

Bulletin de la Société Herpétologique de France N° 147

Directeur de la Publication/Editor : Claude Pierre GUILLAUME

Comité de rédaction/Managing Co-editors :

Max GOYFFON, Jean LESQUIRE, Claude MIAUD, Claude PIEAU, Jean Claude RAGE, Roland VERNET

Comité de lecture/Advisory Editorial Board :

Robert BARBAULT (Paris, France) ; Aaron M. BAUER (Villanova, Pennsylvania) ;
Liliane BODSON (Liège, Belgique) ; Donald BRADSHAW (Perth, Australie) ;
Corinne BOUJOT (Paris, France) ; Maria Helena CAETANO (Lisbonne, Portugal) ;
Max GOYFFON (Paris, France) ; Robert GUYETANT (Chambéry, France) ;
Ulrich JOGER (Darmstadt, Allemagne) ; Benedetto LANZA (Florence, Italie) ;
Raymond LECLAIR (Trois-Rivières, Canada) ; Guy NAULLEAU (Chizé, France) ;
Saïd NOUIRA (Tunis, Tunisie) ; V. PEREZ-MELLADO (Salamanque, Espagne) ;
Armand DE RICQLES (Paris, France) ; Zbynek ROCEK (Prague, Tchécoslovaquie).

Instructions aux auteurs / Instructions to authors :

Des instructions détaillées sont consultables sur le site internet de l'association : <http://lashf.fr>

Les points principaux peuvent être résumés ainsi : les manuscrits sont dactylographiés en double interligne, au recto seulement. La disposition du texte doit respecter la présentation de ce numéro. L'adresse de l'auteur se place après le nom de l'auteur (en première page), suivie des résumés et mots-clés en français et en anglais, ainsi que du titre de l'article en anglais. Les figures sont réalisées sur documents à part, ainsi que les légendes des planches, figures et tableaux ; toutes les légendes des figures et tableaux seront traduites (bilingues). Les références bibliographiques sont regroupées en fin d'article.

Exemple de présentation de référence bibliographique :

Bons J., Cheylan M. & Guillaume C.P. 1984 - Les Reptiles méditerranéens. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 29: 7-17.

Tirés à part / reprints : Les tirés à part ne sont pas disponibles mais les auteurs recevront une version pdf couleur de leur article.

La rédaction n'est pas responsable des textes et illustrations publiés qui engagent la seule responsabilité des auteurs. Les indications de tous ordres, données dans les pages rédactionnelles, sont sans but publicitaire et sans engagement.

La reproduction de quelque manière que ce soit, même partielle, des textes, dessins et photographies publiés dans le Bulletin de la Société Herpétologique de France est interdite sans l'accord écrit du directeur de la publication. La SHF se réserve la reproduction et la traduction ainsi que tous les droits y afférent, pour le monde entier. Sauf accord préalable, les documents ne sont pas retournés.

ENVOI DES MANUSCRITS / MANUSCRIPT SENDING

Claude Pierre GUILLAUME, Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive (UMR 5175), École Pratique des Hautes Études, équipe Biogéographie et Écologie des Vertébrés, campus CNRS, 1919 route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 5. Envoi des manuscrits en trois exemplaires par courrier, ou, MIEUX, sous forme de fichier(s) texte attaché(s) à l'adresse e-mail : Claude-Pierre.Guillaume@cefe.cnrs.fr

Abonnements 2012 (hors cotisations) / Subscriptions to SHF Bulletin (except membership)

France, Europe, Afrique : 50 €

Amérique, Asie, Océanie : 70 US \$

To our members in America, Asia or Pacific area : The SHF Bulletin is a quarterly. Our rates include airmail postage in order to ensure a prompt delivery.

N° 147

Photo de couverture : *Iguana iguana* mâle de l'île de Saba.

Cet iguane endémique se caractérise entre autres par sa coloration noire qui correspondrait à une adaptation à la vie en altitude dans des milieux frais avec de nombreux nuages et du brouillard fréquent. Photo : M. Breuil.

Front cover picture: Male *Iguana iguana* from Saba. This endemic iguana has a characteristic coloration that could be an adaptation to the life in altitude in cool biotope with numerous clouds and mist. Picture: M. Breuil.

Photo de 4^e de couverture : Iguane femelle hybride de Grande-Terre observée une première fois en 2007 et capturée en 2012. Cet iguane très original par sa couleur noire résulte très

probablement d'un backcross avec un *Iguana delicatissima*, cet individu pourrait aussi être un individu F2. Même individu que celui de la Fig. 10d. Photo M. Breuil.

Back cover picture: Female hybrid *Iguana* first observed in 2007 then caught in 2012. This very peculiar black iguana is probably the result of a backcross with *Iguana delicatissima* or the result of a F2 generation. Same individual that the one in Fig. 10d. Picture: M. Breuil.

Imprimeur : F. PAILLART - 86, Chaussée Marcadé
B.P. 30324 - 80103 Abbeville Cedex

Mise en page : Valérie GAUDANT (SFI)

Dépôt légal : 3^e trimestre 2013

Impression : Octobre 2013

Bull. Soc. Herp. Fr. (2013) 147 : 249-278

Identification des grenouilles « vertes » *Pelophylax* spp. (Anura, Ranidae) en Wallonie (Belgique) : confrontation de critères morphologiques et acoustiques avec des analyses enzymatiques et d'ADNmt^{(1)*}

par

Christiane PERCSY⁽¹⁾ & Nicolas PERCSY⁽²⁾

⁽¹⁾ UCLouvain – Earth and Life Institute
Chemin du Bon Air, 12 – BE - 1380 Ohain, Belgique
cpercsy@gmail.com

⁽²⁾ UMons – Faculté d'Architecture et d'Urbanisme
rue d'Havré, 88 – BE - 7000 Mons
nicolas.percsy@umons.ac.be

Résumé – En Wallonie, comme dans plusieurs autres régions d'Europe de l'Ouest, des grenouilles vertes (*Pelophylax* spp.) d'origines diverses ont été introduites et se répandent dans la nature. Identifier ces espèces est essentiel pour mesurer l'incidence de leur introduction sur la faune locale. Le présent article vise à confronter les identifications obtenues suivant divers moyens, tant de terrain que de laboratoire : critères morphologiques, analyses bioacoustiques, analyses enzymatiques et d'ADN mitochondrial. Cette confrontation confirme la présence de *Pelophylax* kl. *esculentus*, *P. lessonae*, *P. ridibundus* et *P. cf. bedriagae* (deux haplotypes différents) en Wallonie. Elle permet d'évaluer la validité de divers critères d'identification morphologiques et acoustiques, utilisables notamment sur le terrain. Elle met aussi en évidence l'existence, dans la nature, d'hybridations entre les espèces introduites et les grenouilles vertes indigènes.

Mots-clés : *Pelophylax* spp., critères d'identification, analyse bioacoustique, analyse enzymatique, ADN mitochondrial, introgression, introduction d'espèces.

Summary – Identification of the “water frogs” *Pelophylax* spp. (Anura, Ranidae) in Wallonia (Belgium) : confrontation of morphological and bioacoustic criteria with enzymatic and mitochondrial-DNA analyses. In Wallonia, as in several other areas of Western Europe, water frogs (*Pelophylax* spp.) from various origins were introduced and spread in nature. Identifying these species is essential in order to measure the incidence of their introduction on local fauna. The aim of this paper is to confront the identifications obtained according to various means, both those used in the field and in the laboratory : morphological criteria, bioacoustic analyses, enzymatic and mitochondrial-DNA analyses. This confrontation confirms the presence in nature, in Wallonia, of *Pelophylax* kl. *esculentus*, *P. lessonae*, *P. ridibundus* and *P. cf. bedriagae* (two haplotypes of the latter are present). It enables us to estimate the validity of several morphological and bioacoustic identification criteria that can be used, in particular, in the field. It also highlights the existence of hybridizations, in the wild, between the introduced species and the indigenous green frogs.

Key-words : *Pelophylax* spp., identification criteria, bioacoustic analysis, enzymatic analysis, mitochondrial DNA, introgression, alien species.

* Une part importante de ces résultats a été présentée au Congrès de la SHF des 25-27 octobre 2007, à Strasbourg.

I. INTRODUCTION

La systématique des grenouilles vertes, rassemblées aujourd'hui dans le genre *Pelophylax* (Frost *et al.* 2006, Bour *et al.* 2008) est extrêmement complexe. Si, en 1758, Linné ne décrivait qu'une seule espèce, on identifie aujourd'hui quelque 24 taxons, dont 14 sont présents en Europe et sur le pourtour méditerranéen. Leur identification est basée sur trois approches différentes : analyses biométriques (dues à Berger 1966), analyses bioacoustiques (initiées par Wahl 1969) et analyses enzymatiques (par exemple Tunner 1973, Uzzel & Berger 1975) ou d'ADN (par exemple Plötner *et al.* 1994).

Ces diverses caractérisations des taxons ne sont malheureusement guère utilisables sur le terrain... alors que l'observateur expérimenté s'autorise souvent à présumer de l'identification des animaux qu'il observe (voir par exemple Burny & Parent 1985, Günther 1996, ACEMAV 2003a, Plötner 2005, Muratet 2008). De nombreux auteurs utilisent d'ailleurs de telles identifications comme point de départ de leur travaux (Wycherley *et al.* 2002, Percsy & Percsy 2002a,b, 2007, Holsbeek *et al.* 2008, Jooris & Holsbeek 2010,...) tout en sachant qu'elles ne sont pas infaillibles (Pagano & Joly 1999). Notre article confronte ces moyens d'identification « de terrain » à ceux utilisés « en laboratoire », sur base d'échantillons prélevés en Wallonie (Belgique).

En Belgique, deux taxons sont considérés comme indigènes : la Grenouille de Lessona, *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882), et la Grenouille verte hybride, *Pelophylax kl. esculentus* (Linnaeus, 1758) (Parent 1984, Günther 1997). Avant 1975, seules existaient quelques mentions isolées de Grenouilles rieuses, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), dues à des introductions par des « ranaculteurs » (Parent 1984). Depuis, la situation a changé, tant en Flandre (Jooris & Holsbeek 2010) qu'en Wallonie (Percsy & Percsy 2007) et à Bruxelles (Percsy 1998, Jooris & Holsbeek 2010). En Wallonie, dans le courant des années 1980, des horticulteurs de plantes aquatiques ont commencé à promouvoir la création de mares de jardin : pour les agrémenter, des grenouilles vertes d'origines diverses ont été commercialisées ; elles se sont progressivement répandues dans la nature, en Brabant wallon d'abord, un peu partout dans la région aujourd'hui (Percsy & Percsy 2002a, b).

Le présent article étudie plusieurs populations de grenouilles vertes de Wallonie : il confronte divers moyens d'identification des espèces avec des analyses enzymatiques (effectuées par le Laboratoire d'écologie des hydrosystèmes fluviaux (Prof. Pierre Joly) de l'Université Claude Bernard, Lyon I), et des analyses d'ADN mitochondrial (réalisées par le « Museum für Naturkunde der Humboldt-Universität zu Berlin », Prof. Jörg Plötner).

D'une part, le résultat de ces analyses est confronté aux identifications que nous avons effectuées préalablement sur le terrain, par le croisement de critères morphologiques et acoustiques observables à distance. Ces critères sont explicités plus loin (§ II.B) ; nous les avons choisis *a priori* sur base de l'expérience que nous avons acquise antérieurement. La confrontation des identifications ainsi faites avec les résultats des analyses de laboratoire permet alors de valider notre méthode de reconnaissance des taxons ; soulignons que celle-ci ne nécessite pas la capture des animaux.

D'autre part, sur base d'un jeu de photographies des grenouilles qui ont fait l'objet d'analyses génétiques, nous évaluons *a posteriori* la fiabilité de chacun des critères morphologiques classiquement avancés dans la littérature pour l'identification des animaux. Cette

évaluation confirme le bien fondé des critères morphologiques choisis *a priori* pour notre méthode d'identification.

Par ailleurs, la confrontation des analyses acoustiques effectuées sur nos enregistrements de chants avec les analyses génétiques permettent de valider la distinction, par le chant, de certains taxons. Cette distinction peut se faire, dans une certaine mesure, à l'oreille ou, plus finement, sur base des paramètres caractéristiques obtenus après utilisation d'un logiciel d'analyse acoustique. L'article discute l'intérêt de divers paramètres acoustiques pour la séparation des taxons et compare les valeurs des paramètres obtenues sur nos échantillons avec celles d'autres auteurs (Schneider & Sinsch 1992, Carrière 1999, Lodé 2001).

Enfin, nos résultats permettent de dégager des informations sur le statut des grenouilles vertes en Wallonie. Celles-ci sont comparées à celles obtenues tout récemment, pour la Flandre (Belgique), dans Holsbeek *et al.* 2008 et Jooris et Holsbeek 2010.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel d'étude collecté est de nature très diverse : notes de terrain, enregistrement des chants, photos et prélèvements de doigts (§ II.A). Ce matériel a servi à l'obtention de résultats selon cinq approches différentes : identification des animaux sur le terrain (§ II.B), analyse de critères morphologiques sur photographies (§ II.C), analyses acoustiques (§ II.D), analyse enzymatique (§ II.E) et analyse d'ADN (§ II.F).

