

Etude sur la détection d'Amphibiens de Guyane à partir de l'ADN environnemental

Association Trésor 2020/2021



Figure 1. Prélèvement d'eau sur la réserve Trésor, à gauche, *Anomaloglossus blanci* et à droite, *Ceratophrys cornuta* (© Association Trésor)

Remerciements

Le projet a bénéficié du soutien financier de la Direction Générale des Territoires et de la Mer, de la Fondation Trésor et de la Collectivité Territoriale de la Guyane.

L'association Trésor tient à remercier Jérôme Murienne et Antoine Fouquet du laboratoire Evolution et Diversité Biologique du CNRS de Toulouse pour leur appui technique et la mise à disposition de leurs bases de références Vertébrés ainsi que l'élaboration de la base de référence Amphibiens, créée spécifiquement dans le cadre de ce projet. Les membres de l'association remercient aussi l'équipe de la réserve naturelle nationale de Kaw-Roura pour les autorisations données pour l'échantillonnage de certains sites de leur territoire et l'aide apportée sur certains prélèvements, Elodie Courtois, Roxane Schaub et Bruno Gotz qui ont aidé l'équipe sur différentes manipulations.

Table des matières

1	Présentation du projet	4
2	Phase 1 : Etude de la détection d'une espèce rare et en danger <i>Anomaloglossus blanci</i> par l'ADN environnemental	5
2.1	Contexte et objectifs	5
2.2	Méthodologie	7
2.2.1	<i>Sites d'étude</i>	7
2.2.2	<i>Recherche des individus sur le terrain</i>	10
2.2.3	<i>Protocole d'échantillonnage de l'ADNe</i>	10
2.3	Résultats	12
2.3.1	<i>Actualisation des données de présence d'Anomaloglossus blanci en 2020 sur le terrain</i>	12
2.3.2	<i>Détection d'Anomaloglossus blanci par l'ADN environnemental</i>	12
2.3.3	<i>Détection des autres espèces d'amphibiens par l'ADNe</i>	13
2.4	Conclusions de la phase 1 <i>Anomaloglossus blanci</i>	14
3	Phase 2 : Etude de la détection d'espèces d'amphibiens par l'ADNe dans les mares temporaires de Guyane	15
3.1	Contexte et objectifs	15
3.2	Méthodologie	17
3.2.1	<i>Sites d'étude</i>	17
3.2.2	<i>Recherche des espèces présentes sur le terrain</i>	18
3.2.3	<i>Protocole d'échantillonnage de l'ADNe</i>	18
3.2.4	<i>Suivi acoustique</i>	19
3.3	Résultats	20
3.3.1	<i>La mare du bain des Annamites sur Montsinéry-Tonnégrande</i>	22
3.3.2	<i>Détection des autres espèces sur les mares</i>	24
3.4	Conclusion de la phase 2 Espèces à reproduction explosives	24
4	Conclusion générale	25
5	Annexes 1 et 1 bis : Résultats issus des analyses pour la détection d' <i>Anomaloglossus blanci</i> par l'ADN environnemental	26
6	Annexes 2 et 2 bis : Résultats issus des analyses pour la détection des espèces dans les mares temporaires par l'ADN environnemental	27

1 Présentation du projet

L'association Trésor, gestionnaire d'espaces naturels protégés en Guyane, porte ce présent projet sur la détection de la présence d'espèces d'amphibiens de Guyane à partir d'ADN environnemental (ADNe). Ce projet a reçu le soutien financier de la Direction Générale des Territoires et de la Mer et la Fondation Trésor.

Le métabarcoding consiste à détecter la présence d'espèces en prélevant l'ADN présent dans un substrat (terre ou eau) puis en associant les différentes séquences d'ADN retrouvées à une espèce connue. L'ADN environnemental (ADNe) est défini comme l'ADN pouvant être extrait à partir d'échantillons environnementaux, tels que l'eau, le sol ou les fèces, sans avoir besoin d'isoler au préalable des organismes cibles. La démarche consiste à amplifier par PCR (Polymerase Chain Reaction) des barcodes ADN (régions de l'ADN) d'un échantillon. Ces barcodes ADN sont des régions d'ADN propre à chaque espèce. Le choix du barcode se fait en fonction des objectifs (plus ou moins ciblé taxonomiquement) de l'étude afin de répondre aux problématiques posées.

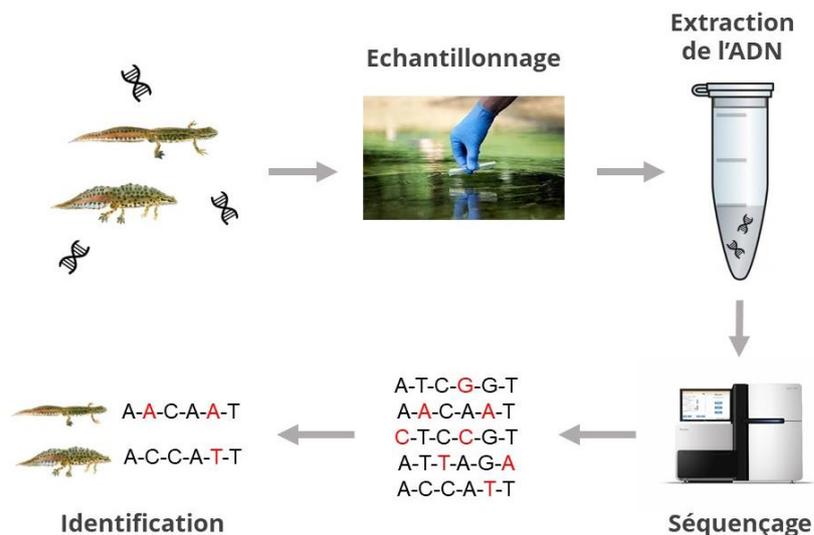


Figure 2. Principe du métabarcoding (source schéma - Association de la Grande Cariçaise)

Cette méthode est de plus en plus régulièrement utilisée en Guyane dans le cadre d'études en écologie. L'atout majeur de celle-ci est que l'observation directe des individus ne soit pas nécessaire. Par exemple, cette méthode a permis l'identification des espèces de mammifères à partir d'ADN extrait de repas de sang de moustiques, l'identification des communautés de champignons contenus dans la litière et le sol, la diversité de poissons grâce à l'ADN environnemental retrouvé dans l'eau de criques. Cette technique se révélerait particulièrement pertinente dans la recherche et la confirmation d'espèces rares ou difficilement observables dans un milieu donné.

L'étude des amphibiens est généralement réalisée par des méthodes dites « classiques » basée sur la détection visuelle et/ou auditive. Si la technique de détection via l'ADNe semble

avoir été éprouvée dans quelques groupes, les autres groupes taxonomiques tels que les amphibiens semblent avoir fait l'objet de peu voire d'aucune expertise de ce type.

Les espèces ciblées dans ce projet sont, d'une part, les espèces à reproduction explosives et, d'autre part, *Anomaloglossus blanci*. Elles présentent des enjeux de conservation importants au regard de leur stratégie de reproduction très particulière, pour les premières, et de sa rareté pour la dernière.

Face aux difficultés de détection de ces espèces à forts enjeux, l'objectif de ce projet est de tester *in situ* leur détection à partir de l'ADNe et d'apporter des données sur l'écologie et la répartition de ces espèces ciblées. Une comparaison avec les méthodes de détection « classiques » est également réalisée afin d'évaluer la rentabilité et les moyens nécessaires aux deux méthodes.

Les expertises menées dans le cadre de ce projet sont inédites pour les taxons considérés et peuvent aussi, en cas de réussite, poser les bases de futures actions pour l'étude et la préservation des amphibiens guyanais. Cette méthode pourrait ainsi être utilisée pour des opérations d'inventaire (détermination d'une liste d'espèces présentes), de suivi de populations (espèces à enjeu de conservation) ou de prospection (détermination de l'aire de répartition d'espèces invasives par exemple).

