



HAL
open science

Les complexes d'hybridation chez les grenouilles vertes : identification génétique, exigences écologiques, et capacités d'acclimatation

Cécile Patrelle

► **To cite this version:**

Cécile Patrelle. Les complexes d'hybridation chez les grenouilles vertes : identification génétique, exigences écologiques, et capacités d'acclimatation. Biologie animale. Université d'Angers, 2010. Français. NNT: . tel-00967971

HAL Id: tel-00967971

<https://theses.hal.science/tel-00967971>

Submitted on 31 Mar 2014

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

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

Thèse de Doctorat de l'Université d'Angers

Spécialité : Biologie des Organismes
Ecole Doctorale : VENAM

Les complexes d'hybridation chez les grenouilles vertes : identification génétique, exigences écologiques, et capacités d'acclimatation

Présentée et soutenue publiquement
Le 24 septembre 2010 à l'Université d'Angers

Par Cécile PATRELLE



Devant le jury ci-dessous :

M. Gaston-Denis GUEX, Senior Scientist, Université de Zurich
M. David LESBARRERES, Professeur Associé, Université Laurentienne
M. Claude MIAUD, Professeur, Université de Savoie
M. Jean CLOBERT, Directeur de Recherche CNRS, SEEM
M. Alain PAGANO, Maître de Conférences HDR, Université d'Angers
M. Rémi HELDER, Responsable de Recherche, 2C2A-CERFE

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur
Co-encadrant

Remerciements

Au terme de ces trois ans (et des poussières) passés au sein du Laboratoire d'Etude Environnementale des Systèmes Anthropisés de l'Université d'Angers (LEESA), et au Centre de Recherche et de Formation en Ecoéthologie de la Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise (le 2C2A-CERFE), je tiens à exprimer ici mes remerciements et ma plus profonde gratitude à tous ceux qui, par leur aide ou simplement la sympathie qu'ils m'ont témoignée, ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Cette thèse a bénéficié du soutien financier apporté par la Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise et le LEESA. Je n'aurais pu la conduire à bien sans l'attribution d'une bourse d'étude cofinancée par le Conseil Général des Ardennes, et le LEESA que je remercie ici vivement.

Mes remerciements vont également au Gaston-Denis GUEX, Senior Scientist à l'Université de Zurich, et à David LESBARRERES, Professeur Associé à l'Université Laurentienne (rapporteurs), ainsi qu'à Claude MIAUD, Professeur à l'Université de Savoie, et à Jean CLOBERT, Directeur de Recherche au sein de la Station d'Ecologie Expérimentale du CNRS à Moulis (examineurs), pour leurs avis et critiques constructives sur ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux au Dr. Alain PAGANO, directeur de ma thèse, pour son encadrement durant ces trois années et demie d'étude. Merci d'avoir rendu possible la cotutelle avec le 2C2A-CERFE, et de m'avoir donné les moyens de réaliser cette étude. Grâce à lui, j'ai pu travailler sur ce modèle biologique passionnant qu'est le complexe hybridogénétique des grenouilles vertes. Son encadrement m'a permis d'acquérir une grande autonomie.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie à Rémi HELDER, co-encadrant de ce travail et directeur du 2C2A-CERFE, et à Marie-Lazarine POULLE, directrice adjointe, qui m'ont accueillis dans leur équipe et ont mis à ma disposition les moyens humains, matériels et financiers nécessaires au bon déroulement de cette étude. Je les remercie tous deux pour cet accueil chaleureux, mais aussi pour leurs conseils et leur soutien tout au long de ces trois et demi de thèse. Je tiens à mentionner ici le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de leur structure qui est à leur image, pleine d'énergie, de dynamisme, de connaissances, de professionnalisme et de dialogue.