A. Travail de terrain

- Les grenouilles ont été prélevées sur huit sites pendant leur période de reproduction, en mai et juin 2002. Trois sites ont été choisis dans le bassin de la Lasne, objet de notre étude de 2002 (Percsy & Percsy 2002a) : La Marache (Ohain), Champ des Vignes (Ohain) et Grand Cortil (Rosières). Un autre site est le lieu d'une des plus anciennes introductions de la Grenouille rieuse en Brabant wallon : Manil (Bierges). Le site du Belvédère (Chaumont) est celui dont la population de grenouilles exotiques fut attribuée à *P. bedriagae* (Kok *et al.* 2002). La réserve naturelle de Gentissart (Villers-la-Ville) renferme une grosse population de grenouilles vertes, identifiées *a priori* comme « rieuses », non connectée aux précédentes. Enfin, deux populations ont été choisies en Hainaut, car elles étaient présumées composées exclusivement de *P. lessonae* : Bois de Baudour Ouest et Bois de Baudour Est (Baudour) ; de telles populations sont rares (Burny & Parent 1985, Günther 1997).

- Sur chaque site, une ou plusieurs visites ont été faites l'après-midi, par conditions météorologiques favorables ; les opérations suivantes ont eu lieu successivement :

- relevé de la température de l'air et de l'eau (à 4 cm et 10 cm de profondeur) ;
- observation aux jumelles (Swarovski 10 x 42 WB), écoute, prise de notes (couleur générale et dessins, granulosité de la peau, longueur des pattes, couleur des sacs vocaux, type de chant perçu à l'oreille) ; une identification « de terrain » de l'espèce en est déduite (voir § III.A) ;
- enregistrements individuels de chants de mâles en période de reproduction (micro directionnel Sennheiser K 6 et DAT walkman Sony TCD-D7) ;
- captures individuelles au filet ;

- photographies standardisées avec une échelle métrique de référence (film diapo 100 ASA, Nikon F 100, objectif 105 mm macro) : les animaux capturés sont pris sous divers angles, comme précisé à la figure 1) ;

- prélèvement d'un doigt, conservé dans de la glace sur le terrain, puis congelé à -18°C ; sur le site de Gentissart, aucun adulte n'a pu être capturé : seuls quelques œufs d'une ponte ont été prélevés. L'espèce attribuée à cette ponte a été déterminée par l'identification « de terrain » des adultes reproducteurs.

- Au total, sur l'ensemble des sites ci-dessus, une centaine de mâles chanteurs ont été enregistrés et 45 individus furent capturés.

Lorsque le mâle chanteur enregistré a aussi été capturé, nous l'avons noté : nous disons alors qu'il y a « **correspondance directe** » entre le chant et l'individu capturé. Dans certains cas, l'animal dont le chant a été enregistré n'a pu être capturé ; c'est un individu proche qui l'a été, dont le chant a, par ailleurs, été clairement entendu et jugé identique à celui qui venait d'être enregistré : nous qualifierons cette correspondance de « **correspondance indirecte** ». Enfin, sur certains sites, les individus capturés n'ont pas été entendus individuellement, mais tous les chants perçus ont été jugés identiques à ceux enregistrés au même moment sur ce site : nous parlerons de « **correspondance probable** » entre le chant enregistré et l'animal capturé.

- Dans les analyses acoustiques présentées dans cet article, nous avons pris en compte, en plus des enregistrements de mâles chanteurs cités plus haut, quelques enregistrements de l'année précédente, réalisés sur les mêmes sites ou en d'autres lieux (Percsy & Percsy 2002a).

B. Choix de critères d'identification sur le terrain

Nos identifications sont faites, sans capture des animaux, par une observation visuelle aux jumelles et une écoute du chant des mâles. Pour pouvoir tester notre méthode de reconnaissance des animaux, il importe d'explicitier quels sont les caractères que nous avons utilisés. Parmi les critères classiquement avancés pour distinguer les grenouilles du complexe « *ridibundus-lessonae* », nous avons retenu les caractères simples, observables à (faible) distance, repris au tableau I.⁽¹⁾ En effet, sur base de notre expérience de terrain (acquise antérieurement), ceux-ci nous semblaient *a priori* suffisants pour identifier les taxons concernés. Nous avons écarté certains caractères tels que la taille de l'animal (valable seulement pour des adultes d'âge similaire), la coloration de l'iris (souvent difficile à évaluer à distance), la corpulence, la forme de la tête et du museau, les dessins et les couleurs du dos de l'animal (car, *a priori*, ils ne nous paraissaient pas suffisamment fiables).

Comme pour la plupart des groupes taxinomiques, les critères de détermination « de terrain » comportent une marge significative d'erreur et leur fiabilité dépend en partie de l'expérience de l'observateur. Ainsi, l'évaluation approximative des longueurs relatives (pattes/corps, tibia/cuisses) peut se faire à vue, avec un peu d'entraînement. La couleur des sacs vocaux doit être appréciée lorsque les sacs sont bien gonflés : quand ils le sont moins, ils paraissent beaucoup plus foncés. Le troisième des six critères (à savoir la coloration de l'ar-

⁽¹⁾ La couleur des sacs vocaux de *P. kl. esculentus* figurant au tableau 11 de Percsy & Percsy 2007 est en contradiction avec celle mentionnée à la page 172 du même ouvrage : c'est cette dernière qui est correcte et qui est reprise ici.

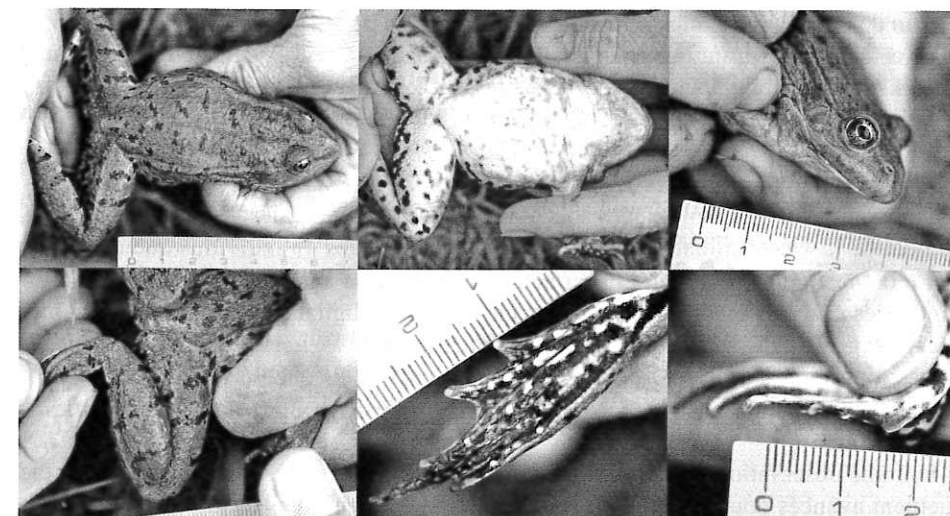


Figure 1 : Les divers angles de vue sous lesquels chaque individu capturé a été photographié (il s'agit ici de l'exemplaire M7, *Pelophylax cf. bedriagae*) : face dorsale, face ventrale, tête de profil, patte arrière repliée, pied arrière avec tubercule métatarsal vu de haut et de profil.

Figure 1: The different view angles from which each animal caught was photographed (the pictures concern sample M7, *Pelophylax cf. bedriagae*): upper side, underside, head in profile, bent hind leg, hind foot with metatarsal tubercle from above and in profile.

Tableau I : Critères d'identification utilisés sur le terrain.

Table I: Identification criteria used in the field.

| | <i>Pelophylax lessonae</i> | <i>P. kl. esculentus</i> | <i>P. ridibundus</i> |
|--|---|--|-------------------------|
| Longueur de la patte arrière vs longueur du corps | plus petite | intermédiaire | plus longue |
| Longueur du tibia vs longueur du fémur | plus petite ou égale | égale | plus longue |
| Couleur de l'arrière de la cuisse ou de l'aîne | souvent présence d'une teinte jaune vif | avec ou sans présence d'une teinte jaune vif | pas de teinte jaune vif |
| Granulosité de la peau du dos | faible | faible | généralement forte |
| Sacs vocaux | blancs, parfois teintés de rose | blancs ou gris clair | gris moyen à foncé |
| Chant | continu, long et uniforme | plus court, modulé | assez court et saccadé |

rière des cuisses) est délicat du fait de l'appréciation de la couleur « jaune vif », à ne pas confondre avec un jaune plus verdâtre ou brunâtre. De même, l'évaluation de la granulosité de la peau est subjective : elle reflète la présence plus ou moins importante de pustules sur la peau. Enfin, le dernier critère est acoustique : il donne une description « à l'oreille » du chant, avant toute analyse objective par oscillogramme ou spectrogramme.

Afin de compenser l'imprécision liée à l'évaluation de ces critères, nous posons le diagnostic d'identification sur le terrain lorsqu'au moins quatre des six caractères repris dans le tableau I sont concordants. Le chant nous paraissant le guide le plus sûr, la détermination est *a priori* plus fiable pour les mâles adultes que pour les femelles et les jeunes.

C. Analyses morphologiques et biométriques

Divers critères morphologiques sont analysés sur photographies, *a posteriori*, indépendamment de la « détermination de terrain ». Les photos des 45 individus que nous avons prises (comme indiqué à la figure 1) permettent deux types d'analyses :

- des analyses biométriques : les images ayant été digitalisées, puis insérées et mises à l'échelle (grâce à l'échelle graduée photographiée) dans le logiciel AutoCAD ; des mesures précises sont faites dans ce logiciel. Ce volet de l'étude (qui concerne notamment la forme du tubercule métatarsal ou sa longueur par rapport à celle du premier orteil) sera abordé dans un autre article ;

- une observation *de visu*, sur les mêmes images, des critères morphologiques classiquement avancés pour déterminer, sur le terrain, les grenouilles du complexe « *ridibundus-lessonae* » : la comparaison des photos entre elles et la possibilité de répéter le travail d'analyse plusieurs fois et par des personnes différentes (ici chacun des deux auteurs) permet d'évaluer les caractères plus objectivement que sur le terrain.

Les diverses images (voir Fig. 1) des 45 individus photographiés permettent d'évaluer les sept paramètres qui suivent :

- (1) granulosité de la peau (faible, moyenne, forte) ;
- (2) longueur relative (à vue) des tibias par rapport aux cuisses (inférieure, égale, supérieure) ;
- (3) forme de la tête et du museau (plus ou moins large, plus ou moins arrondie) ;
- (4) coloration du dos : dominance de vert ou de brun ;
- (5) présence ou non d'une ligne vertébrale claire ;
- (6) coloration de l'arrière des cuisses et de l'aine (présence – parfois très limitée – de jaune vif ou non) ;
- (7) coloration de l'iris (dominance de noir ou d'or).

La comparaison de la longueur (estimée à vue) d'une patte arrière par rapport à celle du corps n'est pas réalisable sur nos photos, vu l'absence d'image globale de l'animal. L'étirement de la patte le long du corps (comme souvent suggéré dans les livres d'identification, par exemple Arnold & Ovenden 2004), n'a pas été réalisé dans cette étude : d'une part, la méthode présente une imprécision certaine, du fait que cette position de la patte entraîne une torsion difficilement contrôlable de la colonne vertébrale de la grenouille ; d'autre part, nous n'avons pas voulu allonger exagérément le temps total de manipulation des animaux. L'évaluation du rapport longueur de la patte arrière sur longueur du corps sera faite dans un autre article par les mesures prises sur les photos digitalisées.

D. Analyses acoustiques

D'une part, les chants ont été analysés sur le terrain, afin de les rapprocher (ou non) des types de chants mis en évidence par Carrière 1999. D'autre part, l'enregistrement numérique originel, échantillonné à 48 KHz, a été transféré, sans altération, sur DVD au format « .wav » (32 bits), exploitable sur ordinateur par des programmes d'analyse acoustique.

1. Les logiciels d'analyse acoustique

Nous avons utilisé trois programmes qui permettent tous trois de générer diverses représentations graphiques des séquences de chant (voir Fig. 2 par exemple) et de calculer divers paramètres acoustiques. Selon les objectifs poursuivis, nous avons utilisé tantôt l'un, tantôt l'autre de ces programmes, chacun pour ses avantages respectifs.

- Audacity* (version 1.2.6 pour Windows) de Mazzoni *et al.* (1999-2012).
- Praat* (version 5.1.25) de Boersma et Weenink (1992-2010).
- Seewave* (version 1.4.8) de Sueur *et al.* (2008), nécessitant l'installation préalable du logiciel libre « R » (version 2.7.1) dont il est une extension (R Core Team 2008).

2. Les diagrammes acoustiques

Nous avons utilisé les représentations graphiques suivantes (Sueur *et al.* 2008) :

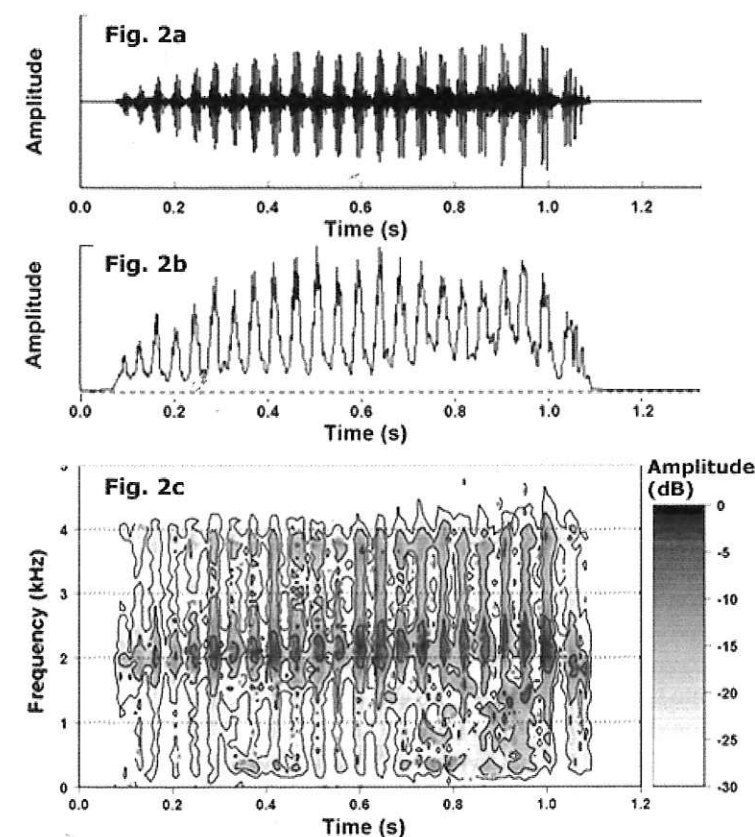


Figure 2 : Motif extrait d'un chant de *Pelophylax kl. esculentus* (exemplaire A2). 2a : oscillogramme. 2b : enveloppe sonore. 2c : spectrogramme. (Graphes réalisés à l'aide du logiciel Seewave).
Figure 2: Call isolated from a call series of *Pelophylax kl. esculentus* (sample A2). 2a: oscillogram. 2b: amplitude envelope. 2c: spectrogram. (Graphs obtained with the help of the Seewave program).