2 Phase 1 : Etude de la détection d'une espèce rare et en danger *Anomaloglossus blanci* par l'ADN environnemental

2.1 Contexte et objectifs

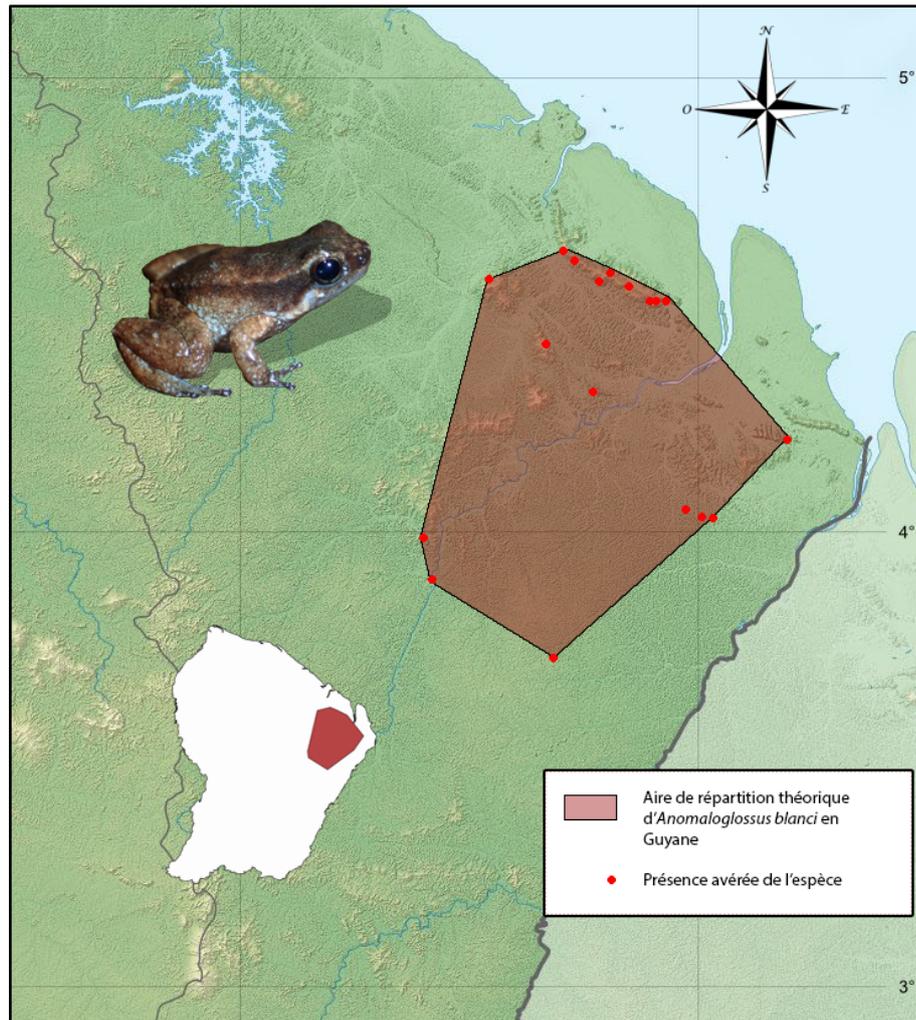
L'Anomaloglosse de Blanc (*Anomaloglossus blanci*) est une espèce de la famille des Aromobatidae endémique de Guyane française. Elle forme avec *Anomaloglossus degranvillei* et *Anomaloglossus dewynteri* un groupe d'espèces proches à distribution réduite et menacées de disparition. Depuis une dizaine d'années, les naturalistes et experts en herpétologie ont constaté une impressionnante chute des effectifs dans toutes les populations connues de ces trois espèces, aboutissant, semble-t-il, parfois à des extinctions locales. Autrefois communes et faciles à observer, il est aujourd'hui très difficile de confirmer la présence de ces espèces, y compris sur des sites où leur abondance passée était considérée comme élevée et ce malgré des prospections soutenues et ciblées. La détection des individus nécessite, le plus souvent, un effort de prospection important (plusieurs jours d'expertises) dans la zone étudiée. Malgré ces efforts conséquents dans certains secteurs, les populations historiques connues ne sont pas forcément retrouvées.



Figure 3. Gros plan d'un individu d'*Anomaloglossus blanci* et détail de son habitat sur la montagne de Kaw (© B. VILLETTE)

Anomaloglossus blanci est une petite espèce à la coloration cryptique qui fréquente les petites criques forestières. C'est une espèce strictement ripicole qui passe toute l'année à proximité immédiate des cours d'eau (Figure n°3). En l'état des connaissances, cette espèce est endémique du quart nord-est de la Guyane. Elle était auparavant connue de nombreux secteurs sur son aire de distribution, parfois dans des abondances fortes. La carte n°1 présente l'aire de répartition théorique de cette espèce ainsi que la localisation des populations connues à ce jour. Les points de présence avérée illustrent les sites où l'espèce a été confirmée par des observations d'individus, validées par des documents photographiques et/ou des analyses moléculaires (ADN). Sur l'ensemble de ces sites, seules quelques localités ont été visitées ces dernières années et moins de 50% d'entre elles ont permis la redécouverte de l'Anomaloglosse de Blanc dans des abondances variables.

La détection des populations via les méthodes classiques peut être coûteuse financièrement en temps.



Carte 1. Aire de répartition de l'*Anomaloglosse de Blanc*

L'objectif principal de cette phase d'expérimentation est d'évaluer la détectabilité de l'espèce à partir de l'ADNe et la distance de détection en fonction de paramètres connus et maîtrisés. Si celle-ci s'avère élevée, cette méthode de détection pourrait permettre un suivi efficace sur le long terme et à une résolution et une échelle spatiale supérieure à ce qui est possible pour l'instant. Afin de comparer les méthodes de détection, une recherche visuelle et auditive d'individus sur les sites de prélèvements viseront à confirmer et actualiser les données de présence de cette espèce. Pour finir, les analyses permettront également d'évaluer la détectabilité des autres espèces d'amphibiens et de comparer les résultats avec la liste des espèces détectées à partir d'une rapide recherche (inventaire classique non-exhaustif).

2.2 Méthodologie

2.2.1 Sites d'étude

Cette étude étant un test de faisabilité, la sélection des stations d'échantillonnage a été réalisée en amont des prélèvements. Ces stations présentent des paramètres connus (présence, abondance) permettant de mieux appréhender les résultats issus des analyses et

d'évaluer la robustesse de cette nouvelle méthode. La carte n°2 localise ces stations sélectionnées. Quatre sites de prélèvements ont donc été sélectionnés et sont présentés ci-après avec leurs caractéristiques (historique des données et abondance).

- Site de présence récente avérée de l'espèce (confirmées par des données récentes) en amont de l'échantillonnage ADNe
 - Sites de forte abondance

Un site est considéré comme de forte abondance lorsque la détection « classique » de plusieurs individus d'*Anomaloglossus blanci* est rapide et régulière dans la zone d'étude.

Crique Blanci, réserve naturelle régionale Trésor :

Petite crique forestière coulant le long de la montagne de Kaw dans la réserve naturelle régionale Trésor (RNR Trésor). Cette station avait été découverte par hasard lors d'une prospection dans le cours d'eau. Elle est depuis suivie plusieurs fois par ans et le nombre d'*Anomaloglossus blanci* observés est resté élevé sur chaque visite. Dernier passage et observation avant cette étude en juin 2019, observateur association Trésor.

Corridor 7, route nationale 2 :

Tête de crique encaissée dans un talweg sur une zone plus ou moins hydromorphe. Cette station était intégrée dans une étude menée en 2016 par Hugo Reizine en stage au CNRS. Durant cette étude, les contacts avec *Anomaloglossus blanci* étaient nombreux et ce site était considéré comme le secteur de plus forte abondance sur l'ensemble des secteurs de son suivi. Dernier passage et observation avant cette étude en mai 2016, observateur Hugo Reizine.

- Sites de faible abondance

Les secteurs retenus avaient permis lors de précédents passages de confirmer la présence d'individus mais en petit nombre et après une prospection soutenue de la zone (la comparaison entre nombre d'individus / effort de prospection étant calibrée en fonction des observations faites sur la crique Blanci de la RNR Trésor).

Affluent de la crique Patawa, réserve naturelle nationale de Kaw-Roura :

Petite crique rocheuse où un contact auditif avait été enregistré par Maxime Cobigo en 2016. Une nouvelle prospection ciblée, montée en 2018, avait alors permis l'observation de quelques individus. Dernier passage et observation avant cette étude en avril 2018, observateur Benoit Villette.

Affluent de la crique Diamant, montagne de Kaw :

Tout petit criquet forestier à faible débit (prospection 2020 en saison sèche) qui se jette dans la crique Diamant. Cette station faisait partie de l'étude menée par Hugo Reizine en 2016. A

l'époque, seul un individu y avait été détecté. Dernier passage et observation avant cette étude en mai 2016, observateur Hugo Reizine.

- Site d'absence « théorique » de l'espèce (non confirmée par des données récentes) en amont de l'échantillonnage ADNe
 - Sites de présence historique de l'espèce sans nouveau contact depuis des années

Criquet du sentier botanique de la réserve naturelle Trésor :