Je n'oublie pas non plus mes stagiaires, qui se sont tous énormément investie dans leur travail, et qui sont devenu de très bons amis :

- Un énorme merci à Thomas SIRE, stagiaire « grenouilles vertes » de M1 au 2C2A-CERFE pour la campagne de terrain de 2007. Il a été mon binôme durant 3 mois de terrain intense pour toutes les collectes de grenouilles, mais aussi les inventaires et les analyses d'eau. Ces grandes compétences naturalistes, ses sacrés coup d'épuisette, et son sens relationnel développé ont permis un travail efficace et très agréable. Colocataire dynamique et cuisinier hors pair, il a apporté sa motivation, sa bonne humeur, et son aide à toute la station.

- Merci à Marc MANGEAT, stagiaire de M1 au LEESA durant la campagne 2008, qui a réalisé la caractérisation de l'habitat des grenouilles vertes. La qualité de son travail et son professionnalisme digne des plus grands Bureaux d'études m'ont énormément aidé durant cette seconde année de thèse. Sa participation à la révision des fiches habitat, son investissement sans limite, et son souci du détail ont été une aide précieuse. Ce spécialiste du « camping roots » a été d'un réel soutien lors de la campagne éclair de terrain en Espagne, et nous a permis d'effectuer un échantillonnage efficace.

- Merci enfin à Alban GERARD, stagiaire de M1 au LEESA durant la campagne 2008, qui a réalisé les captures et mesures de grenouilles vertes. Son enthousiasme et sa bonne humeur légendaire lui ont permis de s'intégrer très rapidement au sein du laboratoire, où il se sentait « comme à la maison ». Très désireux de découvrir le monde de la recherche, il a en plus participé à l'un des élevages expérimentaux de la thèse (chapitre 6). Sa bonne volonté, sa disponibilité et sa grande écoute m'ont permis d'avancer dans ma thèse dans une atmosphère très agréable.

Mes pensées les plus reconnaissantes d'adressent à trois amies proches, Bérengère Tricoire, Audrey Chaput-Bardy, et Audrey Trochet pour leur soutien durant ces années de recherche. Toutes trois dans le domaine de l'écologie, et même de la recherche pour deux d'entre elles, elles m'ont beaucoup aidé durant les moments délicats, de fatigue et de doutes, allant jusqu'à m'héberger volontiers lors de l'incendie de mon immeuble. Merci à Audrey Chaput-Bardy pour sa collaboration dans l'écriture de l'article traitant de la plasticité phénotypique (chapitre 6), ainsi qu'à Audrey Trochet, spécialiste du SIG, pour ces cartes de répartition de « mes » grenouilles vertes.

Je souhaite également remercier Stéphane SOURICE, Assistant Ingénieur au LEESA, qui a toujours fait le maximum afin de nous permettre de travailler dans de bonnes conditions. Son dévouement, sa curiosité, et ses compétences en aquariophilie ont fait de Stéphane un excellent collaborateur, avec qui j'ai énormément apprécié de travailler. A l'écoute et volontaire, il est le coach mental de ce laboratoire et notre protecteur.

Je remercie Vivianne HARDOUINNEAUX, technicienne au LEESA, qui a veillée sur mes têtards comme une maman sur ces enfants. En quelques jours, elle est devenue une véritable spécialiste de la technique de squelettochronologie, jusqu'à être la seule à maîtrisée la « bête » de cryomicrotome.

J'adresse mes remerciements à Olivier PAYS-VOLARD pour ces précieuses recommandations lors des analyses statistiques, et pour sa collaboration à l'écriture d'un article. Ancien thésard du 2C2A-CERFE lui-même, il a toujours été de bons conseils pour ma carrière.

Merci à Damien PICARD pour sa collaboration non négligeable lors de la mise au point de notre nouvelle méthode d'identification taxonomique. Ce généticien a été à l'initiative de l'utilisation de la méthode RFLP. Je le remercie aussi de m'avoir introduite à la Génopôle de l'INRA de Rennes de y effectuer les analyses microsatellites.

