearer SE, Parris KM. 2018b. Contaminant mixtures interact to impair predator-avoidance behaviours and survival in a larval amphibian. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161:482–488.
- Sievers M, Parris KM, Swearer SE, Hale R. 2018c. Stormwater wetlands can function as ecological traps for urban frogs. *Ecological Applications* 28:1106–1115.

- Sillero N. 2008. Amphibian mortality levels on Spanish country roads: descriptive and spatial analysis. *Amphibia-Reptilia* 29:337–347.
- Sinsch U. 1987. Orientation behaviour of toads (*Bufo bufo*) displaced from the breeding site. *Journal of Comparative Physiology A* 161:715–727.
- Sinsch U. 1988. Temporal spacing of breeding activity in the natterjack toad, *Bufo calamita*. *Oecologia* 76:399–407.
- Sinsch U. 1992. Sex-biased site fidelity and orientation behaviour in reproductive natterjack toads (*Bufo calamita*). *Ethology Ecology and Evolution* 4:15–32.
- Sinsch U, Höfer S, Keltsch M. 1999. Syntope Habitatnutzung von *Bufo calamita*, *B. viridis* und *B. bufo* in einem rheinischen Auskiesungsgebiet. *Zeitschrift für Feldherpetologie* 6:43–64.
- Sinsch U, Leskovar C, Drobig A, König A, Grosse W-R. 2007. Life-history traits in green toad (*Bufo viridis*) populations: indicators of habitat quality. *Canadian Journal of Zoology* 85:665–673.
- Sinsch U, Oromi N, Miaud C, Denton J, Sanuy D. 2012. Connectivity of local amphibian populations: modelling the migratory capacity of radio-tracked natterjack toads. *Animal Conservation* 15:388–396.
- Sinsch U. 2014. Movement ecology of amphibians: From individual migratory behaviour to spatially structured populations in heterogeneous landscapes. *Canadian Journal of Zoology* 92: 491-502.
- Smith VH, Joye SB, Howarth RW. 2006. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography* 51:351–355.
- Snodgrass JW, Casey RE, Joseph D, Simon JA. 2008. Microcosm investigations of stormwater pond sediment toxicity to embryonic and larval amphibians: Variation in sensitivity among species. *Environmental Pollution* 154:291–297.
- Söderman F, Van Dongen S, Pakkasmaa S, Merilä J. 2007. Environmental stress increases skeletal fluctuating asymmetry in the moor frog *Rana arvalis*. *Oecologia* 151:593–604.
- Spellerberg IF. 1998. Ecological effects of roads and traffic: a literature review. *Global Ecology & Biogeography Letters* 7:317–333.

- Spinoni J, Barbosa P, De Jager A, McCormick N, Naumann G, Vogt J V., Magni D, Masante D, Mazzeschi M. 2019. A new global database of meteorological drought events from 1951 to 2016. *Journal of Hydrology: Regional Studies* 22:100593.
- Stark T, Brouwer D, Ploeg R, Lenders T. 2017. First record of phoresy or possible parasitism of the fresh water leech *Helobdella stagnalis* (Linnaeus, 1758) (Rhynchobdellida : Glossiphoniidae) on *Lissotriton helveticus* (Razoumowsky, 1789) (Caudata: Salamandridae) in the Netherlands. *Herpetology Notes* 10: 717-719.
- Stelder D. 2016. Regional accessibility trends in Europe: road infrastructure, 1957–2012. *Regional Studies* 50:983–995.
- Stevens VM, Leboulengé É, Wesselingh RA, Baguette M. 2006. Quantifying functional connectivity: Experimental assessment of boundary permeability for the natterjack toad (*Bufo calamita*). *Oecologia* 150:161–171.
- Steyer JS. 2002. The First Articulated Trematosaur ‘amphibian’ from the Lower Triassic of Madagascar: Implications for the Phylogeny of the Group. *Palaeontology* 45:771–793.
- Stoate C, Boatman ND, Borralho RJ, Carvalho CR, De Snoo GR, Eden P. 2001. Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management* 63:337–365.
- Stock M, Roth P, Podloucky R, Grossenbacher K. 2008. Wechselkröten unter Berücksichtigung von *Bufo viridis viridis* Laurenti, 1768; *Bufo variabilis* (Pallas, 1769); *Bufo boulengeri* Lataste, 1879; *Bufo balearicus* Böttger, 1880 und *Bufo siculus* Stöck, Sicilia, Belfiore, Lo Brutto, Lo Valvo und Arculeo. In *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*: 413-498.
- Storfer A. 2003. Amphibian declines: future directions. *Diversity and Distributions* 9:151–163.
- Streicher JW, Sadler R, Loader SP. 2020. Amphibian taxonomy: early 21st century case studies. <https://doi.org/10.1080/00222933.2020.1777339> 54:1–13.
- Stuart SN. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 306:1783–1786.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science (New York, N.Y.)* 306:1783–6.