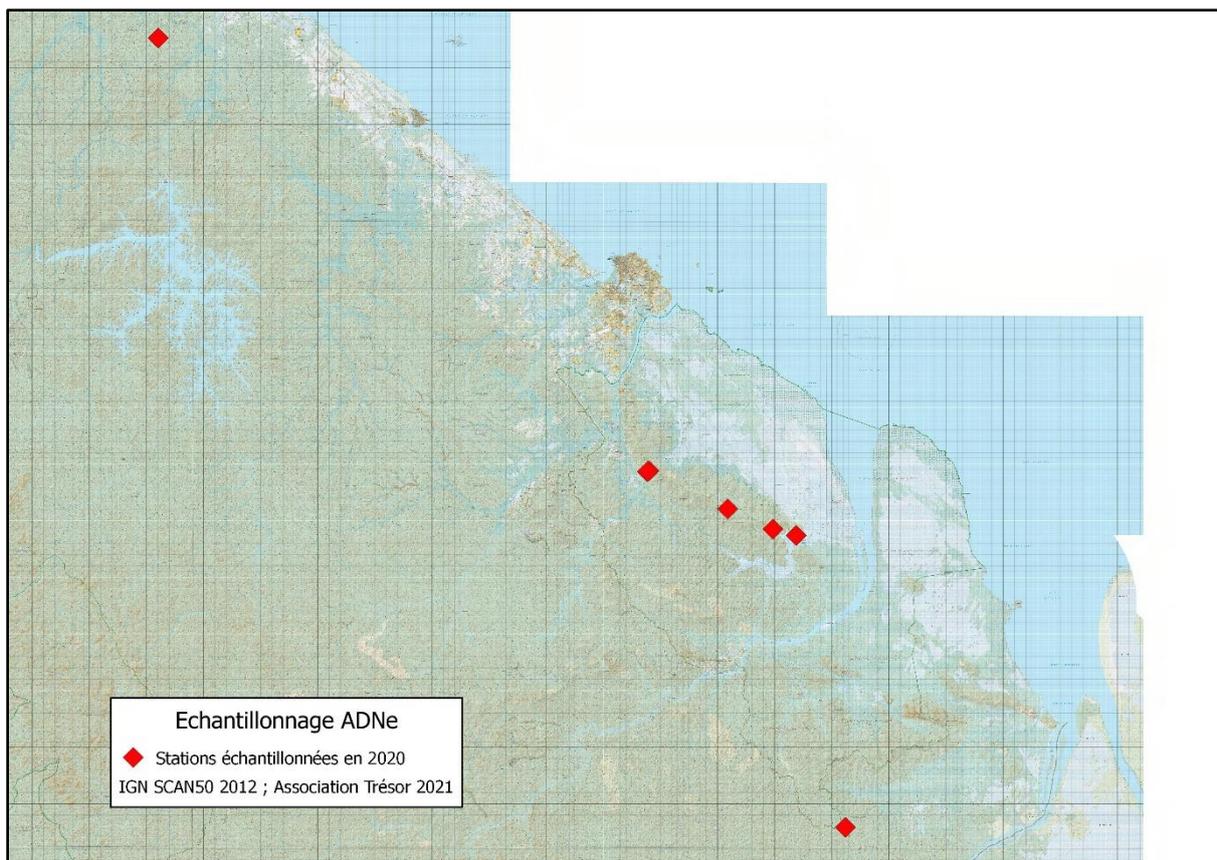
Plusieurs mentions dont certaines avec documents photographiques, enregistrées au début des années 2000 sur le petit criquet qui coule en saison des pluies en bas du sentier botanique de la réserve. De nombreux passages et prospections ciblées n'ont pas permis de retrouver l'espèce sur ce secteur. Dernière observation en 2004, observateur Antoine Fouquet.

Crique du sentier des roches gravées sur la montagne Favard, réserve naturelle de Kaw-Roura :

Cette crique forestière traverse à mi-parcours le sentier des roches gravées. Des individus ont été observés il y a plusieurs années à ce niveau mais depuis, l'espèce n'a pas été de nouveau détectée. Des prospections ciblées et soutenues (obs. pers. ; Reizine, 2016) n'ont pas permis de redécouvrir *Anomaloglossus blanci* dans ce secteur. Dernière observation en 2009, observateur Elodie Courtois.

- Site d'absence de l'espèce (hors de son aire de répartition connue) en amont de l'échantillonnage ADNe

Anomaloglossus blanci est endémique du quart Nord-Est de la Guyane et atteint la limite de sa répartition vers l'ouest sur les massifs de Roura/Régina (montagne de Kaw, montagne des petites tortues, monts Cacao et montagne Maripa). Un site témoin a donc été retenu dans le protocole très au-delà de cette limite théorique : le sentier de Saint-Elie, commune de Sinnamary. En plus de s'assurer par la distance d'exclure *A. blanci*, ce site permettait néanmoins de faire un échantillonnage sur un cours d'eau où la présence de l'espèce sœur, *Anomaloglossus surinamensis*, est connue afin d'évaluer sa détection sur le même principe d'ADNe.



Carte 2. Les points représentés sur cette carte correspondent aux différentes stations échantillonnées en fin d'année 2020. Le point le plus extrême vers le Nord-Ouest correspond à la station de Saint-Elie hors de l'aire de répartition de l'espèce.

2.2.2 Recherche des individus sur le terrain

Pour actualiser les données de présence d'*A. blanci* sur les sites étudiés, une recherche active visuelle et auditive de l'espèce a été réalisée lors de l'échantillonnage de l'ADNe sur chaque station de prélèvement. En parallèle un inventaire non exhaustif des autres espèces d'amphibiens a également été réalisé. Ces données de terrain permettent également de pouvoir confronter les méthodes et d'interpréter les résultats issus de l'analyse ADNe.

2.2.3 Protocole d'échantillonnage de l'ADNe

L'espèce ciblée vivant à proximité directe des cours d'eau, la récolte d'ADN environnemental s'est faite à partir de prélèvements d'eau.

Tous les prélèvements ont été réalisés au contact direct de populations d'anomaloglosses lorsqu'ils étaient présents (en général dans la population même). Pour chacune des stations, deux échantillons ont été systématiquement prélevés. L'échantillonnage s'est déroulé au mois de novembre 2020.

Afin d'évaluer la distance de détection, un dernier relevé a été réalisé en aval (quelques centaines de mètres) de la population connue de la crique Blanci sur les parties basses au pied de la montagne. Cette station est située au-delà du point de rencontre des criques

Blanci et du sentier botanique où il ne devrait *a priori*, pas y avoir d'*A. blanci* à proximité. Le but étant de voir si de l'ADN pouvait encore être retrouvé à une plus grande distance du noyau de population.

Le principe d'échantillonnage est de filtrer un certain volume d'eau qui contient le matériel génétique présent dans l'environnement. Le dispositif et la méthode de filtration sont ceux proposés par la société SPYGEN avec son kit VigiDNA RW2 pour milieu aquatique courant. Le matériel de prélèvement comprend un tuyau avec crépine à relier à une capsule de filtration (maillage de 0,45 μm) et une solution tampon pour la conservation de l'échantillon. Chaque pièce est conditionnée dans un emballage stérile ouvert seulement lors de la manipulation et à usage unique (pour limiter les contaminations en particulier d'un site à un autre). Le passage de l'eau à travers le filtre se fait par action mécanique à l'aide d'une pompe Vampire Sampler. Pour s'assurer d'avoir une concentration suffisante en ADN retenu par le filtre, la filtration de l'eau dure 30 min et, idéalement, à puissance maximale (1L/min environ) correspondant à 30 L d'eau filtrée. A la fin de la manipulation, une solution tampon est ajoutée dans la capsule de filtration pour préserver l'ADN dans le temps (pas plus d'un mois idéalement). Une fois référencée, elle est ensuite envoyée au laboratoire d'analyses SPYGEN qui extrait l'ADN contenu dans le filtre et le compare à des données bio-informatiques (bases de référence) afin d'identifier les espèces.



Figure 4. Filtration sur la station de Saint-Elie (© JF. SZPIGEL).

Deux bases de référence d'ADN ont été utilisées dans le cadre de cette étude : une base Vertébrés, déjà existante et une base *Amphibiens*, créée spécifiquement dans le cadre de ce projet par le laboratoire Évolution et Diversité Biologique du CNRS de Toulouse. La base Vertébrés contient également des séquences d'ADN des espèces d'amphibiens de Guyane. L'utilisation de deux bases de référence permet d'optimiser la détection et de tester la puissance de détection de ces deux bases.

2.3 Résultats

2.3.1 Actualisation des données de présence d'*Anomaloglossus blanci* en 2020 sur le terrain.

Des spécimens ont pu être confirmés sur les stations crique Blanci (RNR Trésor), crique Diamant et crique Patawa (RNN de Kaw-Roura). Aucun spécimen n'a été retrouvé sur le sentier des roches gravées (RNN de Kaw-Roura), le criquot du sentier botanique et le corridor 7.

Cette absence sur la station du corridor 7 est autant surprenante qu'inquiétante. En 2016, l'espèce était présente en abondance relativement élevée et était facile à détecter, au chant comme à la vue (H. Reizine comm. pers.). A trois observateurs et après une longue et minutieuse phase de recherche, aucun individu n'a été observé en 2020. Sur les autres stations, où des contacts ont été réalisés lors de cette étude, l'espèce avait été rapidement confirmée même sur les sites considérés comme de faible abondance.

A noter aussi que le même jour, dans le même secteur, la visite d'un autre criquot, où les études de 2016 avaient aussi confirmé la présence d'un grand nombre d'individus (corridor 5), n'a pas permis de retrouver l'espèce.

Sur la station du sentier de Saint-Elie, hors de la répartition naturelle d'*A. blanci*, ce dernier était naturellement absent et *Anomaloglossus surinamensis* était abondant en amont de la station de prélèvement.

2.3.2 Détection d'*Anomaloglossus blanci* par l'ADN environnemental

La société SPYGEN a transmis à l'association Trésor les résultats d'analyses sous tableurs (Annexes 1 et 1bis) avec la liste des espèces retrouvées sur les différents sites prospectés selon les bases de références utilisées.

La détection d'*Anomaloglossus blanci* par l'ADN environnemental s'est révélée peu convaincante, en effet sur les trois sites (criques Blanci, Diamant, et Patawa) où l'espèce a été confirmée les jours des filtrations, seul un des deux prélèvements de la station Diamant a permis de détecter l'espèce à partir de la base de référence Amphibiens, soit 1 détection sur 6 prélèvements (en comptant les répliques). Sur les autres sites étudiés, aucune détection de l'espèce n'est ressortie des analyses. La non-détection sur les stations de la crique Blanci ne permet pas de conclure sur l'évaluation de la distance de détection.

A noter également que l'analyse via la base de référence Vertébrés n'est pas suffisamment précise car elle ne permet pas de distinguer les différentes d'espèces du groupe dont *A. surinamensis*. L'utilisation de cette base de référence pour la détection d'*A. blanci* ne semble pas adaptée, contrairement à la base *Amphibiens*, plus précise *a priori*.