Je tiens à remercier Sandrine PLENET et Dirk SCHMELLER pour leurs conseils avisés et leurs critiques constrictives lors de mon comité de thèse. Un remerciement spécial à Dirk pour ces conseils lors de l'analyse microsatellites. Son accueil à Moulis pour me former à l'interprétation des microsatellites a été d'une aide précieuse. J'en profite pour remercier également Adeline LOYAU pour cet accueil chaleureux.

Je remercie Claud MIAUD pour son accueil au sein du LECA et m'avoir formé à la lecture et l'interprétation des coupes en squelettochronologie.

J'adresse mes remerciements à tous mes collègues et amis du 2C2A-CERFE, et pour quelques uns mes colocataire au « CROUS de Boulton »: Julian (seul autre batrachologue), Estelle, Marina, Carol et Carol, Pauline, Maud, Emilie, Thomas et Thomas, Nico, Ludwik. Une petite pensée spéciale pour nos voisins et collègues Marie-Hélène et Kévin (technicien hors pair). Merci à nos amis de la Maison de la Nature, Benoit et Eric, qui ont rendu les ateliers scientifiques dynamiques et pédagogiques.

Je remercie également mes collègues et stagiaires du LEESA : Aline, Aurélie, Virginie, Julie, Gaël, Pierre, Flavien, Cyril, Stéphane, PC, Cyril, Aziz, Isabelle, Guillaume, Jean, Anne, Nelly, Jérémy, Xavier, Paul, Joël. Merci à Sébastien, mon collègue de bureau, qui m'a supporté durant la rédaction de ce manuscrit et a pris soin de mes plantes.

Merci au bureau d'étude AEPE-GINGKO, et plus spécialement à Florence MEYNIER-FOUSSARD de m'avoir permis de travailler en étroite relation avec eux lors d'expertises scientifiques. Il en est de même pour la Fédération des Chasseurs du Morbihan et de Jean-Pierre PICHARD, ainsi que la délégation de l'ONCFS de Loire Atlantique et Fabrice NORMAND.

Merci à la plate-forme génétique Ouest-Génopôle de l'INRA de Rennes de m'avoir accueillie pour réaliser certaines analyses génétiques, ainsi qu'à la Région Bretagne qui a subventionné une partie de ces analyses.

Je remercie les Directions Régionales de l'Environnement pour les autorisations de capture qui m'ont été attribuées dans le cadre de ce travail dans les Ardennes, ainsi que dans les Pays de la Loire et dans le Morbihan. Je remercie également Christian DEVER et Arnaud METAIS (Office National des Forêts), pour avoir fourni une autorisation d'accès à la forêt domaniale de la Croix-aux-Bois aux véhicules du 2C2A-CERFE. Merci à M. le Directeur du parc cynégétique de Bel Val pour m'avoir autorisé à pénétrer et à mener mes recherches dans leur parc. Je tiens à remercier tous les propriétaires des mares, étangs, tourbière pour m'avoir ouvert les portes de leur domaines, et avoir participé à notre enquête sociologique.

Je souhaite également remercier tout le personnel de la Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise, pour son accueil et pour son aide, ainsi que tous les personnel BIATOS de l'Université d'Angers, et plus particulièrement « les filles » de l'UFR Sciences pour leur gentillesse et leur disponibilité envers des jeunes moniteurs et ATER que nous sommes.

Je remercie bien sûr tous mes amis pour leur compréhension et leur disponibilité : Morgane, Lux, Adeline, Diane, Sébastien et Sébastien, Emeric, Jean-Marie, Quentin, François, Justine, William, Sylvain, Céline, Yanick, Béa, Sophie. Merci à toute l'équipe du SUBASUA pour

ces moments de détente lors des plongées extraordinaires, et le dévouement des moniteurs : Anaïs, Dédé, JéJé, Laura, Fabrice, Didier, Seb, Valérie, Maryline, François, Mireille, JD, Manu, Bertrand, Antoine.