SudOuest 2010: <https://www.sudouest.fr/gironde/libourne-les-sangsues-proliferent-la-plage-restera-fermee-10080346.php> [Accessed on 02.07.2021].

T

Taylor DH, Guttman SI. 1977. The reproductive biology of amphibians. Plenum Press.

Taylor PD, Fahrig L, Henein K, Merriam G. 1993. Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos* 68:571–573.

Tejedo M, Reques R. 1994. Plasticity in Metamorphic Traits of Natterjack Tadpoles: The Interactive Effects of Density and Pond Duration. *Oikos* 71:295.

Testud G. 2020. Étude de la perméabilité de la LGV Bretagne – Pays de la Loire (BPL) aux déplacements des amphibiens. Université Paris sciences et lettres.

Testud G, Miaud C. 2018. From Effects of Linear Transport Infrastructures on Amphibians to Mitigation Measures. *Reptiles and Amphibians*. IntechOpen.

Thambirajah AA, Koide EM, Imbery JJ, Helbing CC. 2019. Contaminant and environmental influences on thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. *Frontiers in Endocrinology* 10.

Tischendorf L, Fahrig L. 2000. On the usage and measurement of landscape connectivity. *Oikos* 90:7–19.

Tissier M. 2017. Conservation biology of the European hamster (*Cricetus cricetus*). Université de Strasbourg.

Toledo RC, Jared C. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 111:1–29.

Tomasevic N, Cvetkovic D, Miaud C, Aleksic I, Crnobrnja-Isailovic J. 2008. Interannual variation in life history traits between neighbouring populations of the widespread amphibian *Bufo bufo*. *Revue d'Ecologie, Terre et Vie* 63:371–381.

Touzot M, Lefebure T, Lengagne T, Secondi J, Dumet A, Konecny-Dupre L, Veber P, Navratil V, Duchamp C, Mondy N. 2021. Large-scale deregulation of gene expression by artificial light at night in tadpoles of common toads. *bioRxiv*

Touzot M, Lefebure T, Lengagne T, Secondi J, Dumet A, Konecny-Dupre L, Veber P, Navratil V, Duchamp C, Mondy N. 2022. Transcriptome-wide deregulation of gene expression by artificial light at night in tadpoles of common toads. *Science of The Total Environment* 818:151734.

Touzot M, Teulier L, Lengagne T, Secondi J, Théry M, Libourel P-A, Guillard L, Mondy N. 2019. Artificial light at night disturbs the activity and energy allocation of the common toad during the breeding period. *Conservation Physiology* 7.

Trochet A, Le Chevalier H, Calvez O, Barthe L, Isselin-Nondedeu F, Picard D, Debelgarric M, Pégourié N, Rocher R, Ribéron A. 2017. Postbreeding Movements in Marbled Newts (Caudata, Salamandridae): A Comparative Radiotracking Study in Two Habitat Types. *Herpetologica* 73:1–9.

Trochet A, Le Chevalier H, Calvez O, Ribéron A, Bertrand R, Blanchet S. 2019. Influence of substrate types and morphological traits on movement behavior in a toad and newt species. *PeerJ* 2019: e6053.

Troïanowski M, Condette C, Mondy N, Dumet A, Lengagne T. 2015. Traffic noise affects colouration but not calls in the European treefrog (*Hyla arborea*). *Behaviour* 152:821–836.

Troïanowski M, Mondy N, Dumet A, Arcanjo C, Lengagne T. 2017. Effects of traffic noise on tree frog stress levels, immunity, and color signaling. *Conservation Biology* 31:1132–1140.