Les ambitions émises et espérées en amont du projet ne sont malheureusement pas satisfaites et la technique de l'ADN environnemental, telle que réalisée dans le cadre de cette étude, n'est pas envisageable pour permettre la détection voire le suivi d'*Anomaloglossus blanci* et par extension, on peut considérer que ça serait aussi le cas pour les deux autres espèces d'anomaloglosses très proches (*A. degranvillei* et *A. dewynteri*) et dont les enjeux en matière de connaissance et de conservation sont tout aussi importants.

Aux vues de ces résultats, il est également difficile d'actualiser les données de présence ou d'absence d'*A. blanci* à partir de l'ADNe. Les efforts de prospections effectués lors des jours de prélèvements se sont cantonnés à la station. Il est tout à fait possible que des individus étaient présents à proximité, mais non détectés.

2.3.3 Détection des autres espèces d'amphibiens par l'ADNe

Ici, les résultats sont aussi mitigés. Si certaines espèces ont effectivement été confirmées grâce à leur ADN (au moins sur certains sites), d'autres restent manquantes pourtant détectées visuellement ou via les chants. On note également des détections d'espèces dont le lien direct avec le cours d'eau est censé être nul (cas des *Pristimantis*, d'*Osteocephalus oophagus* et du *Leptodactylus pentadactylus*).

Un point important est à souligner cependant. Sur le site « corridor 7 » on note la détection de *A. baeobatrachus*/*A. cf. baeobatrachus. A. cf. (ou aff.) baeobatrachus*, une « espèce » dont l'écologie est très similaire à celle d'*A. blanci* (espèce ripicole qui reste proche des cours d'eau) bien présente le jour du prélèvement et qui semble avoir été bien détectée par l'approche ADNe (elle n'a été physiquement présente que sur cette station).

De la même manière, sur la station « Saint-Elie », l'ADN de l'espèce sœur, *Anomaloglossus surinamensis*, semble aussi avoir été bien détecté via la méthode de l'ADNe (comme pour le cas précédent, c'est le seul endroit où cette espèce était physiquement présent).

Face à ces résultats vis-à-vis des espèces du genre *Anomaloglossus* en incluant la seule donnée positive d'*Anomaloglossus blanci* sur la station Diamant et d'après l'expérience acquise sur terrain lors des expertises, une première interprétation semble dégager un point commun entre ces trois sites « positifs ». Il s'agit des caractéristiques physiques des cours d'eau prospectés qui sont tous les trois de petites dimensions et avec des débits et volumes relativement faibles (d'autant plus qu'ils ont été faits en saison sèche). En ce qui concerne les autres criques (qui restent cependant de tailles modestes), des volumes plus grands ont peut-être trop dilué l'ADN des espèces recherchées.

Cette observation reste tout de même assez hypothétique du fait d'un nombre d'échantillons réduit et même si elle se confirmait, ne changerait pas la problématique de détection de l'espèce visée dans les cours d'eau où elle vit.

2.4 Conclusions de la phase 1 *Anomaloglossus blanci*

Cette première phase test sur la détection d'une espèce à forts enjeux par l'ADNe portait beaucoup d'espoirs notamment pour une utilisation élargie à d'autres espèces menacées de disparition comme *Anomaloglossus degranvillei* et *Anomaloglossus dewynteri*. Cette méthode s'est avérée finalement peu convaincante compte tenu du protocole mis en place et des résultats obtenus. La méthode de détection la plus efficace reste donc pour le moment les prospections directes d'experts sur les habitats adéquats. Elle conserve cependant des contraintes non négligeables en matière de moyens (mobilisation des experts, effort de prospection important, accessibilité limitée, faibles densités des populations).

Quelles nouvelles pistes restent envisageables pour approfondir les tests de détection des *Anomaloglossus* du groupe *degranvillei* à partir de l'ADNe ?

➤ Baisser la Best ID

Pour confirmer la présence d'une espèce par l'ADN environnemental, un taux de correspondance/d'homogénéité entre les séquences des ADN extraits des filtres et celles des bases de référence (la Best ID) est pris en compte. Plus ce paramètre est élevé, plus les correspondances entre les séquences d'ADN présentes dans l'échantillon environnemental et les séquences d'ADN des bases de référence sont fiables. Dans le cas de la première analyse, elle était fixée à 98%. Baisser ce paramètre permet d'identifier des espèces dont leur séquences d'ADN peuvent être légèrement dégradées ou différentes de la base de référence, mais avec une fiabilité plus faible.

Une seconde analyse a tout de même été réalisée avec une Best ID baissée à 90% mais les résultats concernant l'espèce ciblée n'ont pas évolué. Cette solution n'est donc pas efficace. On note cependant l'apparition du genre *Rhinatrema* absent de la première analyse (Annexe 1). C'est une espèce de gymnophione qui se reproduit à proximité des petits cours d'eau forestiers et dont les larves sont aquatiques.

➤ Augmenter la durée des filtrations

Les filtrations ont systématiquement duré 30 minutes. Les ruisseaux où sont présents les *Anomaloglossus* possèdent une eau très pure quasiment exempte de particules en suspension ce qui autoriserait d'augmenter significativement la durée de filtration sans encombrer le filtre. Ceci pourrait donc permettre de filtrer un volume d'eau plus important et peut être augmenter la quantité d'ADN récoltée. Dans le cadre d'un test, il serait donc envisageable de faire tourner la pompe Vampire Sampler pendant 45 minutes/1 heure (en bloquant le processus d'activation de la pompe pour la rendre autonome et ne pas mobiliser une personne 2 fois 1 heure en cas de réplica). N'ayant plus de matériel à disposition, l'augmentation de la durée de filtration n'a pas été testée.

➤ Tenter une recherche de l'espèce par amorces spécifiques

L'utilisation des bases de référence repose sur des fragments d'ADN des espèces séquencées. La base de référence Vertébrés est une base multi-espèces dont les amphibiens. La base de référence Amphibiens semble plus précise, mais reste une base multi-espèces. Il est possible d'augmenter la précision de la détection en ciblant la recherche que d'une seule espèce à partir d'amorces spécifiques. Cette technique ne fait plus appel au metabarcoding et aux bases de données pluri-espèces. L'association Trésor en partenariat avec le LEEISA Guyane et le laboratoire EDB ont initié des échanges pour développer les méthodologies et tester cette approche.

3 Phase 2 : Etude de la détection d'espèces d'amphibiens par l'ADNe dans les mares temporaires de Guyane

3.1 Contexte et objectifs

Les mares temporaires qui se remplissent d'eau lors des premières pluies de la saison humide, constituent des milieux originaux indispensables à la survie de nombreuses espèces animales en particulier quelques amphibiens. Ces habitats temporaires, qui abritent moins de prédateurs que les milieux aquatiques permanents, représentent le site idéal pour la reproduction de nombreuses espèces d'anoures. Parmi celles-ci, certaines se reproduisent de manière explosive, c'est à dire lors de très courtes fenêtres temporelles et rassemble plusieurs milliers d'individus de parfois une dizaine d'espèces distinctes. Ces communautés dépendent donc étroitement d'un habitat très localisé et de conditions météorologiques très particulières.

Afin d'étudier les communautés d'amphibiens, ce sont généralement des méthodes traditionnelles qui sont employées. L'étude morphologique des adultes ou des juvéniles (têtards) permet l'identification des espèces observées. Cependant, dans le cadre d'une étude des espèces à reproduction explosive, ces méthodes sont fortement limitées par le caractère ponctuel du phénomène. En effet, l'absence d'observateur lors de ces événements rend difficile la réalisation d'un inventaire exhaustif. Par ailleurs, à l'issue de la reproduction, ces espèces désertent les lieux devenant alors pour la plupart très difficiles, voire presque, impossible à observer. Ces espèces font alors souvent défaut lors des inventaires herpétologiques réalisés en dehors de cet événement.

Ces communautés dépendent étroitement d'un habitat très localisé et de conditions météorologiques très particulières. Elles sont donc extrêmement sensibles à la destruction de ces habitats et probablement aussi aux conséquences du dérèglement climatique. La plupart de ces espèces sont aujourd'hui intégralement protégées avec habitats sur le territoire guyanais (arrêté du 20 novembre 2020, article 3 protection avec habitat). Dès lors, il devient important de trouver des alternatives à l'observation directe de spécimens sur le

terrain lors des inventaires de biodiversité que ce soit à des fins de connaissances comme de protection/conservation de ces espèces à enjeux.



Figure 5. *Trachycephalus coriaceus* adulte et imago à la mare Blanc Marty (© G. DECALF)



Figure 6. Reproduction explosive à la mare Blanc Marty (© G. DECALF)

Cependant, si les adultes désertent rapidement les sites de reproduction, leurs pontes et leurs têtards vont occuper la zone au moins quelques semaines le temps d'effectuer leur métamorphose. Le metabarcoding semble donc être une alternative intéressante pour l'étude de ces espèces.