Enfin, il me reste à exprimer mes remerciements les plus précieux à ma famille, qui m'a toujours encouragé et soutenu durant ces longues années d'études. Merci à Claire, ma sœur et colocataire, elle aussi enseignante, qui a pris soin de moi durant les phases les plus critiques de cette thèse.

Liste des Figures

Chapitre 1

Figure 1.1 : Photos aériennes montrant les modifications des paysages (Beckel, 1999)

Figure 1.2 : Schéma représentant les principaux changements écologiques induits par l'activité humaine, modifié à partir de Vitousek et al. (1997) (Barbault, Chevassus-au-louis, 2004)

Figure 1.3 : Proportion des espèces menacées d'extinction selon les différents groupes taxonomiques (Vié *et al.*, 2009).

Figure 1.4 : a : Proportion des vertébrés terrestres menacées selon la classification de l'UICN ; b : Causes majeurs menaçants ces vertébrés (les oiseaux sont exclus de l'analyse) (Vié *et al.*, 2009). EX : extinction, EW : extinction dans la nature, CR : en danger critique, EN : en danger, VU : vulnérable, NT : quasi-menacé, LC : peu concerné, DD : pas de données.

Figure 1.5 : a : Localisation actuelle des 26 espèces d'herbacées forestières (points), et les migrations futures (flèches) suite au réchauffement climatique ; b : corridors biologiques potentiels pour la migration des aires de répartition selon le modèle élaboré par (Skov, Svenning, 2004)

Figure 1.6 : Variation du pattern dorsal chez le lézard vivipare. Morphotype linéaire à gauche, réticulé à droite (Lepetz, 2009).

Figure 1.7: Normes de réaction de 4 génotypes (1 à 4) placés dans 3 environnements (E1, E2, et E3) (modifiée d'après Dingemanse et al. 2010).

Figure 1.8 : Gravure représentant un échantillon des différents morphotypes des pinçons des îles Galapagos.

Figure 1.9 : Représentation schématique des trois formes de sélection naturelle.

Figure 1.10 : Schéma représentant la sélection de l'habitat des lignées clonales selon les modèles GPG et FNV (adaptée selon Vrijenhoek 1994).

Figure 1.11 : Schéma de l'hybridogénèse chez les grenouilles du complexe *P. esculentus*.

Figure 1.12 : Schéma de l'hybridogénèse chez les grenouilles du complexe *P. grafi*.

Figure 1.13: Répartition supposée des ancêtres des grenouilles vertes actuelles dans les trois principales zones refuges lors de la dernière glaciation, réalisée selon les analyses de Zeisset et al. (2001), Snell et al (2005), Lymperakis et al. (2005), Ohst (2008).

Figure 1.14: Répartition actuelle des grenouilles des complexes *P. esculentus* et *P. grafi* en Europe, réalisée d'après plusieurs auteurs (Beebee *et al.*, 2005; Crochet *et al.*, 1995; Ohst, 2008; Pagano *et al.*, 2001a; Pagano *et al.*, 2001c; Plötner *et al.*, 2001).

Figure 1.15 : Distribution des stades larvaires de chaque taxon du complexe *P. esculentus* à la fin de l'expérience sous faible (gris) et fort (blanc) taux d'oxygène (Plenet *et al.*, 2000b).

Figure 1.16 : Schéma représentant la présence des deux espèces du complexe *P. esculentus* en fonction du gradient d'influence fluviale.

Chapitre 2

Figure 2.1: Photos des grenouilles vertes des deux complexes hybridogénétiques étudiés. a : grenouilles rieuses ; b : grenouilles de Lessona ; c : grenouille de perez ; d : hybride de graf ; e : grenouille verte.

Figure 2.2 : Cycle de vie annuel des grenouilles vertes Européennes.

Figure 2.3: Illustrations de différents stades du cycle de vie.