U

Uezu A, Metzger JP, Vielliard JME. 2005. Effects of structural and functional connectivity and patch size on the abundance of seven Atlantic Forest bird species. *Biological Conservation* 123:507–519.

UICN. 2015. Amphibiens de France métropolitaine.

USEPA, 2017. Operating procedure - Field X-ray Fluorescence Measurement (SESDPROC-107-R4).

V

Vacher J-P, Ursenvacher S. 2019. Structuration g_en_etique des populations de *Bufo viridis* (Amphibia : Bufonidae) du Bas-Rhin et du Haut-Rhin.

van der Ree R, Jaeger JAG, van der Grift E, Clevenger A. 2011. Effects of roads and traffic on wildlife populations and landscape function: road ecology is moving toward larger scales. *Ecology and society* 16.

Vautard R, Yiou P, D'Andrea F, de Noblet N, Viovy N, Cassou C, Polcher J, Ciais P, Kageyama M, Fan Y. 2007. Summertime European heat and drought waves induced by wintertime Mediterranean rainfall deficit. *Geophysical Research Letters* 34.

Villemey A et al. 2018, February 5. Can linear transportation infrastructure verges constitute a habitat and/or a corridor for insects in temperate landscapes? A systematic review.

W

Wagner CC, Cooper EL. 1963. Population Density, Growth, and Fecundity of the Creek Chubsucker, *Erimyzon oblongus*. *Copeia* 1963:350.

Wagner N, Lötters S. 2013. Effects of water contamination on site selection by amphibians: experiences from an arena approach with European frogs and newts. *Archives of environmental contamination and toxicology* 65:98–104.

Wake DB, Koo MS. 2018. Amphibians. *Current Biology* 28:R1237–R1241. Cell Press.

Wells KD. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour* 25:666–693.

Wells KD. 2010. The ecology and behavior of amphibians. Page The Ecology and Behavior of Amphibians. University of Chicago press.

Wiens JA. 2009. Landscape ecology as a foundation for sustainable conservation. *Landscape Ecology* 24:1053–1065.

Wik A, Lycken J, Dave G. 2008. Sediment quality assessment of road runoff detention systems in Sweden and the potential contribution of tire wear. *Water, Air, and Soil Pollution* 194:301–314.

Wilbur HM. 1980. Complex Life Cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:67–93.

Wilson JJ. 2001. A review of the modes of orientation used by amphibians during breeding migration. *Journal of the Pennsylvania Academy of Science*:61–66.

Wycherley J, Doran S, Beebee TJC. 2002. Frog calls echo microsatellite phylogeography in the European pool frog (*Rana lessonae*). *Journal of Zoology* 258:479–484.

Y

Yanes M, Velasco JM, Suárez F. 1995. Permeability of roads and railways to vertebrates: The importance of culverts. *Biological Conservation* 71:217–222.

Yang JH, Poyarkov NA. 2021. A new species of the genus *Micryletta* (Anura, Microhylidae) from Hainan Island, China. *Zoological Research* 42:234.

Yeager A, Commito J, Wilson A, Bower D, Schwarzkopf L. 2014. Sex, light, and sound: Location and combination of multiple attractants affect probability of cane toad (*Rhinella marina*) capture. *Journal of Pest Science* 87:323–329.

Z

Zabel F, Delzeit R, Schneider JM, Seppelt R, Mauser W, Václavík T. 2019. Global impacts of future cropland expansion and intensification on agricultural markets and biodiversity. *Nature Communications*.

Zedler JB. 2003. Wetlands at your service: reducing impacts of agriculture at the watershed scale. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1:65–72.

Zedler JB, Kercher S. 2005. WETLAND RESOURCES: Status, Trends, Ecosystem Services, and Restorability. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.energy.30.050504.144248> 30:39–74.

Zhang W, Zhi H, Sun H. 2020. Effects of Heavy Metal Pollution on Fitness and Swimming Performance of *Bufo raddei* Tadpole. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 105:387–392.

Zhang YF, Xu HM, Yu F, Yang HY, Jia DD, Li PF. 2019. Comparison the sensitivity of amphibian metamorphosis assays with NF 48 stage and NF 51 stage *Xenopus laevis* tadpoles. *Toxicology Mechanisms and Methods* 29:421–427.