- l'**oscillogramme** d'une séquence sonore, c'est-à-dire le graphe de la variation de pression acoustique en fonction du temps, autour d'une position d'équilibre (Fig. 2a, Fig. 3, Fig. 4b) ;

- l'**enveloppe sonore** (ou « sonore amplitude » dans Sueur *et al.* 2008) représentant la variation de l'amplitude sonore (positive) en fonction du temps, obtenue par lissage de la courbe de l'oscillogramme (Fig. 2b) ;

- le **spectrogramme**, qui est la représentation graphique de la distribution spectrale du son : le temps étant en abscisse et la fréquence en ordonnée, l'« intensité sonore », en dB, d'une fréquence donnée, à un instant donné, est représentée par une couleur conventionnelle ou un niveau de gris (Fig. 2c, Fig. 4a). Selon l'usage, le niveau « zéro dB » de référence correspond à l'intensité maximale observée dans l'ensemble des fréquences du spectre sur toute la durée du son ; ainsi, les autres fréquences spectrales apparaissent avec un nombre de décibels négatif par rapport à cette fréquence maximale.

3. Caractérisation des chants à partir des diagrammes acoustiques

Les chants enregistrés sont ceux des grenouilles mâles en période de reproduction (et non les simples cris mono-syllabiques « kwak »). De nombreux paramètres, dérivés des diagrammes décrits plus haut, peuvent être utilisés pour analyser ces chants ; le choix de ceux-ci varie selon les auteurs. Nous rappelons ci-dessous ceux qui sont utilisés dans ce travail et qui ont été étudiés dans au moins une des publications suivantes : Schneider et Sinsch 1992, 1999 ; Carrière 1999 ; Lodé 2001 ; Wycherley *et al.* 2002.

a. Structure du chant

Les notions qui suivent sont illustrées sur l'oscillogramme d'une grenouille verte *Pelophylax ridibundus*, Fig. 3.

- Le **chant** (« call series ») d'un animal est composé de l'ensemble des émissions sonores qu'il produit à la suite les unes des autres (durée : plusieurs secondes).

- Un **motif** (« call ») est une séquence du chant qui, à l'oreille, semble ininterrompue (durée de quelques dixièmes de seconde).

- Une **note** (« pulse group » ou « segment ») est une fraction du motif qui, à l'oreille, paraît élémentaire (durée de quelques centièmes de seconde).

Par exemple, si le chant de *Pelophylax ridibundus* est décrit par « kè-kè-kè-kè-kè », cette succession de « kè » est le motif et « kè » est la note.

- La note se décompose elle-même en **impulsions** (« pulses ») (durée de l'ordre de quelques millièmes de seconde), discernables sur un oscillogramme ou sur un enregistrement ralenti du chant (Carrière 1999), mais indiscernables à l'oreille : l'oscillogramme d'une impulsion présente la forme d'une oscillation d'amplitude décroissante.

- La notion d'impulsion correspond à celle de **sous-unité** (« subunit ») définie par Wycherley *et al.* (2002). Notons aussi que Lodé (2001) utilise le terme anglais « pulse » dans le sens de « note », contrairement aux autres auteurs.

b. Paramètres

L'oscillogramme d'un chant livre les paramètres suivants :

$m1$ = durée d'un motif (exprimé en ms)

$m2$ = intervalle entre motifs successifs ou silences (en ms)

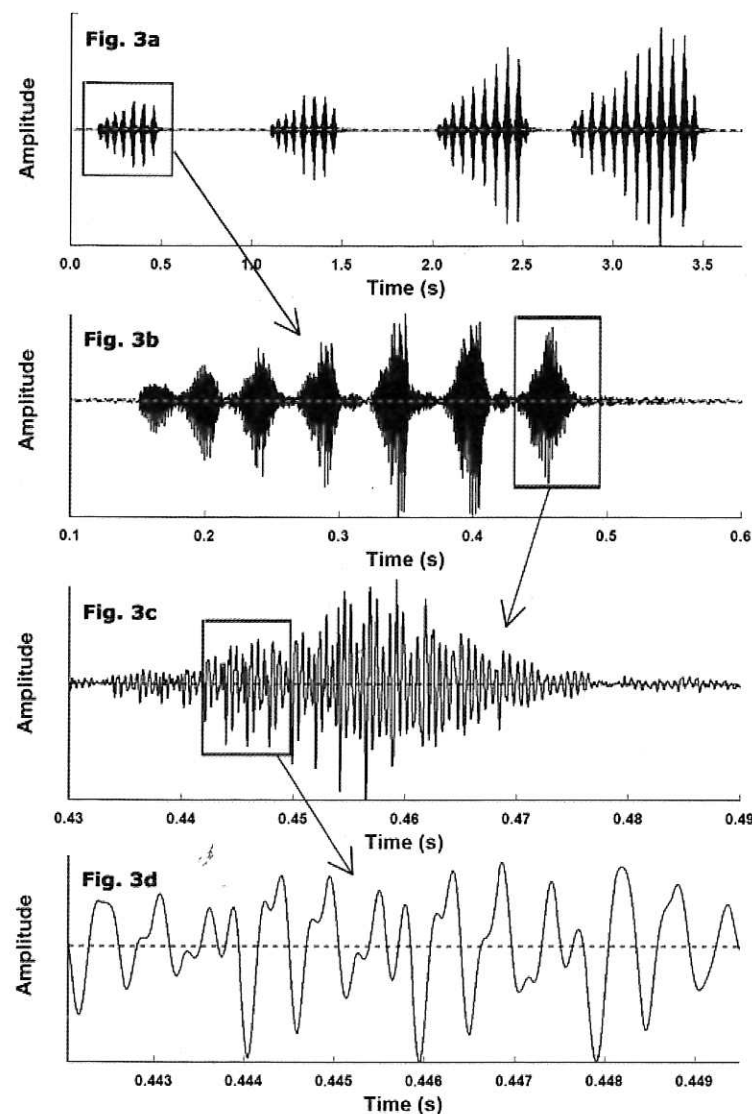


Figure 3 : Oscillogrammes extraits d'un chant de *Pelophylax ridibundus* (exemplaire H8). **3a** : quatre motifs successifs extraits d'une séquence de chant, apparaissant comme des groupes de notes, séparés par des silences. **3b** : vue agrandie du 1^{er} motif, formé de 7 notes apparaissant sous la forme de « paquets » séparés par des silences. **3c** : vue agrandie de la 7^e note, formée de 17 impulsions se présentant comme des oscillations amorties. **3d** : vue détaillée des impulsions n° 5 à 8. (Graphes réalisés à l'aide du logiciel Seewave).

Figure 3: Oscillograms from a call series of *Pelophylax ridibundus* (sample H8). **3a**: four successive calls from a call series, sounding like pulse groups separated by silences. **3b**: enlarged view of the first pulse group, consisting of seven pulses displayed as "packages" separated by silences. **3c**: enlarged view of the seventh pulse, consisting of 17 damped oscillations. **3d**: detailed view of oscillations number 5 to 8. (Graphs obtained with the help of the Seewave program).

$m3$ = période du motif (en ms) ($= m1 + m2$)
 s = nombre de notes par motif
 $n1$ = durée d'une note (en ms)
 $n2$ = intervalle entre notes successives (en ms)
 $n3$ = période d'une note (en ms) ($= n1 + n2$)
 t = nombre d'impulsions par note
 u = nombre de notes d'un motif relativement à la durée du motif ($= s / m1$), que nous appellerons tempo (en Hz)
 v = quotient de la durée du motif par le nombre de notes qui le constituent (en s) ($= 1 / u$).

c. Utilisation des enveloppes sonores et spectrogrammes

L'**enveloppe sonore** permet d'apprécier la variation de l'intensité sonore au sein d'un motif ou d'une note (*crescendo, decrescendo, modulation,...*).

Le **spectrogramme** représente le spectre des fréquences d'un motif. Des paramètres quantitatifs peuvent être définis comme dans le cas des oscillogrammes (par exemple, la valeur de la fréquence dominante du spectre, les différences d'intensité en dB entre fréquences principales,...) ; leur détermination nécessite parfois des outils d'analyse mathématique plus élaborés (voir par exemple Wycherley *et al.* 2002). Nous utiliserons uniquement ces spectrogrammes de manière qualitative (fréquence dominante, modulation en fréquence).

E. Électrophorèse de protéines

L'analyse des échantillons prélevés a été effectuée, en 2003, par le Laboratoire d'écologie des hydrosystèmes fluviaux (Prof. Pierre Joly) de l'Université Claude Bernard, Lyon I, en utilisant les *loci* LDH-1 (lactate déshydrogénase) et MPI (mannose phosphate isomérase) (protocole décrit dans Pagano *et al.* 1997) : ces *loci* sont les plus discriminants pour le système « *lessonae – esculentus – ridibundus* » (P. Joly, comm. pers.). Notons que l'analyse du *locus* GPI (glucose phosphate isomérase) a également été effectuée mais n'a pas été interprétée.

F. Analyse d'ADN mitochondrial

Les haplotypes de nos échantillons ont été déterminés, en 2008, par Torsten Ohst au sein du « Museum für Naturkunde der Humboldt-Universität zu Berlin » (Prof. Jörg Plötner), par analyse d'ADN mitochondrial : le gène ND3 a été séquencé, comme décrit dans Akin *et al.* 2010.

III. RÉSULTATS

A. Identifications de terrain

Les identifications faites sur le terrain, selon les critères mentionnés au tableau I, sont données dans le tableau II, où elles sont confrontées aux résultats des analyses de laboratoire décrites ci-après. Ces identifications de terrain sont les identifications « spontanées » effectuées avant la capture des animaux et, donc, avant toute autre analyse.

B. Analyses enzymatiques

Les analyses de 37 des 46 échantillons, par les enzymes LDH-1 et MPI, livrent des allèles « *lessonae* » et « *ridibundus* », comme indiqué au tableau II. Néanmoins, l'identification de trois échantillons comporte une incertitude (notée par un « ? ») : pour ceux-ci, la lecture du gel obtenu avec la protéine LDH-1 laisse un doute sur un allèle *c* de *ridibundus* ; de plus, les zymogrammes obtenus pour la GPI de ces échantillons diffèrent clairement de ceux des autres *ridibundus* ; par contre, le *locus* MPI fournit bien des allèles de *ridibundus* (Odile Grolet comm. pers.).

C. Analyses d'ADN

L'analyse de l'ADN mitochondrial de 45 des 46 échantillons fournit quatre haplotypes distincts. L'un (noté L) est de type *P. lessonae* mais diffère d'autres *P. lessonae* provenant du Nord, du Centre ou de l'Est de l'Europe ; un second (noté C) correspond aux *P. ridibundus* d'Europe centrale ; les deux derniers haplotypes (notés E1 et E2) sont ceux de *P. cf. bedriagae* que l'on trouve tous deux en Anatolie, dans le nord de la Grèce et en Bulgarie (Tab. II) (Torsten Ohst, comm. pers., Akin *et al.* 2010).

D. Analyses morphologiques

Les critères relatifs à la forme de la tête et du museau se sont avérés peu fiables : l'examen à vue des images à des moments différents, par la même personne, a donné des résultats différents ! Ce critère sera donc étudié ailleurs, par des mesures précises sur les photos digitalisées.

Les six autres caractères mentionnés au § II.C ont été évalués pour chacun des 45 individus analysés génétiquement ; ces évaluations ont été confrontées à l'identification « de synthèse » de ces individus (dernière colonne du tableau II), ce qui livre le tableau III. Notons que nous avons ajouté, dans ce tableau III, la coloration des sacs vocaux, quoique celle-ci ne résulte pas de l'analyse des photographies (mais du travail « de terrain »), vu l'intérêt de ce caractère pour la discussion.

E. Analyses acoustiques des chants

1. À l'oreille sur le terrain

La description du chant des mâles, notée sur le terrain, avant la capture des animaux, nous permet de distinguer deux grands types de chant :

- **chant de type R** : motif haché aux notes bien détachées, en nombre réduit (généralement moins de 10), la durée du motif étant, sauf exception, nettement inférieure à la seconde ; on peut le rapprocher des types 1 et 2 de Carrière 1999.
- **chant de type L** : motif formé d'une vibration continue de notes denses et nombreuses, d'une durée proche de la seconde.

Une écoute plus attentive et une certaine habitude permet de subdiviser le type L comme suit, dans notre région :

- **type L⁻** : les notes formant le motif sont plus ou moins discernables, le motif est *crescendo* et se termine brusquement ; il se rapproche du type 4 de Carrière 1999.