Figure 2.4 : Carte IGN représentant la zone d'étude de l'Argonne Ardennaise.

Figure 2. 5 : Photos de quelques sites suivis. a) mare forestière 13 AROC, b) étang tourbeux 16 ATG, c) ornière forestière 11 A074, d) zone humide temporaire dans la vallée de l'Aisne 17 AZBZ, e) mare de jardin 5 ABT, f) ancienne sablière 14 ASH, g) mare en prairie pâturée 4 ABN, h) ancien lit de l'Aisne 2 AAc.

Figure 2.6 : Carte IGN représentant la zone d'étude de l'Anjou

Figure 2. 7 : Photos de quelques sites suivis. a) étang de pêche 67 MCU, b) mare forestière 30 MMH, c) mare en prairie pâturée 68 MCR, d) mare en carrière d'extraction de graviers 32 MSE2, e) zone humide temporaire dans les BVA, 74 MVE, f) boire alluviale dans la vallée du louet, 29 MME, g) mare en prairie de fauche 28 MLC.

Figure 2. 8 : Orthophotos aériennes des « sites annexes » suivis. a) Ile d'Yeu, b) Réserve du Massereau, c) Etang du Loch, d) Bois d'Avaugour.

Figure 2.9 : Photos des différentes phases de captures et d'observations.

Figure 2.10 : Photos du protocole d'analyse de l'eau. a) oxymètre, b) spectrophotomètre Palintest 7500, c) conductimètre et pHmètre Hanna combo, d) échantillons d'eau en cours d'analyse.

Chapitre 3

Figure 3.1 : Cartes représentant la localisation à l'échelle européenne des différentes séquences ITS2 mise en évidence lors de la phase de séquençage.

Figure 3.2 : Arbre phylogénétique des espèces du groupe *Pelophylax* étudiées basée sur les séquences ITS2. L'outgroup est un individu de l'espèce *P. nigromaculata*. Les abréviations correspondent au nom de code des séquences listées dans le tableau 1.

Figure 3.3: Schéma représentant les sites de restrictions des trois enzymes utilisées sur les segments ITS2 amplifiés.

Figure 3.4: Photographie d'un gel d'agarose où l'on distingue les différents profils de restriction enzymatiques de segments ITS2. Hae II, Sma I (coupent spécifiquement l'ADN *lessonae*), et Kpn I (coupe spécifiquement l'ADN *ridibundus*).

Figure 3.5: Photographie d'un gel d'agarose où l'on distingue les différences d'intensité des bandes d'ADN pour la digestion par l'enzyme Sma I (coupant spécifiquement l'ADN *lessonae*).

Figure 3.6 : Graphiques représentant le pourcentage des différents groupes de grenouilles identifiées dans le Nord de la France.

Figure 3.7 : Secteurs représentant le pourcentage de taxa de grenouilles vertes identifiés dans les différents départements étudiés en France.

Figure 3.8 : Secteurs représentant le pourcentage de taxa de grenouilles vertes identifiés dans les différentes sites d'études en France. a) Localisation des zones d'études en France, b) Zone d'étude de l'Ile d'Yeu, c), zone d'étude de l'Anjou, d) zone suivie de l'Argonne ardennaise.

Figure 3.9 : Cartes de répartition de la grenouille rieuse en Europe et en France dans les différents guides naturalistes. a) (Le Garff, 1998), b) (Santiani, 2002), c) (Nöller, Nöller, 2003), d) MNHN, e) (Duguet, Melki, 2003), f) (Duguet, Melki, 2003), g) (Muratet, 2008), h) Muséum national d'Histoire naturelle [Ed]. 2003-2010. *Inventaire national du Patrimoine naturel*, site Web : <http://inpn.mnhn.fr>.

Figure 3.10 : Carte de répartition des *P. ridibundus*, *P. lessonae*, et *P. esculentus* en France selon l'IUCN, avec les secteurs représentant nos résultats de l'identification génétique grâce à la méthode RFLP-ITS2.