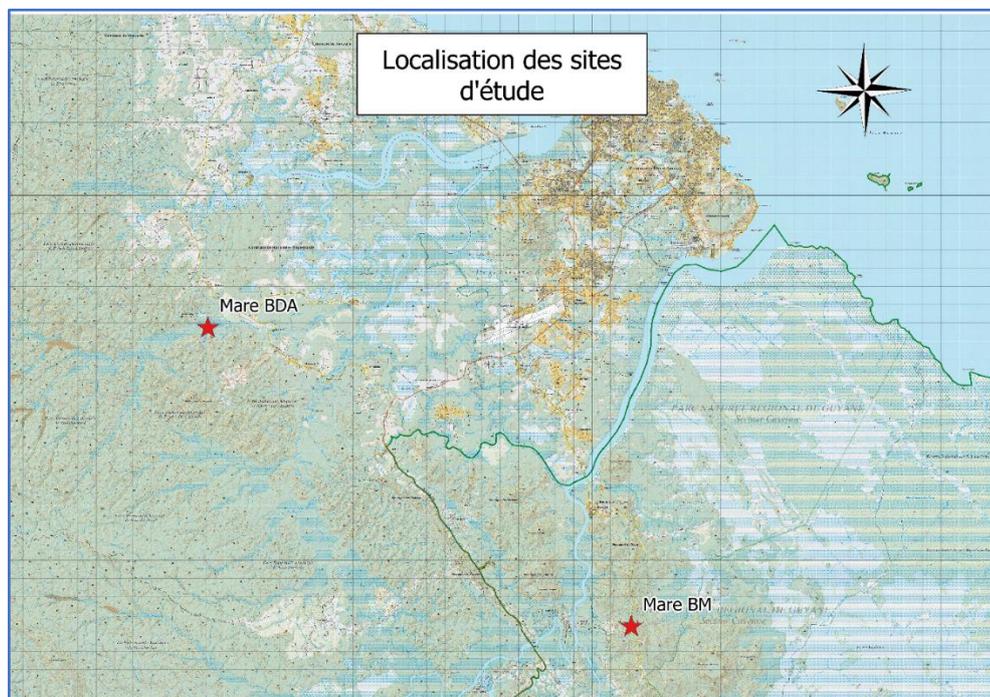
A l'instar de l'étude sur *Anomaloglossus blanci*, l'association Trésor a testé la technique basée sur l'ADN environnemental (ADNe) pour détecter des espèces d'amphibiens des mares temporaires mais aussi d'évaluer cette détection dans le temps en dehors du phénomène de reproduction explosive. Si celle-ci s'avère robuste, cette méthode de détection pourrait permettre d'étudier et de suivre ces communautés d'espèces en dehors du phénomène très ponctuel de la reproduction explosive.

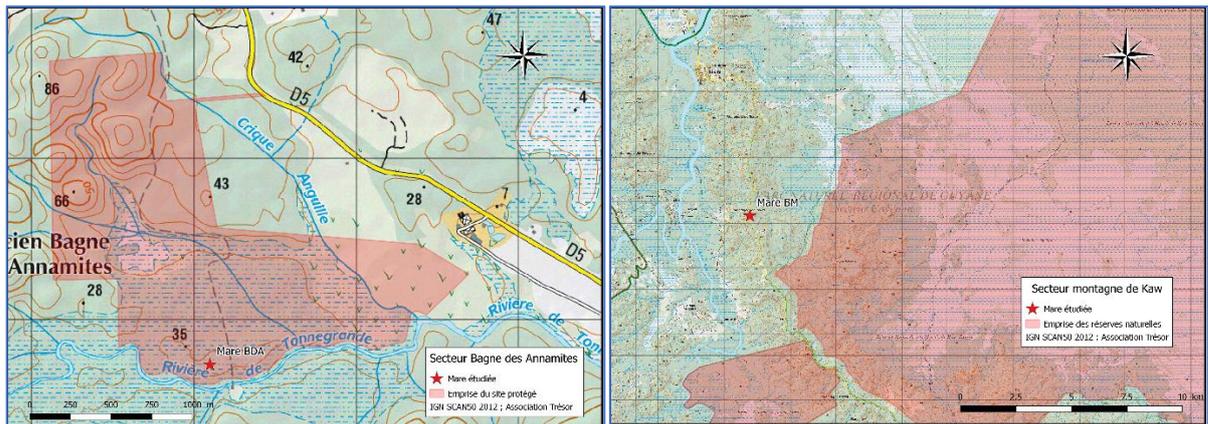
Afin de comparer les méthodes de détection, une recherche visuelle et auditive des espèces présentes sur les sites d'étude (inventaire classique exhaustif) viseront à confirmer les données de présence des espèces. Pour finir, les analyses permettront également d'évaluer la détectabilité des autres espèces d'amphibiens et de comparer les résultats issus des analyses ADNe avec la liste des espèces connues et observées par le biais des méthodes classiques.

3.2 Méthodologie

3.2.1 *Sites d'étude*

Deux mares différentes connues pour héberger un cortège d'espèces à reproduction explosive ont été sélectionnées dans le cadre de cette étude (carte n° 3) : la mare dite Blanc Marty (BM) située sur la montagne de Kaw, commune de Roura et la mare dite Bagne des Annamites située sur le site protégé, et géré par l'association Trésor, du bagne des Annamites, commune de Montsinery-Tonnégrande. Elles ont toutes deux été bien inventoriées en amont de l'étude et leurs peuplements en amphibiens sont bien documentés.





Carte 3. Localisation des mares Blanc Marty (BM) et Bagne des Annamites (BDA) étudiées.

3.2.2 Recherche des espèces présentes sur le terrain

En parallèle de l'échantillonnage d'ADNe, un inventaire classique et exhaustif des mares étudiées a été réalisé ciblant d'abord les amphibiens mais aussi les autres espèces de vertébrés observées sur la zone. Une abondance de chaque espèce d'amphibien a été également estimée afin de savoir si l'abondance influence la détection de l'espèce par la méthode génétique. Des passages ont aussi été réalisés hors des jours de prélèvements pour assurer une veille permettant aux agents d'être présents lors de l'événement et affiner la liste des espèces présentes. Ces données de terrain permettront de pouvoir confronter les méthodes et d'interpréter les résultats issus de l'analyse ADNe.

3.2.3 Protocole d'échantillonnage de l'ADNe

L'échantillonnage de l'ADNe a été réalisé selon la méthodologie proposée par SPYGEN à l'aide de son kit SW1 pour milieu aquatique stagnant. Chaque pièce est conditionnée dans un emballage stérile ouvert seulement lors de la manipulation et à usage unique. Il consiste en la récupération de 2 L d'eau de la mare, à l'aide d'une louche, dans un sac prévu à cet effet qui sera progressivement passé dans une capsule contenant le filtre (maillage de 0,45 μm) à l'aide d'une seringue de 100 mL. Sur chacun des prélèvements, les 2 L d'eau sont intégralement filtrés. A la fin de la manipulation, une solution tampon est ajoutée dans la capsule du filtre pour préserver l'ADN.

A la fin de la manipulation, une solution tampon est ajoutée dans la capsule de filtration pour préserver l'ADN dans le temps (pas plus d'un mois idéalement). Une fois référencée, elle est ensuite envoyée au laboratoire d'analyses SPYGEN qui extrait l'ADN contenu dans le filtre et le compare à des données bio-informatiques (bases de référence) afin d'identifier les espèces.

Les deux bases de référence citées précédemment dans la phase 1 (bases Vertébrés et Amphibiens) ont été également utilisées pour les analyses.

Quatre sessions d'échantillonnage ont été programmées sur chaque mare réparties sur différents intervalles de temps à partir des premiers phénomènes de reproductions

massives lors du remplissage des mares. Un seul prélèvement est effectué par session (pas de réplica). Il est réalisé systématiquement au même endroit. L'échantillonnage s'est déroulé de décembre 2021 à janvier 2022.

Des prospections régulières en amont de l'échantillonnage ont été réalisées afin d'assurer une veille sur le remplissage des mares et de ne pas passer à côté de l'évènement.

L'organisation des prélèvements d'ADNe a été établie de la manière suivante pour chacune des mares :

Prélèvement 1 à J0/J+1 lors du remplissage de la mare et du phénomène des reproductions explosives : Dans le cas de la mare Blanc Marty (BM), les reproductions massives ont commencé le 30 novembre 2021 et ont repris tardivement dans la soirée du 1 décembre, date du prélèvement 1. L'échantillonnage d'ADNe a été réalisé très tard dans la soirée bien après l'installation des amphibiens et des premières pontes.

Concernant la mare du baigne des Annamites (BDA), le prélèvement 1 n'a pas pu être réalisé durant la soirée des reproductions explosives malgré la veille assurée sur site. L'échantillonnage d'ADNe a donc été réalisé le lendemain de la date théorique du phénomène soit le 2 décembre 2021.

Prélèvement 2 à J+7 : Toutes les pontes des espèces à reproduction explosive ont éclos et leurs têtards ont largement commencé leur développement. Ils sont dominants dans la composition des peuplements en larves de la mare. Les têtards des espèces nidicoles, dont les pontes sont émises avant la mise en eau sont aussi abondants (*genre Leptodactylus*). Les autres espèces, dont la reproduction et la présence d'adultes sur site sont liées à la mare explosive mais s'étalent dans le temps, restent bien présentes et actives et les premières pontes sont observées. Cependant peu voire pas de têtard de ces dernières n'a été observé dans l'eau.

Prélèvement 3 à J+20 : Les premières émergences des espèces ayant une reproduction explosive sont observées. Chez ces espèces, la métamorphose est étonnement rapide. La reproduction massive n'ayant eu lieu que lors de deux soirées (cas de la mare BM), tous les têtards de ces espèces sont quasiment au même stade de développement malgré les différentes espèces. Ceux d'espèces installées plus durablement sur la mare commencent à être facilement observés.