Tableau II : Résultats des identifications de terrain et de laboratoire. Pour l'enzyme LDH-1, les allèles a et c caractérisent le génome *ridibundus* ; les autres, le génome *lessonae*. Pour l'enzyme MPI, l'allèle s caractérise le génome *lessonae* ; les autres, le génome *ridibundus*. Les analyses d'ADN mitochondrial conduisent à quatre haplotypes : *ridibundus* C, cf. *bedriagae* E1, cf. *bedriagae* E2 et *lessonae* L.

Table II: Field and laboratory identifications. For the LDH-1 enzyme, the alleles a and c characterize the *ridibundus* genome; the others, the *lessonae* genome. For the MPI enzyme, the allele s characterises the *lessonae* genome; the others, the *ridibundus* genome. The mitochondrial DNA analyses lead to four haplotypes: *ridibundus* C, cf. *bedriagae* E1, cf. *bedriagae* E2 and *lessonae* L.

| Individu | Sexe | Identification de terrain | Analyse enzymatique | | | Analyse d'ADN | Synthèse |
|---|----------|---------------------------|---------------------|-----|--------------------------|---------------|--------------------------|
| | | | LDH-1 | MPI | Identification | | |
| site : La Marache 50°40'48"N / 4°26'25"E / 103 m | | | | | | | |
| A1 | immature | <i>P. ridibundus</i> | ac | – | <i>P. ridibundus</i> | C | <i>P. ridibundus</i> |
| A2 | mâle | <i>P. kl. esculentus</i> | ab | SI | <i>P. kl. esculentus</i> | L | <i>P. kl. esculentus</i> |
| A3 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | cc | II | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| A4 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | ac | II | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| A5 | immature | <i>P. ridibundus</i> | cc | IF | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| A6 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | ac | IF | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| site : Grand Cortil 50°43'30"N / 4°32'28"E / 48 m | | | | | | | |
| C1 | mâle | <i>P. kl. esculentus</i> | ce | SF | <i>P. kl. esculentus</i> | L | <i>P. kl. esculentus</i> |
| C2 | mâle | <i>P. kl. esculentus</i> | ce | SI | <i>P. kl. esculentus</i> | E2 | nouvel hybride |
| C3 | mâle | <i>P. kl. esculentus</i> | ce | SI | <i>P. kl. esculentus</i> | E2 | nouvel hybride |
| C4 | mâle | <i>P. kl. esculentus</i> | ce | SI | <i>P. kl. esculentus</i> | – | <i>P. kl. esculentus</i> |
| C5 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | ac | IF | <i>P. ridibundus</i> | E2 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| C6 | immature | <i>P. ridibundus</i> | cc | II | <i>P. ridibundus</i> | E2 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| C7 | immature | <i>P. ridibundus</i> | ac | IF | <i>P. ridibundus</i> | E2 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| C8 | immature | <i>P. ridibundus</i> | cc | IF | <i>P. ridibundus</i> ? | E2 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| site : Gentissart 50°34'11"N / 4°33'58"E / 144 m | | | | | | | |
| E1 | embryon | <i>P. ridibundus</i> | ac | – | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| site : bois de Baudour ouest 50°30'12"N / 3°49'50"E / 96 m | | | | | | | |
| F1 | femelle | <i>P. lessonae</i> | ee | – | <i>P. lessonae</i> | L | <i>P. lessonae</i> |
| F2 | mâle | <i>P. lessonae</i> | ee | – | <i>P. lessonae</i> | L | <i>P. lessonae</i> |
| F3 | femelle | <i>P. lessonae</i> | ae | SF | <i>P. kl. esculentus</i> | L | <i>P. kl. esculentus</i> |
| F4 | mâle | <i>P. lessonae</i> | ée | – | <i>P. lessonae</i> | L | <i>P. lessonae</i> |
| site : bois de Baudour est 50°29'57"N / 3°51'30"E / 86 m | | | | | | | |
| G1 | mâle | <i>P. lessonae</i> | – | – | – | L | <i>P. lessonae</i> |
| G2 | mâle | <i>P. lessonae</i> | ae | SI | <i>P. kl. esculentus</i> | L | <i>P. kl. esculentus</i> |
| G3 | mâle | <i>P. lessonae</i> | ee | – | <i>P. lessonae</i> | L | <i>P. lessonae</i> |
| site : Champ des Vignes 50°41'37"N / 4°28'38"E / 80 m | | | | | | | |
| H1 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | ac | IF | <i>P. ridibundus</i> | C | <i>P. ridibundus</i> |
| H2 | immature | <i>P. ridibundus</i> | aa | II | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| H3 | immature | <i>P. ridibundus</i> | ac | – | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |

Tableau II (suite)
Table II (continued)

| Individu | Sexe | Identification de terrain | Analyse enzymatique | | | Analyse d'ADN | Synthèse |
|--|----------|---------------------------|---------------------|-----|--------------------------|---------------|--------------------------|
| | | | LDH-1 | MPI | Identification | | |
| H4 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | ac | IF | <i>P. ridibundus</i> | C | <i>P. ridibundus</i> |
| H5 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | ac | IF | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| H6 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | aa | IF | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| H7 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | ac | IF | <i>P. ridibundus</i> | C | <i>P. ridibundus</i> |
| H8 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | aa | IF | <i>P. ridibundus</i> | C | <i>P. ridibundus</i> |
| H9 | femelle | <i>P. ridibundus</i> | aa | IF | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| H10 | immature | <i>P. ridibundus</i> | aa | II | <i>P. ridibundus</i> | C | <i>P. ridibundus</i> |
| site : Manil 50°41'54"N / 4°35'46"E / 54 m | | | | | | | |
| L1 | femelle | <i>P. ridibundus</i> | – | – | – | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| L2 | femelle | <i>P. ridibundus</i> | – | – | – | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| L3 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | ac | IF | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| L4 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | aa | IF | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| L5 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | – | – | – | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| L6 | mâle | <i>P. kl. esculentus</i> | ae | SI | <i>P. kl. esculentus</i> | L | <i>P. kl. esculentus</i> |
| L7 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | cc | IF | <i>P. ridibundus</i> | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| site : Belvédère 50°40'26"N / 4°42'57"E / 130 m | | | | | | | |
| M1 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | – | – | – | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| M2 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | – | – | – | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| M3 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | – | – | – | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| M4 | femelle | <i>P. ridibundus</i> | – | – | – | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| M5 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | – | – | – | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| M6 | femelle | <i>P. ridibundus</i> | cc | IF | <i>P. ridibundus</i> ? | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |
| M7 | mâle | <i>P. ridibundus</i> | cc | IF | <i>P. ridibundus</i> ? | E1 | <i>P. cf. bedriagae</i> |

• **type L⁺** : les notes, nombreuses, sont fondues en un « raclement », le motif est modulé en amplitude et en fréquence, il est souvent plus long ; il se rapproche du type 5 de Carrière 1999.

Par contre, les chants de type R de notre région nous sont apparus, à l'oreille, très semblables dans l'ensemble, à une exception près (voir § IV.C.2.c).

2. Analyses bioacoustiques

Une centaine de chants de grenouilles vertes ont été enregistrés sur les huit sites ayant fait l'objet de capture : ces enregistrements ont permis l'analyse de 161 motifs de chant de bonne qualité, provenant de 48 individus. De plus, huit séquences, provenant d'autres sites, ont également été étudiées.

Pour chaque motif de chant, les graphiques et paramètres associés (tels que décrits au § II.D) ont été déterminés. Le grand nombre de données brutes qui en résultent permet

Tableau III : Analyse de sept caractères morphologiques. La première colonne fournit, pour chaque taxon, les pourcentages des individus présentant les diverses modalités du caractère observé. La deuxième colonne donne, pour chaque modalité, les pourcentages des individus des divers taxons présentant cette modalité.

Table III: Analysis of seven morphological characters. The first column gives, for each taxon, the percentages of frogs having the various modalities of a given character. The second column gives, for each modality, the percentages of frogs, within the various taxa, having this modality.

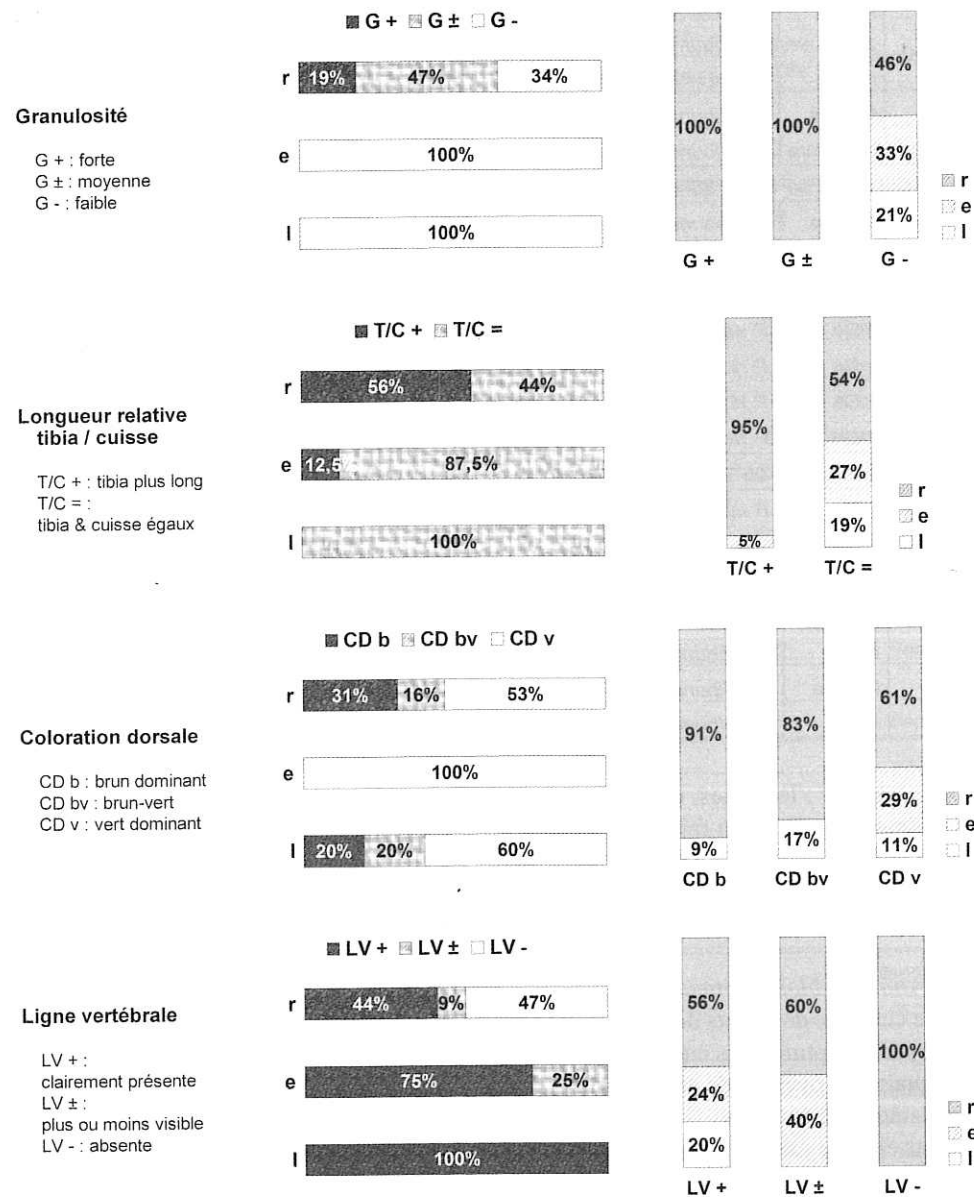
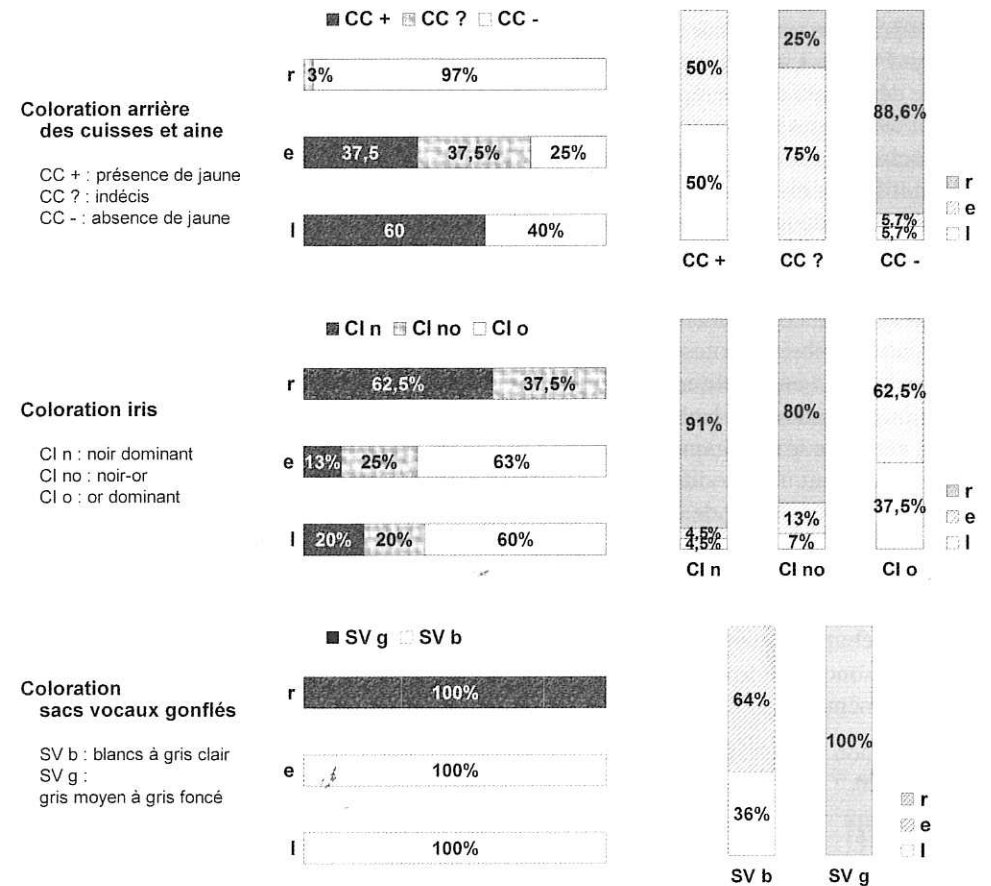


Tableau III (suite)
Table III (continued)



d'évaluer objectivement la fiabilité des divers paramètres acoustiques, travail qui, à notre connaissance, n'a pas encore été fait explicitement.