Figure 3.11 : Fréquences alléliques pour chaque microsatellite par taxon identifiés par ITS2.

Figure 3.12 : AFC obtenue à partir des échantillons témoins

Figure 3.13 : AFC obtenue à partir de tous les échantillons

Figure 3.14 : AFC obtenue à partir de l'ensemble des échantillons classés selon 5 modalités

Figure 3.15 : Résultats de la méthode d'assignation par clustering selon la méthode d'Evanno et al. (2005). a) : résultat de l'analyse des échantillons témoins, b) résultat de l'analyse de tous les échantillons.

Figure 3.16 : Structuration des échantillons témoins implémenté par STRUCTURE 2.2 où K=2.

Figure 3.17 : Structuration des 975 échantillons implémenté par STRUCTURE 2.2 où K=2.

Figure 3.18 : Structuration des échantillons belges implémentée par STRUCTURE 2.2 issue de la publication de Holsbeek et al. (2009) où K=2.

Chapitre 4

Figure 4.1: The hybridization complexes "L-E system" and "P-G system". Germ cells are encircled. L: genome of *P. lessonae*; R: genome of *P. ridibundus*; P: genome of *P. perezi*; Re: genome *ridibundus* transmitted by a hybridogen *P. kl. esculentus*; Rg: genome *ridibundus* transmitted by a hybridogen *P. kl. grafi*; H: hybridogenesis.

Figure 4.2: Mass at metamorphosis of each cross type

Figure 4.3: Time to metamorphosis of each cross type

Chapitre 5

Figure 5.1 : Cercle de corrélations de l'analyse en composantes principales (ACP) des paramètres abiotiques de nos sites d'étude

Figure 5.2 : Projection des sites étudiés sur la carte factorielle de l'ACP.

Figure 5.3 : Boîtes à moustaches des comparaisons des paramètres entre les habitats prairiaux et forestiers (* = p-value<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001, and **** = p<0.0001).

Figure 5.4 : Répartition des 3 taxa de grenouilles vertes dans les 2 zones d'étude. A gauche, l'Anjou, à droite l'Argonne ardennaise.

Figure 5.5 : Abondances relatives en grenouilles vertes des 3 taxa en fonction des deux types d'habitats aquatiques à l'échelle globale.

Figure 5.6 : Résultats des comparaisons des paramètres morphologiques taxon par taxon en fonction des deux types d'habitats (* = p-value<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001, and **** = p<0.0001).

Chapitre 6

Figure 6.1: Number of tadpoles according to mass at metamorphosis (mass) of the six groups

Figure 6.2: Number of tadpoles according to time at metamorphosis (Days) of the six groups.

Figure 6.3: Mass at metamorphosis (a, b, and c) and time to metamorphosis (d, e, and f) measured at 20°C and at 26°C according to habitat's origin effect.

Figure 6.4: mass at metamorphosis (a and b) and time to metamorphosis (c and d) measured for the three habitat types according to temperatures (* = p-value<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001, and **** = p<0.0001).

Chapitre 7

Figure 7.1 : Gradient d'hybridation traduisant les variations de proportions des génomes *ridibundus* et *lessonae* au sein des hybrides. L'individu a est un hybride génétiquement proche de *P. ridibundus*. L'individu b est constitué d'autant de génome *ridibundus* que de génome *lessonae*. Et l'individu c est un hybride génétiquement proche de *P. lessonae*.

Figure 7.2 : Schéma représentant les différents types de croisement possible chez les grenouilles vertes du complexe *P. esculentus*, et les génotypes des descendants issus de ces croisements (Vorbürger, Reyer, 2003)

Liste des Tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 : Evolution de l'occupation des terres végétalisées dans le monde et de la densité humaine (McNeill, 2000).