Prélèvement 4 à J+50 : Plus aucune espèce, adulte comme larve, des espèces à reproduction explosive n'est présente dans la mare. Seul le cortège « permanent » est encore bien présent.

3.2.4 *Suivi acoustique*

Sur les deux mares des enregistreurs sonores automatiques et programmables (SM4 de wildlife acoustics) ont été installés sur toute la durée de l'étude. Ils ont enregistré 2 minutes de l'ambiance sonore de la mare toutes les heures entre 14:00 et 05:00. Cela permet de

détecter d'éventuels nouveaux phénomènes de reproductions massives qui peuvent parfois survenir après un premier évènement.



Figure 7. Installation de l'enregistreur sonore à la mare du bagne des Annamites (© M. AUCOURD)

3.3 Résultats

La société SPYGEN a transmis les résultats sous forme de tableurs (Annexes 2 et 2 bis) avec la liste des espèces retrouvées sur les différents sites prospectés selon les bases de référence utilisées.

En matière de simple détection, les tableaux suivants (Tableau 1 et Tableau 2) dressent la comparaison entre les espèces d'amphibiens contactées (visuels et/ou auditifs, adultes et/ou têtards) sur site les jours des filtrations et les détections issues de l'ADN environnemental à partir des bases de référence.

Ces tableaux incluent également les espèces observées lors de visites complémentaires mais non détectées les journées de prélèvement (ADNe et observations sur place).

La mare Blanc Marty sur la montagne de Kaw

Les reproductions explosives ont eu lieu en deux temps sur la mare BM, un premier épisode le 30 novembre 2021 puis un second tard dans la nuit du 1^{er} décembre 2021 (même si certaines espèces sont restées très actives depuis le premier soir comme les *Chiasmocleis shudikarensis* et les *Dendropsophus minutus*), le jour du prélèvement 1. Sur les deux soirées, le cortège et l'abondance des amphibiens étaient similaires. Les filtrations ont été faites une bonne demi-heure après la reprise du gros des activités.

Tableau 1 : Résultats de la détection des espèces issues des inventaires classiques et de l'ADNe sur la mare BM. Les espèces en **gras** correspondent à des espèces fréquentant les mares pour leur reproduction ; **X**, espèce présente et identifiée selon la méthode indiquée en colonne ; **X¹**, espèce identifiée uniquement selon la base de référence Vertébrés.

Espèces mare montagne de Kaw	Dates des prospections ADNe							
	01/12/2021		08/12/2021		21/12/2021		20/01/2022	
	Contact <i>in situ</i>	Contact ADNe	Contact <i>in situ</i>	Contact ADNe	Contact <i>in situ</i>	Contact ADNe	Contact <i>in situ</i>	Contact ADNe
Rhinella castaneotica			x		x			
Rhinella margaritifera								
Dendropsophus leucophyllatus	x		x		x	x		x
Dendropsophus melanargyreus		x	x	x	x	x		x
Dendropsophus minutus	x	x	x	x	x	x	x	x
Dendropsophus sp. 1	x		x		x		x	x
Osteocephalus oophagus								
Osteocephalus taurinus	x	x				x		
Scinax sp. 2	x	x ¹				x ¹		
Scinax ruber	x	x ¹					x	
Trachycephalus coriaceus	x	x	x	x	x	x		x
Callimedusa tomopterna	x	x	x	x ¹	x	x	x	x
Phyllomedusa vaillantii			x		x			
Adenomera andreae	x		x		x		x	
Leptodactylus knudseni	x	x	x	x	x	x	x	x
Leptodactylus mystaceus	x	x	x	x	x	x		
Leptodactylus nesiotus	x							
Pristimantis chastonotus								
Pristimantis inguinalis								
Pristimantis zeuctotylus								
Ceratophrys cornuta	x	x	x	x	x	x		
Chiasmocleis shudikarensis	x	x	x	x	x	x		x

La base de référence *Amphibiens*, qui semble la plus complète et la plus efficace pour la détection des espèces par l'ADNe (cf résultats issus de la phase 1), a été privilégiée. Cependant pour quelques cas (x¹ dans le Tableau 1), seule la base *Vertébrés* a permis les détections de certaines espèces. D'une manière générale, il existe une assez bonne corrélation entre les détections par la méthode classique *in situ* et par celles de l'ADNe des amphibiens fréquentant la mare.

Pour les espèces à reproduction explosive, les détections via les analyses d'ADNe restent bonnes tant que les têtards sont présents dans le milieu et que les émergences de ces espèces sont présentes. Ces dernières ont été observées lors du prélèvement du 21/12/2021 (prélèvement 3 J+20), et ne devaient plus être présentes au bout de quelques jours à partir de cette date. Cependant, pour quelques espèces (*Chiasmocleis shudikarensis*, *Dendropsophus melanargyreus* et *Trachycephalus coriaceus*), des détections ont été confirmées par l'ADNe une trentaine de jours après la dispersion des imagos (soit à J+50). L'enregistreur automatique installé sur site n'a pas relevé de nouvel épisode de reproduction pour ces espèces sur la mare.

Autre point notable pour quelques espèces, c'est leur faible, voire leur non-détection par l'ADNe malgré leur présence régulière sur site. *Dendropsophus sp.1*, pourtant observé systématiquement lors des visites sur le site, n'a été détecté par la présence de son ADN que lors du dernier prélèvement. *Phyllomedusa vaillantii*, dont plusieurs individus fréquentaient la mare lors de différents passages, n'a de son côté jamais été mis en évidence par l'ADNe. Une explication pourrait venir des mœurs de ces deux espèces. Strictement arboricoles, elles ne vont jamais à l'eau pour leur reproduction, les pontes étant aériennes, seuls leurs têtards

tombent dans l'eau à l'éclosion et se retrouvent réellement dans la mare. La faible détection de ces espèces est quand même surprenante car cela revient à penser qu'aucune reproduction n'ait eu lieu sur ces laps de temps alors que l'activité de chant des mâles (et donc a fortiori de reproduction) était régulière et soutenue.

Enfin, et contrairement à certains résultats obtenus lors de l'étude sur l'*A. blanci* en milieu courant, les espèces dont les liens avec la mare (voir avec un milieu aquatique) sont nuls comme *Adenomera* spp, *Pristimantis* spp. ou *Osteocephalus oophagus* n'ont pas du tout été détectées par l'approche ADNe bien qu'observées à proximité immédiate du plan d'eau.

3.3.1 La mare du baigne des Annamites sur Montsinéry-Tonnégrande

Cette mare n'a malheureusement pas pu être échantillonnée le soir théorique du phénomène des reproductions explosives qui aurait eu lieu dans la nuit du 30 novembre 2021. Le site a pourtant été visité le soir du 30 novembre, mais la mare n'était pas remplie et les conditions étaient assez sèches. Le lendemain matin (1^{er} décembre 2021), une seconde visite avait permis de voir que le centre de la mare s'était légèrement rempli mais surtout que de nombreuses pontes avaient été émises. Lors du retour de l'équipe le soir même, toute l'eau avait disparu et le prélèvement ADNe n'a pas pu être réalisé. Le site semble avoir été rapidement déserté par les espèces. Cependant, à l'instar de la région de Kaw, de forts épisodes pluvieux et tardifs ont arrosé le secteur la soirée du 1^{er} décembre 2021 et il est envisageable qu'un nouveau rassemblement important d'amphibiens ait eu lieu sur site comme sur la mare Blanc Marty. Le premier prélèvement n'a donc eu lieu que le 2 décembre 2021.

Les très fortes pluies ont cette fois-ci remplie la mare jusqu'à excédant, une grande partie de la zone aux alentours était inondée, potentiellement jusqu'à la crique Tonnégrande elle-même en crue et distante d'environ 200 m de la mare échantillonnée. L'influence de celle-ci n'est donc pas à exclure au niveau même de la mare où les prospections du soir ont permis l'observation de poissons characiformes, habituellement présents uniquement dans des eaux permanentes (ne supportant pas des périodes d'assec).

Les connaissances sur les peuplements d'amphibiens de cette mare sont donc issues des prospections des années précédentes et des observations faites lors des passages suivants.

Tableau 2 : Résultats de la détection des espèces issues des inventaires « classiques » et de l'ADNe sur la mare BDA. Les espèces en **gras** correspondent à des espèces fréquentant les mares pour leur reproduction ; X : espèce présente et identifiée selon la méthode indiquée en colonne ; x¹ : uniquement selon la base de référence Vertébrés ; XX : des imagos du genre *Osteocephalus* ont été observés le soir du prélèvement réalisé le 22 décembre. A ce stade, il est impossible de distinguer les deux espèces (*O. taurinus* et *O. lepieurii*) présentes sur la mare.