Avant d'aborder cette question, rappelons que Schneider et Sinsch (1992, 1999) ont montré (sur leurs échantillons de *Pelophylax ridibundus* et *P. bedriagae*) que les paramètres $n1$, $n2$, $n3$ et u dépendaient de la température de l'eau, tandis que $m1$, $m2$, $m3$, s et t n'en dépendaient pas significativement. Ce sont donc ces cinq dernières variables qui ont été utilisées par ces auteurs. Malgré sa légère dépendance à la température, le paramètre u (plus exactement, son inverse v) a été employé avec succès par Lodé (2001). Nous l'utiliserons également dans ce travail, sachant que la marge des températures mesurées par Schneider et Sinsch (1999) lors de leurs recherches est de 13° C à 29° C environ, alors que nous avons travaillé sous des températures de 20° C à 25° C (à une exception près).

Nos résultats montrent que l'évaluation, sur un oscillogramme, des paramètres $m1$, $m2$, $m3$, s (et donc u et v) est aisée et précise (sauf fort bruit de fond) : pour les durées, les chiffres

sont valables à moins de 0,01 s près – sauf cas exceptionnel – quelque fois à 0,001 s près. Par contre, estimer $n1$, $n2$, $n3$ est plus délicat. En effet, du fait de la persistance des émissions sonores de l'animal, les intervalles entre notes (ou « silences ») présentent une intensité sonore supérieure au bruit de fond et il n'est pas évident d'évaluer la fin ou le début d'une note (voir Fig. 3). La précision de ces paramètres est donc moindre, ce qui, conjugué à leur caractère dépendant de la température, en réduit l'intérêt.

Pour les mêmes raisons, nous constatons que l'évaluation de la variable t n'est pas toujours précise. Toutefois, comme sa valeur varie beaucoup d'une note à l'autre au sein d'un même motif (voir ci-après), l'imprécision de lecture de ce paramètre a peu de conséquence sur son évaluation moyenne. Il pourra donc être utilisé.

Pour les grenouilles vertes étudiées dans ce travail, le chant d'un même individu, enregistré au même moment, donc dans les mêmes conditions, varie le plus souvent significativement. Les motifs d'une même séquence de chant diffèrent fortement par leurs paramètres acoustiques (nombre de notes, durée,...) et par leur fréquence dominante, ainsi que parfois par la modulation en amplitude ou en fréquence. Sur la figure 4 par exemple, on constate la variation importante de la durée des motifs (326 à 702 ms \pm 5 ms) et du nombre de notes (7 à 12), ainsi que le changement de la modulation en amplitude de l'enveloppe sonore. On observe également une modification du spectre au fil des motifs : la fréquence dominante devient plus aiguë, passant de 1 875 Hz à 2 063 - 2 344 Hz, la seconde fréquence tend à diminuer, de 3 656 à 3 469 Hz, et la variation en fréquence (*crescendo-decrescendo*) des premiers motifs tend à disparaître. Soulignons que les motifs illustrés ont été choisis plus ou moins au centre de la séquence de chant : les différences seraient encore plus marquées si l'on tenait compte du début du chant (motifs courts et moins sonores) et de la fin (motifs d'abord plus « excités », sonores et longs, puis en extinction et se raccourcissant). Un tel cas n'est pas isolé : il est même fréquent, quel que soit le taxon considéré.

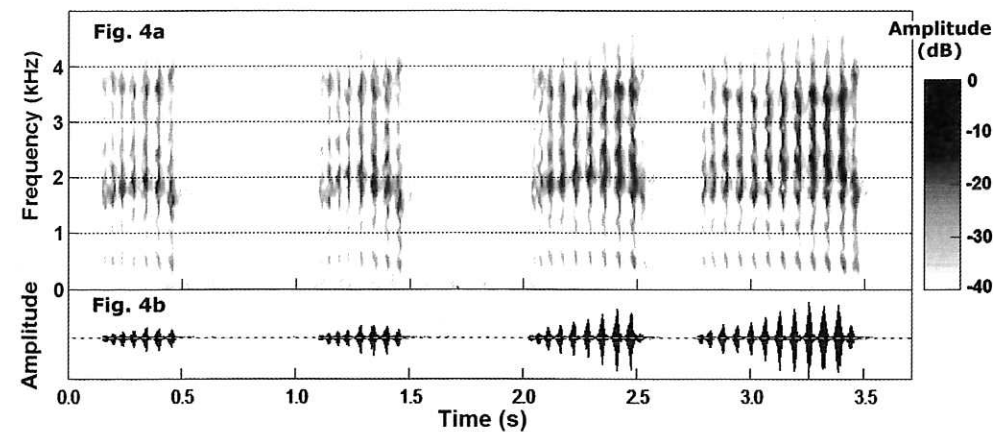


Figure 4 : Spectrogrammes (Fig. 4a) et oscillogrammes (Fig. 4b) de 4 motifs successifs extraits d'une même séquence de chant de 9 motifs : il s'agit de l'exemplaire H8 de *P. ridibundus* illustré à la figure 3. (Graphes réalisés à l'aide du logiciel Seewave).

Figure 4: Spectrograms (Fig. 4a) and oscillograms (Fig. 4b) of four successive pulse groups extracted from a call series of 9 pulse groups of the sample H8 (*P. ridibundus* illustrated in figure 3). (Graphs obtained with the help of the Seewave program).

La variabilité des paramètres acoustiques peut également se manifester au sein même d'un motif : par exemple, les valeurs calculées pour le nombre t d'impulsions de chaque note d'un même motif peuvent s'avérer fortement dispersées. Ainsi, dans le motif de 23 notes de l'exemplaire de *P. kl. esculentus* illustré à la figure 2, t varie de 4 à 9 (moyenne 6,7 et écart-type 1,2) ; dans le dernier motif de 12 notes de l'exemplaire H8 de *P. ridibundus* d'haplotype C illustré dans les figures 3 et 4, t varie de 13 à 24 (moyenne 20,3 et écart-type 3,5).

Ces résultats confirment la prudence avec laquelle il faut manier ces paramètres : s'il est bien connu que la température influence le chant, il apparaît que d'autres facteurs, moins contrôlables, peuvent également modifier profondément le chant d'un même individu. Ainsi, l'excitation de l'animal, notamment due à la présence de congénères proches, influe fortement sur son chant, au point d'en changer fondamentalement les paramètres bioacoustiques. Ceci nous a conduit à utiliser des valeurs moyennes de ces paramètres, calculées pour chaque individu, comme le font d'ailleurs d'autres auteurs (par exemple Schneider & Sinsch 1992, 1999).

En vertu de ce qui précède, nous prenons en compte, dans le présent travail, les variables suivantes : $m1$ (durée du motif) et $m2$ (intervalle entre motifs) exprimés en ms, u (quotient $s / m1$) en Hz, s (nombre de notes par motif) et t (nombre d'impulsions par note) ; étant la somme de $m1$ et $m2$, le paramètre $m3$ est écarté pour sa redondance.

Les paramètres $m1$, $m2$ et s traduisent la perception du chant que peut avoir une oreille exercée ; ils permettent de préciser cette impression par une évaluation aisée sur un oscillogramme ou un spectrogramme.

IV. DISCUSSION

A. Confrontation des résultats des divers moyens d'identification

I. Les résultats obtenus par analyse enzymatique et analyse d'ADN sont cohérents, sauf dans deux cas : les échantillons C2 et C3 sont attribués à *P. kl. esculentus* par l'analyse enzymatique et par l'identification « de terrain », alors qu'ils présentent un ADN mitochondrial de *P. ridibundus* originaire d'Europe de l'est.

Rappelons que, dans les systèmes hybridogénétiques (*L,E*) tels que ceux de nos régions, *P. kl. esculentus* porte presque toujours un ADN mitochondrial de *P. lessonae* (Plötner *et al.* 2008). En revanche, lorsque *P. ridibundus* est introduit dans ce système, de nouvelles lignées de *P. kl. esculentus* apparaissent (par exemple, Vorburger & Reyer 2003), qui peuvent être porteuses d'ADN mitochondrial de *P. ridibundus*. Un phénomène similaire peut expliquer la discordance observée sur les échantillons C2 et C3 : des hybridations auraient eu lieu entre les grenouilles indigènes et des *P. cf. bedriagae* sur le site concerné. De telles hybridations entre grenouilles vertes indigènes et exotiques sont signalées dans d'autres régions d'Europe occidentale (voir par exemple Pagano *et al.* 1997, Proess 2003, Vorburger & Reyer 2003, Holsbeek *et al.* 2008, Patrelle *et al.* 2011).

La confrontation des analyses enzymatiques et d'ADN livrent deux autres constats, qui pourraient être utiles à d'autres études :

- le locus MPI n'a donné aucun résultat (pas de zymogramme interprétable) pour tous les échantillons de *P. lessonae*. Cette absence de résultat ne se produit que dans trois autres cas : l'échantillon E1 provenant d'une ponte et les échantillons A1 et H3 correspondant à

deux immatures ayant l'haplotype de *P. ridibundus* et *P. cf. bedriagae*. Ceci est peut-être à mettre en relation avec le fait que l'haplotype de *P. lessonae* obtenu diffère des autres types de *P. lessonae* connus (voir § III.C), à moins que ces cas ne correspondent à des allèles nuls (C.-P. Guillaume, comm. pers.) ;

- les trois exemplaires de *P. ridibundus* dont le zymogramme obtenu pour la GPI diffère des autres (ils sont marqués d'un « ? », voir § III.B) ont, tous trois, des génotypes cc et IF pour les *loci* LDH-1 et MPI respectivement. Ils présentent l'haplotype E1 ou E2 de *P. cf. bedriagae*.

2. La lecture du tableau II montre que la séparation que nous avons faite sur le terrain entre taxons indigènes *P. kl. esculentus* et *P. lessonae* d'une part, et taxons non indigènes d'autre part, coïncide dans 100 % des cas avec les résultats des analyses enzymatiques et d'ADN... avec une nuance pour les échantillons C2 et C3, pour lesquels la discordance avec les analyses d'ADN a été expliquée plus haut : les nouvelles lignées de *P. kl. esculentus* observées dans nos régions ne sont pas discernables, sur le terrain, des *P. kl. esculentus* « indigènes ».

Notons que Holsbeek *et al.* (2009) et Jooris et Holsbeek (2010) obtiennent aussi une bonne séparation, sur le terrain, entre les taxons indigènes et exotiques, mais en incluant, parmi les critères, la forme du tubercule métatarsal, ce qui nécessite la capture des animaux.

Par contre, la distinction, sur le terrain, entre *P. kl. esculentus* et *P. lessonae* ne semble pas infaillible : deux individus F3 et G2 présumés *P. lessonae* (sur sept présumés tels) sont diagnostiqués *P. kl. esculentus* par les analyses enzymatiques LDH-1 et MPI.

En conclusion, pour la suite de la discussion, nous adoptons les identifications des animaux figurant à la colonne « synthèse » du tableau II.

B. Critères morphologiques pour identification à distance

Le tableau III, construit comme indiqué au § III.D, mène aux conclusions suivantes :

- **Granulosité de la peau du dos**

Ce critère n'est discriminant que dans la mesure où aucun *P. lessonae* ni *P. kl. esculentus* n'a de nette granulosité sur le dos. Mais il existe des populations de *P. ridibundus* ayant une faible granulosité (population M).

En conséquence : **granulosité dorsale forte ou moyenne** ⇒ (dans 100 % des cas) *P. ridibundus* ; **66 % des *P. ridibundus* ont une granulosité forte ou moyenne.**

- **Longueur du tibia par rapport à celle de la cuisse**

Ce critère n'est pas parfaitement discriminant. À une exception près, seul *P. ridibundus* a un tibia plus long que la cuisse. Mais il existe de nombreux *P. ridibundus* ayant tibia et cuisse sensiblement de même longueur. C'est souvent le cas chez les immatures et dans la population M.

En conséquence : **tibia > cuisse** ⇒ (dans 95 % des cas) *P. ridibundus* ; **56 % des *P. ridibundus* ont un tibia plus long que la cuisse.**

- **Couleur du dos**

La dominance de brun ou de vert est peu discriminante, même si la dominance du brun est plutôt caractéristique de *P. ridibundus*.

En conséquence : **dominance de brun** ⇒ (dans 91 % des cas) *P. ridibundus* ; **seulement 31 % des *P. ridibundus* ont une dominance de brun.**

- **Ligne vertébrale claire**

L'absence complète de ligne vertébrale ne se rencontre que chez *P. ridibundus*, mais il existe de très nombreux *P. ridibundus* qui en possèdent.

En conséquence : **ligne vertébrale totalement absente** ⇒ (dans 100 % des cas) *P. ridibundus* ; **seulement 47 % des *P. ridibundus* n'ont pas de ligne vertébrale.**

- **Couleur de l'arrière des cuisses et des aines**

Évaluer la présence de « jaune vif » est délicat, car cette teinte n'apparaît parfois que sur de très petites surfaces ; de plus, des nuances de jaune « non vif » sont parfois visibles. Mais *P. ridibundus* ne présente jamais de jaune vif.