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Statuts législatifs et degré de menace des 5 taxa de grenouilles vertes étudiés. En gras, les statuts de protection les plus stricts.

Tableau 2.1 : Numéro, nom, commune et coordonnées géographiques des sites échantillonnés dans la zone étudiée de l'Argonne Ardennaise. Les codes en jaune sont les sites où il y a eu capture et analyse d'eau, ceux en vert uniquement de la capture, et ceux en bleu uniquement des analyses d'eau.

Tableau 2.2 : Numéro, nom, commune et coordonnées géographiques des sites échantillonnés dans la zone étudiée de l'Anjou. Les codes en jaune sont les sites où il y a eu capture et analyse d'eau, et ceux en bleu uniquement des analyses d'eau.

Chapitre 3

Tableau 3.1 : Allèles ITS2 (séquences) spécifiques pour les grenouilles vertes des groupes *P. ribibundus* (R, RC, RG) et *P. lessonae-bergeri* (L) avec le numéro d'accension correspondant (GenBank), l'origine (localité, coordonnées) des individus étudiés. Les allèles ont été désignés selon la nomenclature de Ohst (2008).

Tableau 3.2 : Fréquences d'affiliation des grenouilles vertes en fonction de 5 catégories, et selon leur sites

Tableau 3.3 : Fréquences d'affiliation des grenouilles vertes en fonction des 3 taxa identifiés, et selon leur sites

Tableau 3.4 : Liste des marqueurs microsatellites utilisés : nom (locus), motif, séquence des amorces, numéro d'accension sur GenBak, température d'hybridation (Tm), taille des fragments, et auteurs ayant développé ou utilisé ces microsatellites. Les codes bibliographiques sont donnés dans le tableau 3.8.

Tableau 3.5 : Richesse allélique obtenue pour chaque microsatellite classée par taxon.

Tableau 3.6 : Variabilité génétique des 5 microsatellites pour les deux espèces parentales du complexe *P. esculentus*. N : nombre d'échantillons portant des allèles; He : hétérozygotie attendue ; Ho : hétérozygotie observée ; Fis : coefficient de consanguinité; Fst : coefficient de parenté ; P : p-value de la significativité de l'écart à l'équilibre de HW ; RA : richesse allélique.

Tableau 3.7 : Comparaison entre l'identification par ITS2 et celle grâce aux microsatellites lorsque K=2. Le pourcentage de correspondance est la comparaison uniquement entre l'identification selon les microsatellites et celle « à priori » déterminée selon ITS2

Tableau 3.8: Origine des échantillons utilisés par les différentes équipes ayant développés et utilisés les microsatellites chez les grenouilles vertes Européennes.

Chapitre 4

Table 4.1: Crosses made with different taxa. Progeny with (RRe) and (RRg) genotypes are *P. ridibundus* with one *ridibundus* genome of sexual origin (*P. ridibundus*) and one from clonal origin (hybrid *P. kl. esculentus* or *P. kl. grafi*). Those with (RgP) are hybrids with a *ridibundus* genome from a hybrid *P. kl. grafi* and a *perezi* genome from *P. perezi*.

Table 4.2: Results of the paired comparison of body mass between tadpoles of the different taxa (Kruskal-Wallis test). Values correspond to Mann-Whitney pairwise comparisons, Bonferroni corrected (values in bold type are significant).

Table 4.3: Results of the paired comparison of time to metamorphosis between tadpoles of the different taxa (Kruskal-Wallis test). Values correspond to Mann-Whitney pairwise comparisons, Bonferroni corrected (values in bold type are significant).

Chapitre 5

Tableau 5.1 : paramètres relevés pour l'analyse de l'habitat aquatique des grenouilles vertes.

Tableau 5.2 : Matrice de corrélation pour les paramètres de l'habitat (test de Spearman). Les cases jaunes indiquent les corrélations significatives.