Zimić A. 2015, January 10. Commensalism, predation or parasitism: First report of the leech *Helobdella stagnalis* Linnaeus, 1758 on yellow-bellied toad, *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758). *Ecologica Montenegrina* 2: 62-63.

Annexes

Annexe 1 : Matériels et méthodes supplémentaire de l'étude 4

In the following we provide details for the four separate studies conducted. Each study used a different experimental set up, which was adapted to the species tested.

1. First study: European hamster (*Cricetus cricetus*).

| Species | Origin of animals | N | Height of netting fence tested (cm) | Length of the overhang (cm) | Duration of experiment | Number of animals tested simultaneously |
|------------------|-------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| European hamster | Laboratory | 26 (5♀ adults 8♂ adults & 13 juveniles) | 50 | 8 | 12h per individual | 1 |

1.1. Origin of animals and housing conditions

All hamsters used for this experiment were born and raised in our breeding unit (CNRS-IPHC-DEPE, Strasbourg, France). Animals were maintained in rooms with controlled temperature ($21.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$), humidity (35 to 55%), and photoperiod (16hL:8hD). As the European hamster is a territorial species, each individual was housed in a single transparent Plexiglas cage (L 42 * W 26.5 * H 18 cm) with litter. To enrich their environment, pieces of wood, PVC tubes and shredded paper were provided. Water and food pellets ('105 pellets', SAFE, 89290 Augy, France) were provided *ad libitum*. In 2019, tests were conducted with 2 adult males and 4 juveniles (3 months old). In 2020, 5 adult males, 5 adult females and 10 juveniles were tested.

Hamsters were measured (body length) two weeks before the test and weighed on the day of the test. Adult female hamsters weighed on average 289.5 ± 44 g and measured 28.6 ± 0.9 cm from the extremity of the anterior leg to the extremity of the posterior leg (Da/p). Adult males weighed on average 456.8 ± 128 g and measured 31.7 ± 3.1 cm while juveniles weighed on average 197.1 ± 85 g and measured 25.5 ± 2.8 cm.

1.2. Experimental set-up: test arena

The experimental set-up consisted of an enclosure 2 m wide and 3 m long, which was divided into two test arenas, so that two individuals could be tested at the same time (Fig. 1). The walls (124 cm high) and the floor of the enclosure were made of a metal grid (0.5 cm mesh). To prevent hamsters escaping from the enclosure, the walls were covered with 100 cm high metal sheets. To separate the two test arenas and avoid interaction between animals, a PVC panel (80 cm high) was introduced in the middle of the enclosure.

Since the objective of the study was to test the effectiveness of both wire netting fence and concrete fence, the enclosure was designed to test both fence types simultaneously (Fig. 1). The dimensions of the two test arenas within the enclosure were identical. Each arena contained a ‘Departure compartment’ and an ‘Arrival compartment’, separated by a fence. The fence consisted of a concrete section (height: 40 cm) and a wire netting section (height: 50 cm; 6.5x6.5 mm mesh, 8 cm overhang).

The ‘Departure compartment’ contained a shelter and provided water *ad libitum*. Appetizing food was placed into the ‘Arrival compartment’ that could be smelled and seen by the hamsters, as an incentive to cross the fence. All tests were recorded with an infrared video camera (HIKVISION DS-2CD2655FWD-IZS, Hangzhou, China), to observe the crossing behaviour of hamsters (Fig. 1).