En conséquence : **présence de jaune vif** ⇒ (dans 100 % des cas) *P. lessonae* ou *P. kl. esculentus* ; **60 % des *P. lessonae* et 37,5 à 70 % des *P. kl. esculentus* présentent du jaune vif.**

- **Couleur de l'iris**

Un réseau très dense de mouchetures noires sur un iris doré est plutôt caractéristique de *P. ridibundus*, mais il existe des *P. lessonae* ou *P. kl. esculentus* ayant l'œil très foncé. Par contre, l'iris très jaune ne se rencontre que chez *P. lessonae* ou *P. kl. esculentus*.

En conséquence : **iris à nette dominance or** ⇒ (dans 100 % des cas) *P. lessonae* ou *P. kl. esculentus* ; **60 % des *P. lessonae* et 63 % des *P. kl. esculentus* ont un iris doré.**

- **Sacs vocaux**

Lorsque les sacs vocaux peuvent être observés (bien gonflés, leur couleur est discriminante. En conséquence :

- sacs vocaux blancs à gris clair ⇔ *P. lessonae* ou *P. kl. esculentus*,
- sacs vocaux gris moyen à gris foncé ⇔ *P. ridibundus*.

Dans certains cas, il peut s'avérer difficile de trancher entre « gris moyen » et « gris clair » : l'incertitude de détermination de l'animal peut alors être levée par l'audition du chant, lorsque c'est possible.

Rappelons que l'évaluation des divers caractères a été faite en période de reproduction des grenouilles et qu'elle comporte une part de subjectivité. Il faut donc les utiliser avec prudence et procéder au recoupement de plusieurs critères pour obtenir une détermination fiable.

Les résultats ci-dessus confortent notre choix de critères pour une détermination à distance sur le terrain (Tab. I et commentaires au § II.B). Ils montrent aussi que, si la coloration du dos et la présence d'une ligne vertébrale sont des critères moins fiables, ils peuvent néanmoins participer à la détermination des taxons. Ces résultats accréditent les descriptions généralement données dans les livres d'identification (par exemple Günther 1996, ACE-MAV 2003a, Arnold & Ovenden 2004, Muratet 2008), tout en précisant leur degré de validité. Toutefois, ils contredisent l'affirmation de Muratet (2008) selon laquelle les « mâles de *P. lessonae* ont une robe uniformément vert jaunâtre (avec parfois quelques taches sombres

à l'arrière du corps et des cuisses), tandis que les femelles sont vertes à vert-jaune vif, ponctuées de taches noires (plus ou moins fusionnées) de part et d'autre d'une ligne médiane verte ». Est-ce à rapprocher du fait que l'haplotype « *lessonae* » de notre région est différent des haplotypes connus ailleurs (voir § III.C) ? La généralisation des résultats à d'autres régions d'Europe doit se faire avec prudence : O. Grosselet nous communique l'existence, dans l'ouest de la France et en Île de France, de *P. lessonae* et *P. kl. esculentus* sans ligne vertébrale ; un autre relecteur de notre travail connaît des populations de *P. kl. esculentus* ayant une peau moyennement granuleuse...

Notons que les deux critères « couleur du dos » et « présence d'une ligne vertébrale » sont aussi étudiés dans Jooris et Holsbeek (2010) : leurs résultats diffèrent légèrement des nôtres pour le premier (la dominance de brun étant un peu plus discriminant sur leur échantillon) et concordent pour le second.

C. Analyses acoustiques des chants

1. Corrélation entre les types de chant (déterminés à l'ouïe) et les taxons déterminés au laboratoire

De notre expérience de terrain et de sa confrontation au travail de Carrière (1999) et à divers enregistrements (Roché 1997, Carrière & Lescure 1999), nous avons, lors de nos déterminations à l'oreille en 2002, attribué les chants de type R à *P. ridibundus* (au sens large) et ceux de type L à *P. kl. esculentus* et *P. lessonae*. La validité de cette corrélation entre ces deux types de chants avec les deux groupes de taxons est confirmée par les analyses de laboratoire : tous nos enregistrements de type L qui ont été mis en correspondance (directe, indirecte ou probable) avec des individus déterminés en laboratoire se sont avérés être des chants soit de *P. lessonae*, soit de *P. kl. esculentus* et, de même, tous nos chants de type R mis en correspondance avec des individus identifiés en laboratoire se sont avérés être ceux de *P. ridibundus* ou *P. cf. bedriagae*. Ainsi, le seul critère – chant de type R ou L – permet de séparer avec certitude, sur le terrain, les mâles des taxons indigènes à la région étudiée (*P. kl. esculentus* et *P. lessonae*) de ceux introduits.

Par contre, si L⁻ correspond généralement à *P. kl. esculentus* et L⁺ à *P. lessonae*, cette distinction ne semble pas totalement fiable. En effet, les deux populations de Baudour (dans lesquelles ont été prélevés les échantillons F et G) étaient supposées ne renfermer que des *P. lessonae* : tous les chants qui y ont été entendus (dans le cadre de notre étude, mais aussi antérieurement) étaient de type L⁺ attribué, *a priori*, à ce taxon. Or, les analyses enzymatiques révèlent, dans chacune des populations, la présence d'au moins un individu *P. kl. esculentus* (F3 et G2). Il n'est toutefois pas possible d'en conclure qu'il existe des *P. kl. esculentus* dont le chant est de type L⁺, car F3 est une femelle et le mâle G2 est seulement en correspondance probable avec les chants entendus ou enregistrés. Nous ne pouvons donc en tirer de conclusion formelle.

Enfin, aucun lien entre les chants de type R et les différents taxons exotiques n'a pu être établi à l'oreille.

2. Analyses bioacoustiques

a. Caractérisation des chants de types L et R

Les oscillogrammes et les spectrogrammes des chants permettent de confirmer, tout en l'objectivant et en la précisant, la distinction qui a été faite, à l'écoute sur le terrain, entre chant de type L et de type R (Fig. 2 et Fig. 3 ou Fig. 4).

Le calcul des moyennes des paramètres *m1*, *m2*, *s*, *t*, *u* (voir § III.E.2), pour chaque individu enregistré, permet d'établir le tableau IV ; le paramètre *m2* (durée des silences entre les motifs) n'est pas repris car, selon notre analyse, il n'apporte guère d'information complémentaire à *m1* (durée des motifs).

Tableau IV : Comparaison des paramètres acoustiques des chants de type L (grenouilles vertes indigènes) et de type R (grenouilles vertes introduites).

Table IV: Confrontation of the bioacoustic parameters of call series of L-type (indigenous green frogs) and R-type (introduced green frogs).

| Type L | Type R |
|---|---|
| $s \geq 15$; médiane 25 | $s < 15$; médiane 8 |
| $u > 20$ Hz ; médiane 27 Hz | $u < 26$ Hz ; toutefois $u \leq 20$ Hz pour 89 % des <i>P. ridibundus</i> ; médiane 17 |
| $t < 12$; médiane 8,5 | $t > 12$ à une exception près ; médiane 17,5 |
| $419 \text{ ms} \leq m1 \leq 1\ 236 \text{ ms}$; médiane 830 ms | $226 \text{ ms} \leq m1 \leq 874 \text{ ms}$; médiane 480 ms |

Quoique les intervalles relatifs à *m1*, donnés dans le tableau IV, présentent un chevauchement important, on constate, dans la plupart des cas, des chants courts pour le type R et des chants près de deux fois plus longs pour L (voir aussi Fig. 5c) ; ceci est bien perceptible à l'écoute sur le terrain, ce qui conforte le choix de ce critère comme élément d'identification (Tab I).

Chacun des paramètres *s*, *t* et *u* est bien discriminant, comme le montrent le tableau IV et les figures 5a et 5b plus bas.

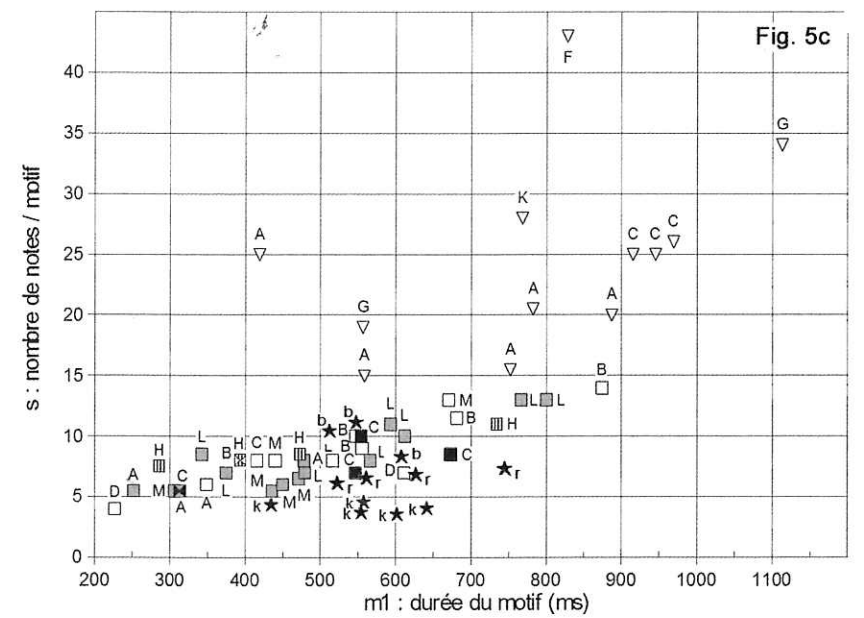
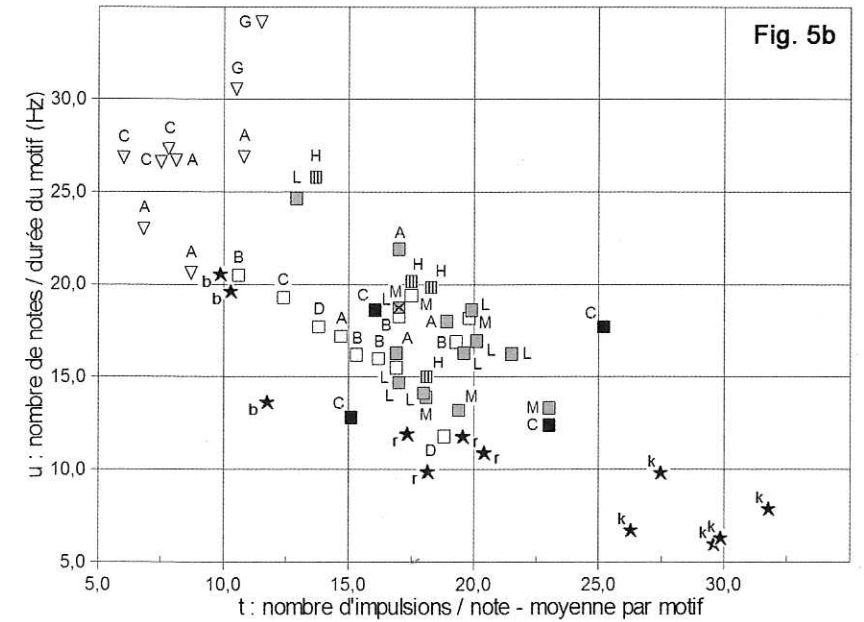
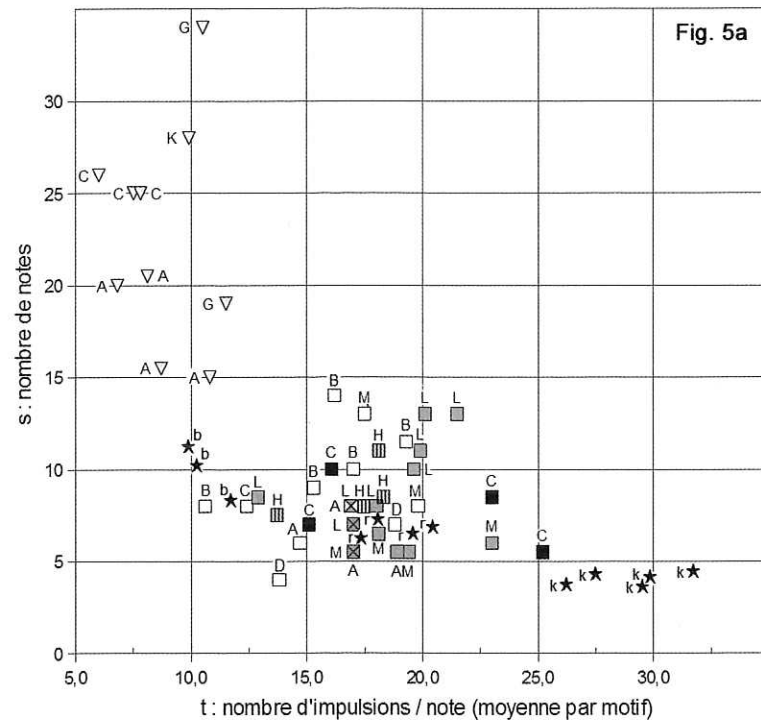
A ce propos, Lodé (2001) utilise le quotient $v = m1 / s$ pour distinguer, au chant, les taxons de la région qu'il a étudiée, notamment, *P. lessonae*, *P. kl. esculentus* et *P. ridibundus*. Comme nous utilisons ici l'inverse de *v*, le « tempo » $u = 1 / v$ (qui représente, à l'oreille, la « cadence » des notes), notre résultat rejoint celui de Lodé (*op. cit.*) et confirme le caractère discriminant de *u* et *v* entre les grenouilles vertes indigènes et exotiques de notre région.

Notons que les chants de *P. kl. esculentus* enregistrés sur le site du Grand Cortil, où les nouvelles lignées de *P. kl. esculentus* contenant du matériel génétique de grenouilles introduites ont été identifiées (échantillons C2 et C3), ne se distinguent guère de ceux des *P. kl. esculentus* indigènes.