Espèces mare baigne des Annamites	Dates des prospections ADNe							
	02/12/2021		09/12/2021		22/12/2021		21/01/2022	
	Contact <i>in situ</i>	Contact ADNe	Contact <i>in situ</i>	Contact ADNe	Contact <i>in situ</i>	Contact ADNe	Contact <i>in situ</i>	Contact ADNe
Allophryne ruthveni	x	x		x	x	x	x	x
Rhinella castaneotica		x					x	
Boana calcarata					x		x	
Boana semilineata		x						
Dendropsophus minutus	x							
Dendropsophus sp. 1	x	x	x		x		x	
Osteocephalus lepieurii		x		x	xx	x		
Osteocephalus oophagus	x				x			
Osteocephalus taurinus		x		x	xx	x	x	
Scinax sp. 2	x	x		x	x		x	
Phyllomedusa vaillantii	x		x		x			
Adenomera andreae								
Leptodactylus knudseni	x			x		x		
Leptodactylus mystaceus		x		x				
Leptodactylus rhodomystax			x		x	x	x	
Leptodactylus petersii					x			x
Pristimantis chiastonotus								
Pristimantis inguinalis	x							
Pristimantis sp.3	x							
Ceratophrys cornuta				x				
Chiasmocleis shudikarensis	x	x		x				
Ctenophryne geayi		x ¹						
Pipa pipa		x						

Comme pour la précédente mare, la base *Amphibiens* a été majoritairement utilisée pour les résultats présentés. La corrélation entre les détections par la méthode classique *in situ* et par celles de l'ADNe des amphibiens fréquentant la mare semble moins évidente.

Ici aussi, quelques données ne ressortent que depuis la base *Vertébrés* (*Ctenophryne geayi* notamment). Il est intéressant de noter que le ctenophryne comme *Boana semilineata* étaient inconnus de la mare et qu'ils n'ont jamais été observés lors de ces dernières prospections. Ils sont cependant présents non loin de là. *Boana semilineata* est une espèce fréquentant le bord des rivières où elle se reproduit. Elle est bien présente le long de la Tonnégrande. *Ctenophryne geayi* est une espèce qui fréquente les mares pour se reproduire de manière explosive. Elle est considérée comme très rare en Guyane et les sites de reproduction connus sont très peu nombreux. C'est une espèce qui semble fréquenter préférentiellement les mares en marge des cours d'eau et une population reproductrice est bien présente sur le site du baigne des Annamites à environ 500m de la mare étudiée. Ces données positives sont-elles issues des mouvements d'eau lors des débordements entre la mare et la rivière Tonnégrande autour de la date de filtration ?

La détection des espèces à reproduction explosive par l'ADNe est moins évidente que sur la mare de la montagne de Kaw.

Osteocephalus lepieurii semble avoir été bien détectée sur chacun des prélèvements réalisés lors de la présence théorique des têtards dans la mare (20 premiers jours).

A l'inverse, *Ceratophrys cornuta* qui aurait dû être détecté sur la même période, n'apparaît que sur un seul échantillon.

Dendropsophus sp.1 et *Phyllomedusa vaillantii*, espèces strictement arboricoles, ne sont ici aussi peu voire pas détectés par la méthode de l'ADN environnemental comme dans le cas des résultats de la mare Blanc Marty.

3.3.2 Détection des autres espèces sur les mares

La base *Vertébrés* apporte un complément d'information sur les espèces présentes dans les deux mares prospectées. Lors des relevés ADNe (comme sur les passages entre les sessions), l'ensemble des vertébrés hors amphibiens a été noté. L'inventaire terrain est loin d'être exhaustif mais les résultats obtenus apportent tout de même quelques informations. De nombreuses espèces de poissons ont été détectées par l'approche ADNe sur la mare du baignade des Annamites. Bien que quelques observations aient pu être faites lors des visites de terrain, aucun inventaire spécifique n'a été réalisé sur le site. Un seul élément nous permet de dire que toutes les espèces de poissons n'ont pas été relevés par l'ADNe avec l'observation en soirée d'un petit gymnote non identifié proche du site de prélèvement. Le seul gymnotiforme présent dans la liste des résultats transmis par le laboratoire SPYGEN est *Electrophorus electricus*.

Pour les autres groupes, il semblerait que la base *Vertébré* ne possède pas d'éléments d'information sur les taxons Reptiles et Oiseaux, uniquement détectés à partir d'une troisième base non considérée jusque-là (EMBL 142). Cette dernière semble cependant peu efficace, d'une part car elle est loin d'être exhaustive et d'autre part, par les détections d'espèces non présentes en Guyane (probablement une erreur commise avec des espèces proches présentes sur le territoire). Ce constat est partagé avec les résultats obtenus lors de l'étude en milieu courant.

3.4 Conclusion de la phase 2 Espèces à reproduction explosives

De manière générale, les résultats obtenus par l'échantillonnage ADNe des mares temporaires s'avèrent bien plus encourageants que ceux obtenus dans les milieux aquatiques courants. Si quelques interrogations subsistent (sous détection de certaines espèces), la détection des espèces à enjeux, avec une reproduction de type explosive et intégralement protégées sur le territoire, semblent concluantes tout du moins lorsque les têtards sont encore dans le plan d'eau et que les jeunes émergent de l'eau pour le site de la montagne de Kaw.

Pour le cas de cette mare, il est à noter que la détection de ces espèces via l'ADNe semble être efficace 20 jours après la date de la reproduction ce qui laisse des perspectives intéressantes dans le suivi écologique et la connaissance de ces habitats particuliers.

Pour la mare BDA, les résultats sont un peu plus mitigés. Cependant plusieurs points restent à souligner. Tout d'abord, par le fait que nous n'ayons pas pu assister aux reproductions explosives, notre appréciation de ce phénomène ne provient que des visites réalisées les

années précédentes. La comparaison entre les deux méthodes peut être biaisée, mais il semble que la détection des espèces à reproduction explosives via l'ADNe a également montré ses preuves pour cette mare. Ensuite, les débordements de la rivière et l'inondation du secteur ont sans doute eu un effet de lessivage et de dilution rendant l'ADN du milieu plus difficile à détecter.

Dans le cadre de ce projet, seul un prélèvement a été réalisé par session et toujours sur le même endroit. Dans le cas des plus grandes mares et/ou avec des problématiques de crues et débordements comme sur le site du baignade des Annamites, il serait peut-être judicieux de procéder à l'échantillonnage dans plusieurs endroits de la mare étudiée et ainsi permettre d'affiner l'expertise. La technique est relativement simple et rapide à mettre en place pour multiplier les stations d'échantillonnage tout autour d'une même mare sans trop alourdir le protocole reste tout à fait possible si les conditions budgétaires le permettent.

4 Conclusion générale

Ce projet innovant autour de la détection d'espèces d'amphibiens par de l'ADN environnemental se voulait avant tout servir de phase test à l'utilisation de cette nouvelle méthodologie dans des contextes maîtrisés sur le territoire guyanais. Les résultats obtenus sont contrastés. Si la détection d'ADN issus des échantillons réalisés lors de cette étude en milieu courant pour la recherche spécifique d'*Anomaloglossus blanci* s'est révélée peu convaincante, l'approche en milieu stagnant sur les mares temporaires semble nettement plus prometteuse. La détection des espèces à reproduction explosives dans le temps offre également de belles perspectives dans la connaissance et le suivi de ces milieux particuliers.

Dans le but d'affiner nos connaissances sur la détection des amphibiens fréquentant les mares guyanaises et de confirmer la robustesse de cette nouvelle méthode de détection, une nouvelle expertise similaire serait à envisager sur un autre point d'eau partageant des caractéristiques similaires (mare temporaire et cortège d'espèces à reproduction explosive).

Concernant la recherche d'une espèce sur les milieux courants, la technique de détection demande encore des améliorations. Par ailleurs, d'autres techniques peuvent être proposées en s'appuyant sur une technologie plus fine (amorces spécifiques) pour la détection des ADN issus des échantillons. Cet aspect est en cours d'élaboration avec Jérôme Murielle du laboratoire EDB de Toulouse et Mathieu Chouteau du LEEISA au CNRS Guyane.

D'une manière générale, ce projet permettra d'orienter les futures expertises sur les amphibiens guyanais par l'ADNe autant dans une phase de recherche et de connaissance des espèces fréquentant des mares temporaires, que dans le développement de nouvelles méthodologies pour l'étude d'espèces à enjeux forts de conservation comme les *Anomaloglossus* du groupe *degranvillei*. C'est d'autant plus pertinent dans ce dernier cas où un projet de Plan National d'Action est en cours de finalisation autour des espèces de ce groupe.

5 Annexes 1 et 1 bis : Résultats issus des analyses pour la détection d'*Anomaloglossus blanci* par l'ADN environnemental

ANNEXE 1 : Base Amphibiens



Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Amphibiens en milieu aquatique courant
 Association Trésor - DE200362 - 18 Mai 2021

En rouge les données n'apparaissant que lors de la Best ID à 90%

Classe	Ordre	Famille	Nom scientifique	Base de référence	Corridor 7 RN 2		Corridor 7 RN 2		Crique Blanci	
					SPY200010		SPY200011		SPY200005	
					Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Bufonidae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella castaneotica</i>	GUYANE			1	102		
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Centrolenidae	<i>Vitreorana oyampiensis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Allobates femoralis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus baeobatrachus / Anomaloglossus cf. baeobatrachus</i>	GUYANE	1	82	2	398		
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus blanci</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus surinamensis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hylidae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana boans</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana cinerascens</i>	GUYANE	3	275				
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana dentei</i>	GUYANE			1	34		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus sp.1</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hyla helenae</i>	GUYANE	1	146				
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus sp.</i>	GUYANE			1	46		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus / Osteocephalus taurinus</i>	GUYANE					1	568
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus</i>	GUYANE	1	960	2	150		
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylidae</i>	GUYANE	2	190	6	462		
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Adenomera sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	GUYANE	1	103	1	13		
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.</i>	GUYANE			1	22		
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.3</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis zeuctotylus</i>	GUYANE						
Amphibia	Gymnophiona	Caeciliidae	<i>Caecilia sp.</i>	EMBL	5	716				
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatreumatidae</i>	EMBL	5	436	5	133		
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatrema sp.</i>	EMBL					9	4 540