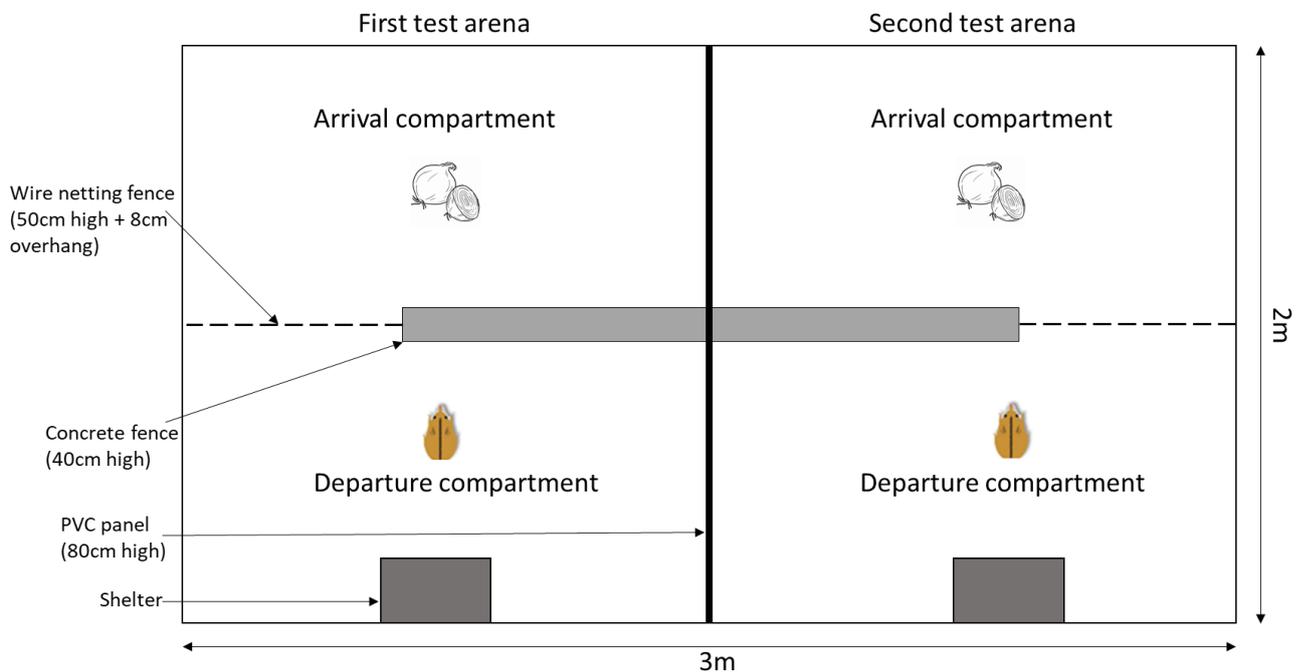


Figure 1: Top view of the enclosure containing 2 test arenas. The ‘Departure compartment’ contained a shelter and water *ad libitum*, while the ‘Arrival compartment’ contained appetizing food as an incentive to cross the fence.

1.3. Experimental testing

Tests were conducted in 2019 from August 16 to September 25 and in 2020 from May 13 to June 4.

During a test, a hamster was placed in the ‘Departure compartment’ at 7 p.m. and given until 7 a.m. the following morning (i.e. 12 h) to cross over into the ‘Arrival compartment’. All relevant behaviour of the hamster (e.g. whether it crossed the wire netting section or the concrete section) was recorded by the infrared video camera. To fit with the set-up of the other

studies, we only considered the crossings via the wire netting section, while crossings via the concrete section were neglected.

2. Second study: Common vole (*Microtus arvalis*) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus*)

| Species | Origin of animals | N | Height of netting fence tested (cm) | Length of the overhang (cm) | Duration of experiment | Number of animals tested simultaneously |
|-------------|-------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---|
| Common vole | Wild | 40 adults of each species (8 for each overhang length) | 30 | 0, 2, 5, 10,15 | 30 minutes per individual | 1 |
| Wood mouse | Wild | 40 adults of each species (8 for each overhang length) | 30 | 0, 2, 5, 10,15 | 30 minutes per individual | 1 |

2.1. Origin of animals and capture protocol

Common voles (*Microtus arvalis*) and wood mice (*Apodemus sylvaticus*) were captured using INRA live traps (5*5 cm openings with a wooden 5*5*13 cm dormitory, baited with pieces of apple and peanut butter; Aubry, 1950) during nocturnal trapping sessions in April 2015 (20-24 April). Alongside a road verge near Innenheim (France; 48.515614, 7.579671), 34 traps were placed along a 100 m transect (3 m between traps), which were activated at twilight and deactivated at dawn. When a “clap” sound indicated a capture, the trapped individual was taxonomically identified, sexed, measured and weighed. Only adults in apparent good health were used for the experiment (body mass >20 g for *M. arvalis*, and >15 g for *A. sylvaticus*; Rosario & Mathias 2004; Jumeau et al., 2017). All other individuals were released immediately.