Les oscillogrammes des chants de notre échantillon livrent aussi des différences qualitatives entre les deux types L et R. Les premiers (voir Fig. 2) présentent une enveloppe sonore typique : montée progressive de l'intensité sonore du motif, suivie d'une modulation de l'amplitude et une extinction brusque ; les silences entre les notes sont courts, parfois guère visibles (surtout chez *P. lessonae*). Les seconds (voir Fig. 3 et Fig. 4) se distinguent par

Figure 5 : Représentation graphique des couples de valeurs (t,s) (Fig. 5a), (t,u) (Fig. 5b) et ($m1,s$) (Fig. 5c) des paramètres acoustiques du chant de 48 grenouilles vertes. Chaque point représente la moyenne, sur une séquence de chant de chaque individu, des deux paramètres considérés. Les lettres capitales désignent les sites d'enregistrement (voir Tab. II). Les triangles inversés se réfèrent aux chants de type L, les carrés aux chants de type R. Les carrés blancs concernent les exemplaires qui n'ont pas fait l'objet d'une analyse génétique ; les carrés gris correspondent à l'haplotype E1, les noirs à l'haplotype E2 et les rayés à l'haplotype C. Dans le cas où deux individus présentent les mêmes paramètres, la superposition des carrés est signalée par la présence de traits diagonaux. A titre de comparaison, des étoiles ont été ajoutées représentant les paramètres moyens de 12 populations étudiées dans Schneider et Sinsch (1992) : les lettres b , r et k désignent respectivement les taxa *Pelophylax bedriagae*, *P. ridibundus* et *P. kurtmuelleri*. (Graphes réalisés à l'aide du logiciel Seewave).

Figure 5: Graphic representation of the pairs of values (t,s) (Fig. 5a), (t,u) (Fig. 5b) and ($m1,s$) (Fig. 5c) of the acoustic parameters from the call series of 48 green frogs. Each point stands for the mean of the parameters, computed for a call sequence of each sample. The capital letters refer to the recording place (see Tab. II). The triangles correspond to the calls of L-type, squares to the calls of R-type. White squares indicate a calling frog for which no genetic analysis is available; grey squares correspond to a sample with the haplotype E1, black squares to the haplotype E2 and lined squares to the haplotype C. When two frogs have the same acoustic parameters, the corresponding coinciding squares are highlighted by diagonal lines. In order to make comparisons possible, stars have been added to represent the mean parameters of 12 populations studied in Schneider and Sinsch (1992): letters b , r and k stand respectively for the taxa *Pelophylax bedriagae*, *P. ridibundus* and *P. kurtmuelleri*. (Graphs obtained with the help of the Seewave program).



les silences entre les notes bien marqués, conduisant à des notes bien détachées, à un chant saccadé. Ce critère figure d'ailleurs dans le tableau I. En outre, les chants de type R présentent une enveloppe sonore variable : le plus souvent, l'intensité est importante dès le début et l'extinction est lente.

Les spectrogrammes, par contre, n'apportent guère de critères supplémentaires différenciant les chants de types L et R. En effet, ces diagrammes sont très variables d'un individu à l'autre et même d'un motif à l'autre, au sein d'une même séquence de chant d'un même individu. Les valeurs des fréquences dominantes que nous obtenons sont cohérentes avec celles de Schneider et Sinsch 1992, qui n'avaient pas pu déceler de différence entre ces fréquences au sein des chants des divers taxons. Pour y parvenir, il faut donc recourir à des analyses plus fines, telles que celle de Wycherley *et al.* (2002).

b. Distinction au sein des chants de type L

Le nombre de chants de type L⁺ de bonne qualité que nous avons pu enregistrer est insuffisant pour en tirer des informations utilisables. Néanmoins, il semble que la distinction entre les chants de type L⁻ et L⁺ puisse être objectivée par le seul paramètre *u* ($u > 30$). Ceci rejoint le travail de Lodé 2001 (figure 2 de son article). De plus, l'analyse que nous avons effectuée des divers enregistrements de *P. lessonae* et *P. kl. esculentus* disponibles (Roché 1997, Carrière & Lescure 1999, Jooris 2002, ACEMAV 2003b) confirme l'intérêt de *u* (et aussi de *s*) pour la distinction des deux taxons.

Remarquons enfin que les chants de *P. lessonae* présentent une quasi-absence de silences entre les notes et une grande irrégularité de l'intensité des impulsions, ce qui rend la distinction entre notes et impulsions délicate. Ainsi, pour ce taxon, Wycherley *et al.* (2002) assimilent note et impulsion, tandis que d'autres auteurs comme Jooris et Holsbeek (2010) se basent sur les impulsions d'intensité maximale pour séparer les notes, option qui est également la nôtre.

c. Distinction au sein des chants de type R

La figure 5 montre que les taxons non indigènes ne peuvent être séparés sur base des paramètres du chant : les exemplaires provenant d'un même site, de même que ceux correspondant à une même identification génétique, y sont représentés par des points dispersés et entremêlés.

Néanmoins, en 2001, les individus observés sur le site du Belvédère ont été soupçonnés appartenir à l'espèce *Pelophylax bedriagae* (Kok *et al.* 2002) du fait de leur chant très rapide et soutenu⁽²⁾ : nombres de notes plus importants, rythme plus précipité. Ceci n'a pas été confirmé l'année suivante : les enregistrements effectués sur le même site sont proches de ceux des autres chants de grenouilles exotiques (Fig. 5). De plus, l'haplotype mitochondrial de tous les individus capturés est l'haplotype E1 de *P. cf. bedriagae* ; cet haplotype est clairement différent de celui de *P. bedriagae* (Torsten Ohst comm. pers., Akin *et al.* 2010). Ces résultats conduisent à remettre en cause l'identification faite en 2001... à moins que les éventuels *P. bedriagae* aient été supplantés par les grenouilles vertes de la pépinière aquatique voisine,

⁽²⁾ De plus, si leur morphologie répondait aux critères de *P. ridibundus* du tableau I, elles différaient toutefois des autres *P. ridibundus* rencontrés : plus trapues, elles ressemblaient aux « grenouilles d'Égypte » vendues dans une animalerie en Flandres (voir photo dans Jooris & Holsbeek 2010).

d'autant plus que la physiologie du plan d'eau s'est modifiée (colonisation complète par des massettes). Notons encore que les deux individus de ce site qui ont fait l'objet d'une analyse enzymatique présentent un locus GPI différent des autres (voir § IV.A.1), ce qui pourrait corroborer que ces grenouilles sont « différentes » des autres grenouilles introduites. Nous ne pouvons trancher la question.

Comparons enfin nos résultats à la classification de Carrière (1999) : il apparaît que le chant de type 2 de ce dernier correspond à la plupart des oscillogrammes de type R que nous avons obtenus, en particulier celui de la figure 3a, qui est exactement celui de l'individu H8, déterminé en laboratoire (« correspondance directe ») comme un *P. ridibundus* d'Europe centrale (haplotype C). Une analyse bioacoustique des enregistrements de Carrière et Lescure (1999) confirme ce rapprochement. Nous pouvons donc affirmer que le chant de type 2, que Carrière (1999) avait attribué, sans certitude, à *P. kl. grafi*, est très probablement un chant de *P. ridibundus*, car il se différencie par ailleurs d'autres enregistrements de *P. kl. grafi* (Jooris 2002, ACEMAV 2003b) principalement par une fréquence dominante plus aiguë.

d. Comparaison des chants de type R obtenus ici avec ceux de Schneider et Sinsch (1992)

Schneider et Sinsch (1992) utilisent les paramètres *s*, *t*, *m1*, *m2* et *m3* pour séparer les grenouilles vertes du sud-est européen et de l'Asie mineure en trois groupes correspondant à *P. ridibundus*, *P. bedriagae* et *P. kurtmuelleri*.⁽³⁾ Puisque les analyses d'ADN de nos échantillons indiquent que les grenouilles exotiques de notre zone d'étude proviennent du centre et du sud-est de l'Europe, nous avons confronté nos analyses bioacoustiques aux données obtenues par Schneider et Sinsch (*op. cit.*). Pour ce faire, nous avons repris les valeurs des paramètres *m1*, *s*, *t* figurant dans la table 2 de Schneider et Sinsch (*op. cit.*), relatives aux 12 populations qu'ils ont étudiées, et nous avons calculé les valeurs de *u* correspondantes. Les données ainsi obtenues sont reportées, sous la forme de 12 points (symbolisés par des étoiles), dans un même diagramme avec nos propres données (Fig. 5). Notons que les valeurs de Schneider et Sinsch (*op. cit.*) concernent les moyennes des paramètres calculées par population, pour les 12 populations étudiées et non les moyennes de valeurs individuelles comme dans le cas de nos données. En effet, dans le cadre de notre étude, une moyenne sur les populations n'aurait pas de sens puisqu'il s'agit de déceler, au sein des populations, des grenouilles exotiques.

Ces diagrammes confirment clairement la conclusion citée plus haut que les paramètres *s*, *t*, *u* permettent la séparation de *P. lessonae* et *P. kl. esculentus* des autres taxons. Ils montrent également la séparation de nos *P. ridibundus* et *P. cf. bedriagae* du taxon gréco-yougoslave *P. kurtmuelleri* et, dans une moindre mesure, du taxon *P. bedriagae*, tant *via* le paramètre *u* que *via* *s* et *t*. Par contre, le paramètre *m1* apparaît de peu d'utilité pour la distinction au sein de nos grenouilles non indigènes, comme c'est aussi le cas pour les taxons analysés par Schneider et Sinsch (*op. cit.*).

En ce qui concerne l'aspect de l'oscillogramme, ces auteurs distinguent qualitativement les trois taxons susmentionnés par la forme de l'enveloppe sonore des notes et la longueur

⁽³⁾ Pour rendre l'énoncé de nos résultats plus clair, nous conservons ici cette terminologie pour ce groupe de grenouilles, quoique Speybroeck *et al.* 2010 propose de le rapprocher des grenouilles d'Europe centrale, dans l'attente d'une analyse plus fine du complexe *P. ridibundus*.

relative des silences inter-notes. Dans le cas des *P. ridibundus*, les silences sont bien marqués et l'amplitude des notes est « graduellement croissante, atteignant un maximum vers le milieu ou la fin et déclinant rapidement ». Ceci correspond à l'ensemble des chants de type R analysés dans notre travail, ce qui rapproche à nouveau nos grenouilles non indigènes des *P. ridibundus* de Schneider et Sinsch (1992). À propos des spectrogrammes, ces auteurs citent une fréquence dominante de 1 600 à 2 500 Hz, variant à travers le motif selon un U inversé, ainsi qu'une fréquence secondaire souvent présente vers 400 Hz. Ceci est également conforme aux observations faites sur nos échantillons non indigènes. Enfin, la comparaison de nos données avec celles de Schneider et Sinsch (1999) fournit des résultats similaires : les chiffres de la figure 3 de cet article confortent les valeurs limites que nous donnons au tableau IV pour les chants de type R.

V. CONCLUSIONS

La confrontation des diverses analyses effectuées sur huit sites de Wallonie montre que :

1. Les grenouilles exotiques trouvés sur ces huit sites sont des *P. ridibundus* du centre de l'Europe et des *P. cf. bedriagae* provenant d'Anatolie, du nord de la Grèce ou de la Bulgarie ; deux haplotypes mitochondriaux différents de ces dernières sont présents dans l'échantillon (Ohst, comm. pers.). On peut donc affirmer que des grenouilles provenant d'au moins deux régions différentes ont été introduites en Wallonie : grenouilles d'Europe centrale et grenouilles provenant d'Anatolie, de Grèce ou de Bulgarie, ces dernières étant les plus abondantes. Ceci est compatible avec les origines que nous avons pu identifier précédemment (Percsy & Percsy 2002a), en questionnant les propriétaires ou les gestionnaires des étangs dans lesquels des grenouilles vertes exotiques étaient présentes.

Signalons que, sur les six populations étudiées qui renferment des grenouilles exotiques, un site seulement comporte deux haplotypes exotiques distincts. Ceci semblerait indiquer que le mélange, dans la nature, des grenouilles vertes d'origines différentes est moins important qu'on ne le croit, alors que la colonisation de la région par les taxons exotiques remonte à plus de 20 ans (Percsy & Percsy 2002a). Un échantillonnage plus large serait toutefois nécessaire pour confirmer ce constat.

Notons aussi que la répartition des grenouilles de type « *P. cf. bedriagae* » en Flandres (Jooris & Holsbeek 2010) se situe principalement sur les bassins de la Senne et de la Dyle, cours d'eau qui proviennent du Brabant wallon, zone d'introduction de ce taxon dans les années 80. Sans doute, les grenouilles se sont-elles déplacées vers l'aval des vallées, au départ des populations wallonnes.

2. La méthode d'identification de terrain que nous avons choisie (critères explicités au tableau I) permet de séparer dans 100 % des cas, les taxons exotiques d'une part et les taxons indigènes d'autre part. Par contre, la distinction entre *P. lessonae* et *P. kl. esculentus* semble moins fiable et il n'est pas possible de discerner les diverses grenouilles exotiques entre elles. Cette méthode d'identification de terrain peut donc être appliquée pour des suivis de population à large échelle, le diagnostic pouvant être ensuite confirmé, quand nécessaire, par des analyses de laboratoire assez simples (Patrelle *et al.* 2011).

3. À partir de photographies des grenouilles identifiées génétiquement, une analyse « objective » de divers caractères morphologiques permet d'évaluer le degré de fiabilité de

ceux-ci pour la détermination spécifique (Tab. III). Il serait utile d'élargir l'échantillon étudié afin d'améliorer la portée de ces résultats.