ANNEXE 1 : Base Amphibiens



Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Amphibiens en milieu aquatique
 Association Trésor - DE200362 - 18 Mai 2021

En rouge les données n'apparaissant que lors de la Best ID à 90%

Classe	Ordre	Famille	Nom scientifique	Base de référence	Crique Blanci		crique Diamant station Hugo		crique Diamant station Hugo	
					SPY200022		SPY200001		SPY200020	
					Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Bufonidae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella castaneotica</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	GUYANE	1	181				
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Centrolenidae	<i>Vitreorana oyampiensis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Allobates femoralis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus baeobatrachus / Anomaloglossus cf. baeobatrachus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus blanci</i>	GUYANE			2	205		
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus surinamensis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hylidae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana boans</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana cinerascens</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana dentei</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus sp.1</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hyla helenae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus / Osteocephalus taurinus</i>	GUYANE	1	38				
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylidae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Adenomera sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.3</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis zeuctotylus</i>	GUYANE						
Amphibia	Gymnophiona	Caeciliidae	<i>Caecilia sp.</i>	EMBL						
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatreumatidae</i>	EMBL						
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatrema sp.</i>	EMBL	11	974	9	14 800	8	6 753

ANNEXE 1 : Base Amphibiens



Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Amphibiens en milieu aquatique
 Association Trésor - DE200362 - 18 Mai 2021

En rouge les données n'apparaissent que lors de la Best ID à 90%

Classe	Ordre	Famille	Nom scientifique	Base de référence	crique sentier		crique sentier		crique sentier Favard (roches gravées)	
					SPY200009		SPY200023		SPY200008	
					Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Bufonidae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella castaneotica</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Centrolenidae	<i>Vitreorana oyampiensis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Allobates femoralis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus baeobatrachus / Anomaloglossus cf. baeobatrachus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus blanci</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus surinamensis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hylidae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana boans</i>	GUYANE					3	689
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana cinerascens</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana dentei</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus sp.1</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hyla helenae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus / Osteocephalus taurinus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylidae</i>	GUYANE	7	309	4	94		
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Adenomera sp.</i>	GUYANE	12	42 627	12	11 765		
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	GUYANE					2	559
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.3</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis zeuctotylus</i>	GUYANE						
Amphibia	Gymnophiona	Caeciliidae	<i>Caecilia sp.</i>	EMBL						
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatreumatidae</i>	EMBL						
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatrema sp.</i>	EMBL					5	1 525

ANNEXE 1 : Base Amphibiens



Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Amphibiens en milieu aquatique
 Association Trésor - DE200362 - 18 Mai 2021

En rouge les données n'apparaissant que lors de la Best ID à 90%

Classe	Ordre	Famille	Nom scientifique	Base de référence	crique sentier Favard (roches gravées)		Jonction Blanci/crique sentier		Jonction Blanci/crique sentier	
					SPY200012		SPY200003		SPY200015	
					Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Bufonidae</i>	GUYANE			1	11		
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella sp.</i>	GUYANE	1	13	2	23	5	233
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella castaneotica</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	GUYANE	1	1 002	8	6 405	7	26 354
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	GUYANE	3	882				
Amphibia	Anura	Centrolenidae	<i>Vitreorana oyampiensis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Allobates femoralis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus baebatrachus / Anomaloglossus cf. baebatrachus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus blanci</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus surinamensis</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hylidae</i>	GUYANE	1	11				
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Baana boans</i>	GUYANE	8	2 750				
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Baana cinerascens</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Baana dentei</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus sp.1</i>	GUYANE	1	1 562				
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hyla helenae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus / Osteocephalus taurinus</i>	GUYANE	2	378	2	429		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylidae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Adenomera sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	GUYANE	1	156				
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.3</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis zeuctotylus</i>	GUYANE					1	429
Amphibia	Gymnophiona	Caeciliidae	<i>Caecilia sp.</i>	EMBL						
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatreumatidae</i>	EMBL						
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatrema sp.</i>	EMBL	11	2 712	7	650	4	1 872

ANNEXE 1 : Base Amphibiens



Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Amphibiens en milieu aquatique
Association Trésor - DE200362 - 18 Mai 2021

En rouge les données n'apparaissent que lors de la Best ID à 90%

Classe	Ordre	Famille	Nom scientifique	Base de référence	sentier Saint Elie		sentier Saint Elie		station Max (RNKR)	
					Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Bufo</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Rhinella sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Rhinella castaneotica</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Rhinella margaritifera</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Rhinella marina</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Centrolenidae	<i>Vitreorana oyampiensis</i>	GUYANE	1	536				
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Allobates femoralis</i>	GUYANE	1	38				
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus sp.</i>	GUYANE	1	18				
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus baobatrachus / Anomaloglossus cf. baobatrachus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus blanci</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus surinamensis</i>	GUYANE	11	5 883	11	2 446		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hylidae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana boans</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana cinerascens</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana dentei</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus sp.1</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hyla helenae</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus / Osteocephalus taurinus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylidae</i>	GUYANE			2	78		
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Adenomera sp.</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	GUYANE						
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.</i>	GUYANE	8	1 006	10	1 517		
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.3</i>	GUYANE			1	15		
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis zeuctotylus</i>	GUYANE						
Amphibia	Gymnophiona	Caeciliidae	<i>Caecilia sp.</i>	EMBL						
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatreumatidae</i>	EMBL	8	553	2	65		
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatrema sp.</i>	EMBL					3	1 243

ANNEXE 1 : Base Amphibiens



Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Amphibiens en milieu aquatique
Association Trésor - DE200362 - 18 Mai 2021

En rouge les données n'apparaissant que lors de la Best ID à 90%

Classe	Ordre	Famille	Nom scientifique	Base de référence	station Max (RNKR)	
					SPY200014	
					Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Bufo</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Rhinella sp.</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Rhinella castaneotica</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Rhinella margaritifera</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Rhinella marina</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Centrolenidae	<i>Vitreorana oyampiensis</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Allobates femoralis</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus sp.</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus baebatrachus / Anomaloglossus cf. baebatrachus</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus blanci</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Dendrobatidae	<i>Anomaloglossus surinamensis</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hylidae</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana boans</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana cinerascens</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana dentei</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus sp.1</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Hyla helenae</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus sp.</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus / Osteocephalus taurinus</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus oophagus</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylidae</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Adenomera sp.</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis sp.3</i>	GUYANE		
Amphibia	Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis zeuctotylus</i>	GUYANE		
Amphibia	Gymnophiona	Caeciliidae	<i>Caecilia sp.</i>	EMBL		
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatreumatidae</i>	EMBL		
Amphibia	Gymnophiona	Rhinatreumatidae	<i>Rhinatrema sp.</i>	EMBL	1	183

6 Annexes 2 et 2 bis : Résultats issus des analyses pour la détection des espèces dans les mares temporaires par l'ADN environnemental

ANNEXE 2 : Base Amphibiens



Analyses VigiDNA M pour l'inventaire des Amphibiens en milieu aquatique stagnant
Association Trésor - DE200362 - 17 Juin 2022

Classe	Ordre	Famille	Nom scientifique	Base de référence	Mare BDA		Mare BDA		Mare BDA		Mare BDA	
					02/12/2021		09/12/2021		22/12/2021		21/01/2022	
					SPY200019		SPY200002		SPY200018		SPY200016	
					Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN	Nombre de répliquats positifs (/12)	Nombre de séquences ADN
Amphibia	Anura	Allophrynidae	<i>Allophryne ruthveni</i>	Amphibiens Guyane 2021	12	52 664	11	11 216	6	222	1	3 183
Amphibia	Anura	Bufo	<i>Rhinella castaneotica</i>	Amphibiens Guyane 2021	1	61						
Amphibia	Anura	Ceratophryidae	<i>Ceratophrys cornuta</i>	Amphibiens Guyane 2021			1	344				
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Boana semilineata</i>	Amphibiens Guyane 2021	3	501						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Callimedusa tomopterna</i>	Amphibiens Guyane 2021								
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus leucophyllatus</i>	Amphibiens Guyane 2021								
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus melanargyreus</i>	Amphibiens Guyane 2021								
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus minutus</i>	Amphibiens Guyane 2021								
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus sp.1</i>	Amphibiens Guyane 2021	1	284						
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>O. oophagus O. taurinus</i>	Amphibiens Guyane 2021	8	1 869	5	3 093	9	343		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus leprieurii</i>	Amphibiens Guyane 2021	8	5 108	11	29 461	2	52		
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Scinax sp.2</i>	Amphibiens Guyane 2021	12	14 888	3	850				
Amphibia	Anura	Hylidae	<i>Trachycephalus coriaceus</i>	Amphibiens Guyane 2021								
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus knudseni</i>	Amphibiens Guyane 2021			9	3 091	3	64		
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Amphibiens Guyane 2021	2	727	2	1 248				
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus petersii</i>	Amphibiens Guyane 2021							1	2 410
Amphibia	Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus rhodomystax</i>	Amphibiens Guyane 2021					3	78		
Amphibia	Anura	Microhylidae	<i>Chiasmocleis shudikarensis</i>	Amphibiens Guyane 2021	12	25 400	11	39 020				
Amphibia	Anura	Pipidae	<i>Pipa pipa</i>	Amphibiens Guyane 2021	3	640						