2.2. Experimental set-up: test arena

The test arena consisted of a 40 cm square area, made of wood. The four walls were made of wire netting fence (height: 30 cm) with a 6.5x6.5 mm mesh size. An overhang could be added by bending the top of the fence. The length of this overhang varied between 0, 2, 5, 10 and 15 cm, while fence height remained unchanged (e.g. the fence was 30 cm high with a 10 cm overhang). The arena could be transported and was used at the capture sites.

2.3. Experimental testing

After capture and handling, the animal was returned to the dormitory (doors on each end of the trap open), which was placed inside the arena for 30 minutes. The only way to escape from the arena, once an animal had left the dormitory, was by climbing the wire netting walls. During testing, the experimenter stayed away from the arena (50 m), to avoid disturbing the animal. A camera trap (Cuddeback C123, De Pere, USA) was placed adjacent to the arena (taking pictures every 10 s), to document all relevant behaviour. After 20 min, the experimenter returned to see whether the individual remained within the dormitory or had exited. In the first case, the animal was manually extracted from the dormitory and the test continued for the

remaining 10 min with the animal inside the arena. After 30 min, the test was stopped and success or failure of arena escape was noted. All animals were released on site at the end of the test. Only one individual was tested at a time. For each species and for all five-overhang dimensions, 8 individuals were tested.

3. Third study: Marsh frog (*Pelophylax ridibundus*)

| Species | Origin of animals | N | Height of netting fence tested (cm) | Length of the overhang (cm) | Duration of experiment | Number of animals tested simultaneously |
|------------|-------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| Marsh frog | Wild | 40 adults (8 for each overhang length) | 30 | 0, 2, 5, 10,15 | 30 minutes per group | 8 adults |

3.1. Origin of animals and capture protocol

Marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) were captured in stormwater ponds, as part of another study, which took place in July 2016 (Jumeau et al., 2020). Captures occurred at night using headlamps and amphibian nets. All individuals were released immediately after testing, except males, which were kept for another study. Marsh frogs were not measured or weighed.

3.2. Experimental set-up: test arena

The test arena was identical to the arena described above for study 2 (see 2.2).

3.3. Experimental testing

The experimental protocol for marsh frogs was identical to the protocol described above for study 2(see 2.3), with few modifications: (1) after capture, frogs were immediately introduced into the arena (no dormitory); (2) for each overhand length, all 8 adults were tested simultaneously, not individually.

4. Fourth study: European green toad (*Bufo viridis*)

| Species | Origin of animals | N | Height of netting fence tested (cm) | Length of the overhang (cm) | Duration of experiment | Number of animals tested simultaneously |
|---------------------|-------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| European green toad | Wild | 29 (9♂ adults & 20 juveniles), the same for both the 0 or 10 cm overhang | 40 | 0 or 10 (only for adults) | 10 hours per group | 9 for adults & 20 for juveniles |

4.1. Origin of animals and capture protocol

European green toad (*Bufo viridis*) were captured in a quarry pond (Griesheim-prés-Molsheim, Alsace, France) between June and July 2020. Captures occurred at night using headlamps and amphibian nets. Immediately after capture, adult toads received an RFID PIT tag (1.4 x 8 mm; TAG LF GLT1M4X9 RO EM, Biolog-ID®, Bernay, France), implanted subcutaneously, to allow individual tracking. The maximum period of captivity was 15 days, after which toads were released at the capture site.

4.2. Experimental set-up: test arena

All experiments were conducted in a small outdoor arena (60x60 cm; **Fig. 2**). This arena included a concrete fence (behind the wire mesh fence; Fig. 2) which was not tested in this study. The arena consisted of three compartments: (1) the 'Departure compartment' (1800 cm²) had a bare ('unattractive') concrete floor, while the floor of the (2) 'Arrival compartment' (2460 cm²) was enriched with wet moss, hiding places, and water. A speaker at the top of this compartment replayed the recording of a mixed chorus of green frogs (*Pelophylax* sp.) and natterjack toads (*Epidalea calamita*); (3) the 'Attraction compartment' was located adjacent to the arrival compartment and housed two male toads during experimentation for further olfactory and acoustic attraction. The 'Arrival compartment' was separated from the 'Departure compartment' by a wire netting fence (height: 40 cm; mesh size: 6.5x6.5 mm), which was positioned in front of a concrete fence (**Fig. 2**). A fence overhang could be implemented by adding a horizontal section of wire netting fence (10 cm) to the top of the fence. An infrared camera (HIKVISION DS-2CD2655FWD-IZS, Hangzhou, China) situated in front of the 'Departure compartment' recorded the behaviour of tested individuals.