4. L'analyse bioacoustique des chants fournit un moyen de séparation objectif entre grenouilles vertes indigènes et exotiques (mâles chanteurs) et montre que les paramètres *s* (nombre de notes par motif) et *t* (nombre d'impulsions par note) sont parfaitement discriminants ; le tempo *u* (rapport du nombre de notes par motif et de la durée du motif) l'est également dans une large mesure.

5. Les analyses de laboratoire révèlent qu'il y a eu hybridation entre *P. cf. bedriagae* et les grenouilles indigènes et que leur descendance est viable. Ceci confirme les observations déjà faites en France, Suisse, Luxembourg et Flandres (Pagano *et al.* 1997, Proess 2003, Vorburger & Reyer 2003, Holsbeek *et al.* 2008, Patrelle *et al.* 2011). Nos résultats semblent indiquer que distinguer, par la morphologie ou le chant, ces nouveaux hybrides des *P. kl. esculentus* indigènes n'est pas possible.

6. L'haplotype mitochondrial « *lessonae* » indigène en Wallonie est différent des autres haplotypes connus pour cette espèce (Ohst comm. pers.). Les analyses ont aussi montré que des populations qui étaient présumées ne renfermer que *P. lessonae*, comprenaient en fait quelques *P. kl. esculentus*.

Tous ces résultats valident les travaux antérieurs (Percsy & Percsy 2002a, b, 2007) montrant que des grenouilles vertes exotiques sont déjà largement répandues dans certaines régions de Wallonie et qu'il est devenu impossible de les éradiquer. Par contre, ces grenouilles semblent absentes dans une large partie de la Région wallonne, en particulier dans les écosystèmes oligotrophes où *P. lessonae* domine. De telles populations doivent être protégées, parce qu'elles sont moins fréquentes (Günther 1997) ; en outre, les résultats précédents montrent que l'haplotype « *lessonae* » en Wallonie est original. Comme, probablement, *P. ridibundus* ne colonisera pas spontanément de tels écosystèmes (Pagano *et al.* 2001), il est urgent d'éviter toute introduction dans ces zones. Pour cela, une surveillance des grenouilles vertes exotiques dans des régions cibles devrait être faite (parallèlement à des mesures générales, telles que le contrôle du commerce et l'information du public).

Le travail présenté ici mériterait donc d'être poursuivi à une plus grande échelle, afin de mieux connaître les grenouilles introduites en Wallonie et leur incidence sur notre herpétofaune. De plus, la présence suspectée de populations pures de *P. lessonae* (Burny & Parent 1985) devrait être confirmée et, si tel est le cas, des mesures particulières de protection de celles-ci devraient être prises.

Remerciements. – Nous remercions P. Joly et O. Grolet, du Laboratoire d'Écologie des hydrosystèmes fluviaux de l'Université Claude Bernard, Lyon I, pour les analyses enzymatiques de nos échantillons et J. Plötner et T. Ohst, du « Museum für Naturkunde der Humboldt-Universität zu Berlin », pour les analyses d'ADN mitochondrial. Nos remerciements vont également aux relecteurs de la première version de cet article, pour leurs remarques et suggestions constructives : O. Grosselet, C.-P. Guillaume, I. Ineich, A. Pagano et deux rapporteurs anonymes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACEMAV (collectif), Duguet R. & Melki F. (éds) 2003a – Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. Collection Parthénope, éditions Biotope, Mèze (France). 480 p.
- ACEMAV (collectif), Duguet R. & Melki F. (éds) 2003b – Guide sonore des Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. Collection Parthénope, éditions Biotope, Mèze (France), [CD audio], 68 min 30 s.
- Akin Ç., Can Bilgin C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S. N., Uzzell T., Bilgin M., Hotz H., Guex G.-D. & Plötner J. 2010 – Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *J. Biogeogr.* 37: 2111-2124.
- Arnold N. & Ovenden D. 2004 – Le guide herpéto. 199 amphibiens et reptiles d'Europe. Delachaux et Niestlé 2004. 288 p.
- Berger L. 1966 – Biometrical studies on the population of green frogs from the environs of Poznań. *Ann. Zool. Polsk. Akad. Nauk*, 23(11): 303-324.
- Boersma P. & Weenink D. 1992-2010 – Logiciel Praat (version 5.1.25 pour Windows) [en ligne] <http://www.fon.hum.uva.nl/praat> ou www.praat.org (Consulté le 1^{er} décembre 2012).
- Burny J. & Parent G.H. 1985 – Les Grenouilles vertes de la Belgique et des régions limitrophes. Données chorologiques et écologiques. *Alytes*, 4(1): 12-33.
- Bour R., Cheylan M., Crochet P.-A., Geniez P., Guyétant R., Haffner P., Ineich I., Naulleau G., Ohler A.-M. & Lescure J. 2008 – Liste taxinomique actualisée des Amphibiens et Reptiles de France. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 126: 37-43.
- Carrière M. 1999 – Contribution à l'étude des Grenouilles vertes de Poitou-Charente et Vendée. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 92: 29-44.
- Carrière M. & Lescure J. 1999 – Contribution à l'étude des grenouilles vertes par leurs chants. Guide sonore (document de travail). [CD audio], 21 min 47 s.
- Frost D.R., Grant T., Faivovich J., Bain R.H., Haas A., Haddad C.F.B., De Sà R.O., Channing A., Wilkinson M., Donnellan S.C., Raxworthy C.J., Campbell J.A., Blotto B.L., Moler P., Drenes R.C., Nussbaum R.A., Lynch J.D., Green D.M. & Wheeler W.C. 2006 – The Amphibian tree of life. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 297: 2-371.
- Günther R. (éd) 1996 – Die Amphibien und Reptilien Deutschlands. Gustav Fischer, Jena. 825 p.
- Günther R. 1997 – *Rana kl. esculenta*, *Rana lessonae*, *Rana ridibunda*. In : *Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe*. Gasc J.P., Cabela A., Crnobrnja-Isailovic J., Dolmen D., Grossenbacher K., Haffner P., Lescure J., Martens H., Martínez Rica J.P., Maurin H., Oliveira M.E., Sofianidou T.S., Veith M. & Zuiderwijk A. (éds), pp. 138-139, 148-149, 154-155. Societas Europaea Herpetologica & Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. 496 p.
- Holsbeek G., Mergeay J., Hotz H., Plötner J., Volckaert F.A.M. & De Meester L. 2008 – A cryptic invasion within and invasion and widespread introgression in the European water frog complex : consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation. *Mol. Ecol.*, 17: 5023-5035.
- Holsbeek G., Maes G.E., De Meester L. & Volckaert F.A.M. 2009 – Conservation of the introgressed European water frog complex using molecular tools. *Mol. Ecol.*, 18: 1071-1087.
- Jooris R. 2002 – *Pelophylax* : de groene wachters aan de waterkant. Natuurpunt, Mechelen. [CD audio], 13 min 30s.
- Jooris R. & Holsbeek G. 2010 – Groenen kikkers in Vlaanderen en het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Rapport Natuur.studie 2010/2, Mechelen. 81 p.
- Kok P., Jooris R., Percsy C. & Lenglet G. 2002 – Dangers pour la faune indigène de l'introduction d'espèces animales à des fins ornementales : *Rana bedriagae* (Amphibia : anura : Ranidae), un futur cas d'école ? Actes du symposium : Faune belge : état des lieux et tendances observées avec une attention particulière pour les espèces exotiques. *Bull. Inst. R. Sci. Nat. Belg.*, 72 (suppl.): 219-221.
- Lodé T. 2001 – Character convergence in advertisement call and mate choice in two genetically distinct water frog hybridogenetic lineages (*Rana kl. esculenta*, *R. kl. grafi*). *J. Zool. Syst. Ecol. Res.*, 39: 91-96.
- Mazzoni D., Dannenberg R. et collaborateurs 1999-2012 – Logiciel Audacity (version 2.0.0 pour Windows) [en ligne] <http://audacity.sourceforge.net> (Consulté le 1^{er} décembre 2012).
- Muratet J. 2008 – Identifier les Amphibiens de France métropolitaine. Ecodiv, France. 291 p.
- Pagano A. & Joly P. 1999 – Limits of the morphometric method for field identification of water frogs. *Alytes*, 16(3-4): 130-138.
- Pagano A., Joly P. & Hotz H. 1997 – Taxon composition and genetic variation of water frogs in the Mid-Rhône floodplain. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life sciences*, 320: 759-766.
- Pagano A., Joly P., Plénet S., Lehman A. & Grolet O. 2001 – Breeding habitat partitioning in the *Rana esculenta* complex : the intermediate niche hypothesis supported. *Ecoscience*, 8(3): 294-300.
- Parent G.H. 1984 – Atlas des batraciens et reptiles de Belgique. *Cah. Ethol. Appl.*, 4(3): 1-198.
- 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. Res.*, 11: 200-205.
- Percsy C. 1998 – Amphibiens et reptiles en Région de Bruxelles-Capitale : bilan de six années de suivi. In : Qualité de l'Environnement et Biodiversité en Région de Bruxelles-Capitale. Inventaire et suivi de la faune et de la flore. Institut bruxellois pour la gestion de l'environnement (Bruxelles), pp. 101-106. Document de travail de l'Institut des Sciences Naturelles de Belgique 93, Bruxelles, 185 p.
- Percsy C. & Percsy N. 2002a – Dix ans de suivi des populations indigènes et introduites de grenouilles « vertes » (*Rana (Pelophylax) ssp.*, Anura, Ranidae) dans le bassin de la Lasne (Brabant wallon, Belgique). *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 103: 59-72.
- Percsy C. & Percsy N. 2002b – Évolution des populations indigènes et introduites de grenouilles « vertes » en Brabant wallon. Actes du symposium : Faune belge : état des lieux et tendances observées avec une attention particulière pour les espèces exotiques. *Bull. Inst. R. Sci. Nat. Belg.*, 72 (suppl.): 213-218.
- Percsy C. & Percsy N. 2007 – Le groupe des « grenouilles vertes », le *synklepton* « grenouille de Lessona - grenouille verte », la grenouilles rieuse. In : Jacob J.-P., Percsy C., de Wavrin H., Graitson E., Kinet T., Denoël M., Paquay M., Percsy N. & Remacle A. (éds), Amphibiens et Reptiles de Wallonie. Série « Faune - Flore - Habitats » n° 2, pp. 164-169, 170-179, 298-303. Aves-Raîne et MRW-DGRNE (Ministère de la Région wallonne - Direction Générale des Ressources naturelles et de l'Environnement). Namur. 386 p.
- Plötner J., Becker C. & Plötner K. 1994 – Morphometric and DNA investigations into European water-frogs *Rana kl. esculenta* *Synklepton* (Anura, Ranidae) from different population systems. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 32: 193-210.
- Plötner J., 2005 – Die Westpaläartischen Wasserfrösche. *Beih. Z. Feldherpetol.*, 9: 1-160.
- Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolski C., Ohst T., Litvinchuk S.N., Guex G.-D., Reyher H.-U & Hotz H. 2008 – Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in Palearctic water frogs. *J. Evol. Biol.*, 21: 668-681.
- Proess R. 2003 – Verbreitungsatlas der Amphibien des Großherzogtums Luxemburg. Travaux scientifiques du Musée national d'histoire naturelle Luxembourg. *Ferrantia*, 37: 1-89.
- R Core Team (2008) – R : A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Logiciel R (version 2.7.1. pour Windows) [en ligne] <http://www.R-project.org> (Consulté le 1^{er} décembre 2012).
- Roché J. C. 1997 – Au Pays des grenouilles. Guide sonore. Sittelle, Le Verdier. CD audio. 73 min.
- Schneider H. & Sinsch U. 1992 – Mating call variations in lake frogs referred to as *Rana ridibunda* Pallas, 1771: taxonomic implications. *J. Zool. Syst. Evol. Forsch.*, 30: 297-315.

Schneider H. & Sinsch U. 1999 – Taxonomic reassessment of Middle Eastern water frogs : Bioacoustic variation among populations considered as *Rana ridibunda*, *R. bedriagae* or *R. levantina*. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 37: 57-65.

Speybroeck J., Beukema W. & Crochet P.-A. 2010 – A tentative species list of the European herpetofauna (*Amphibia* and *Reptilia*): an update. *Zootaxa*, 2492: 1-27.

Sueur J., Aubin T. & Simonis-Sueur C. 2008 – Logiciel Seewave (version 1.4.8 pour Windows) [en ligne] <http://sueur.jerome.neuf.fr/seewave.html> (Consulté le 1er décembre 2012).

Tunner H.G. 1973 – Das Albumin und andere Bluteiweisse bei *Rana ridibunda* (Pallas), *Rana lessonae* (Camerano), *Rana esculenta* (Linné) und deren Hybriden. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.*, 11: 219-233.

Uzzell T. & Berger L. 1975 – Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and their hybridogenetic associate, *Rana esculenta*. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.*, 127: 13-24.

Vorburger C. & Reyer H.-V. 2003 – A genetic mechanism of species replacement in European waterfrogs ? *Conserv. Genet.*, 4: 141-155.

Wahl M. 1969 – Untersuchungen zur bio-Akustik des Wasserfrosches *Rana esculenta*. *Oecol. Berl.*, 3: 14-55.

Wycherley J., Doran S. & Beebee T.J.C. 2002 – Male advertisement call characters as phylogeographical indicators in European water frogs. *Biol. J. Linn. Soc.*, 77: 355-365.

Manuscrit accepté le 4 avril 2013



Grenouille verte exotique *Pelophylax* sp., site du Champ des Vignes, 2002. Photo des auteurs.
Alien water frog *Pelophylax* sp., Champ des Vignes, 2002. Picture of the authors.