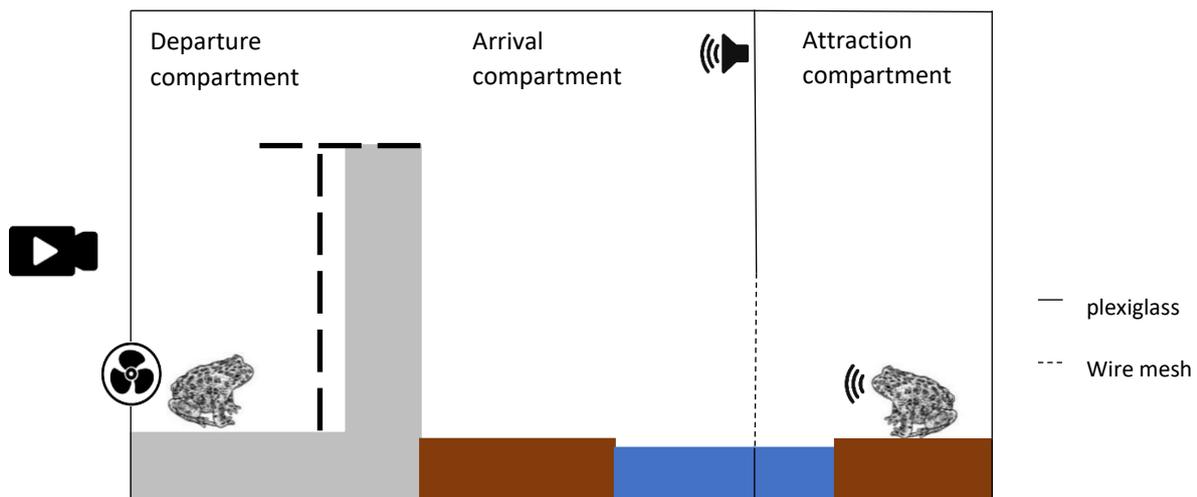


Figure 2: The test arena consisted of (1) a 'Departure compartment', where toads were placed, (2) a wire netting fence (tested in this study), sitting in front of a concrete fence (not tested in this study), (3) an 'Arrival compartment', enriched with terrestrial and aquatic structures, and (4) an 'Attraction compartment' with calling male toads. The arena also included a speaker that replayed the recording of a mixed chorus of green frogs (*Pelophylax* sp.) and natterjack toads (*Epidalea calamita*). All behaviour was recorded by an infrared camera positioned at one side of the 'Departure compartment'.

4.3. Experimental testing

At the start of the experiment, near sunset (~9:30 pm), toads were placed together in the 'Departure compartment'. At the same time, the sound recording began, camera recording started and singing males were placed into the 'Attraction compartment' for the duration of the test (until 7 am the following day). All behaviour during testing was recorded. At 7:00 am, the number of animals that had moved from the 'Departure compartment' to the 'Arrival compartment' was noted. Adult toads could be identified individually by their PIT tag, while this was not possible for juveniles (too small to receive a tag). Hereafter all individuals were transferred back to their housing container.

Each adult (N=9) and juvenile (N=20) group was tested twice per condition (with or without overhang).

For each condition (with or without overhang) the proportion of individuals that successfully crossed the wire netting fence was recorded.

Annexe de l'étude 6 : coefficient de friction des différents éléments du paysage

Annexe : Coefficient de friction des différents éléments du paysage

| Milieux | Coef /10 000 | Milieux | Coef /10 000 |
|---------------------------------------|--------------|--|--------------|
| Autres espaces libres | 10 | Étangs et lacs | 500 |
| Autres espaces urbains spécialisés | 1000 | Exploitations agricoles | 50 |
| Bassins artificiels | 100 | Forêts de feuillus | 5000 |
| BOR avec Crapaud vert | 1 | Forêts de résineux | 5000 |
| BOI avec Crapaud vert | 1 | Forêts mixtes | 5000 |
| BOR sans Crapaud vert | 100 | Fourrés, fruticées et ligneux | 100 |
| Bosquets et haies | 500 | Friches industrielles | 10 |
| Canaux principaux | 5000 | Friches minières (Terrils et anciennes carrières) | 10 |
| Carrières (Bâtiments) | 1000 | Golfs | 50 |
| Carrières (Zones d'exploitation) | 10 | Gravières et sablières (Bâtiments) | 1000 |
| Chantiers et remblais | 10 | Gravières et sablières (Zones d'exploitation) | 10 |
| Cimetières | 1000 | Habitat collectif | 1000 |

| | | | |
|--|-------|--|----------|
| Coupes à blanc et jeunes plantations | 50 | Habitat continu (centre ancien, centre-ville) | 1000 |
| Cours d'eau principaux | 10000 | Habitat individuel | 1000 |
| Cultures annuelles | 50 | Habitat mixte | 1000 |
| Cultures spécifiques | 50 | Houblon | 50 |
| Emprise réseau ferré | 500 | Jardins ouvriers | 10 |
| Emprise réseau routier | 10000 | Landes | 10 |
| Emprises aéroportuaires (Autres espaces) | 1000 | Mares semi-naturelles avec présence de Crapaud vert | 1 |
| Emprises aéroportuaires (Bâtiments) | 1000 | Mare semi-naturelle sans Crapaud vert | 100 |
| Emprises aéroportuaires (Pistes) | 1000 | Pelouses et zones arborées | 50 |
| Emprises commerciales et artisanales | 1000 | Prairies | 50 |
| Emprises culturelles et patrimoine | 1000 | Ripisylves | 500 |
| Emprises hospitalières | 1000 | Tourbières et marais | 100 |
| Emprises industrielles | 100 | Vergers intensifs | 50 |
| Emprises militaires | 1000 | Vergers traditionnels | 50 |
| Emprises portuaires | 1000 | Vignes | 10 |
| Emprises scolaires et universitaires | 1000 | Zones d'activités tertiaires | 1000 |
| Equipements sportifs et de loisirs | 1000 | | |

Les éléments en gras représentent les habitats de reproduction du Crapaud vert

Antonin CONAN

Rôle écologique des bassins d'orage routiers pour les amphibiens

Résumé

Les bassins d'orage routiers (BO) sont retrouvés le long des routes afin de dépolluer les eaux de chaussée avant rejet dans l'environnement. Malgré la pollution, ces BO sont colonisés par les amphibiens. Dans le Bas-Rhin, paysage très modifié avec peu de zones humides naturelles, les amphibiens se reproduisent dans des sites de substitution comme les BO. Durant ma thèse, je me suis intéressé à l'utilisation des BO par les grenouilles vertes & le Crapaud vert, afin d'évaluer leur rôle écologique. Les résultats indiquent que les BO du Bas-Rhin sont des pièges écologiques, mais uniquement en présence d'une forte densité de sangsues prédatrices de têtards, et non pas à cause de la pollution. Cloisonner ces BO afin d'en interdire l'accès par les amphibiens n'est toutefois pas pertinent. En effet, même si cette thèse a démontré l'efficacité de différentes clôtures pour empêcher la majorité des amphibiens de traverser une route, elle a aussi souligné le rôle relais des BO à la connectivité paysagère, évitant l'isolement des populations étudiées. Dans les paysages très modifiés, il est alors préférable d'améliorer les BO en réalisant une gestion adaptée en fonction des amphibiens.

Abstract

Roadside stormwater ponds (SWP) are found along roads to clean up roadway water before its release into the environment. Despite the pollution, these SWP are colonized by amphibians. In the Bas-Rhin (eastern France), a very modified landscape with few natural wetlands, amphibians reproduce in substitute sites such as SWP. During my PhD, I was interested in the use of SWP by Green frogs & Green toads. The results indicate that the SWP in the Bas-Rhin are ecological traps but only in the presence of a high density of tadpole predator leeches, and surprisingly not because of pollution. However, it is not pertinent to fence off these SWP to prevent amphibians from reaching them. Indeed, even if this PhD has demonstrated the effectiveness of different fences to prevent the amphibians to cross a road, it has also highlighted the relay role of SWP to landscape connectivity, avoiding the isolation of the studied populations. In highly modified landscapes, it is then preferable to improve the SWP by carrying out an appropriate management according to the amphibians.