Tableau 5.3 : Résultats des comparaisons des différents paramètres en fonction des deux types d'habitat forestier et prairiaux (tests de Wilcoxon Mann et Whitney). Les chiffres en gras sont significatifs.

Tableau 5.4 : Effectifs (Eff) et fréquences (Fréq) des taxa identifiés par ITS2 classés par sites d'études.

Tableau 5.5 : Matrice de corrélation entre les variables « abondances en grenouilles vertes » et les 10 variables de l'habitat à l'échelle globale. Les cases jaunes correspondent aux corrélations significatives.

Tableau 5.6 : Matrice de corrélation entre les variables « abondances en grenouilles vertes » et les 10 variables de l'habitat centrée sur les amphibiens, à l'échelle de l'Argonne ardennaise (a), puis de l'Anjou (b). Les cases jaunes correspondent aux corrélations significatives.

Tableau 5.7 : Résultats des tests de comparaison des 3 variables morphologiques entre les grenouilles forestières et prairiales.

Chapitre 6

Table 6.1: Results of the Wilcoxon Mann-Whitney test for temperature effect of all tadpoles according to their habitat of origin with mass at metamorphosis (Mass) and time to metamorphosis (Time).

Table 6.2: Results of Kruskal-Wallis test for Habitat's origin effect of all tadpoles for mass at metamorphosis (Mass) and time to metamorphosis (Time).

Sommaire

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Le changement global-----	18
1.1.1. Une planète en pleine mutation-----	18
1.1.2. Conséquences sur la Biodiversité-----	20
1.2. Réponses des organismes face à ces modifications-----	22
1.2.1. Les différentes réponses-----	22
1.2.2. Les processus mis en place-----	24
1.2.2.a. La Plasticité phénotypique-----	24
1.2.2.b. Adaptation-----	27
1.2.2.c. Distinction entre plasticité et adaptation -----	30
1.3. Le cas particulier des organismes asexués-----	30
1.4. Intérêt du groupe modèle-----	33
1.4.1. Les complexes d'hybridations en France-----	33
1.4.2. L'origine des grenouilles vertes-----	37
1.4.3. La systématique-----	38
1.4.4. L'identification taxonomique-----	39
1.4.5. La répartition-----	40
1.4.6. Partition de niche-----	41
1.5. Les objectifs de la thèse-----	44

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2.1. Description du modèle biologique-----	48
2.1.1. Morphologie-----	48
2.1.2. La biologie-----	50
2.1.3. Statuts réglementaires de protection-----	50
2.2. Description des zones d'études-----	52
2.2.1. L'Argonne Ardennaise-----	52
2.2.2. L'Anjou-----	55
2.2.3. Les sites annexes-----	58
2.3. Les campagnes d'échantillonnage-----	59
2.4. Caractérisation de l'habitat-----	61
2.4.1. Habitat et étude paysagère-----	61
2.4.2. Les paramètres physico-chimiques-----	62

Chapitre 3 : Identification taxonomique à l'aide d'outils moléculaires

Introduction-----	65
3.1. Identification des grenouilles vertes du complexe <i>P. esculentus</i> grâce à la méthode PCR-RFLP sur la région ITS2-----	67
3.1.1. Mise au point d'une nouvelle technique d'identification-----	68
3.1.1.1. Introduction-----	68
3.1.1.2. Matériels et méthodes-----	69
3.1.1.3. Résultats et Discussions-----	71
3.1.1.4. Conclusions et perspectives-----	79

3.1.2. Identification taxonomique des grenouilles vertes échantillonnées dans la Nord de la France-----	80
3.1.2.1. Introduction-----	80
3.1.2.2. Matériels et méthodes-----	80
3.1.2.3. Résultats-----	82
3.1.2.4. Discussion-----	87
3.1.2.5. Conclusion-----	91
3.2. Identification des grenouilles vertes du complexe <i>P. esculentus</i> grâce aux marqueurs microsatellites-----	92
3.2.1. Introduction-----	92
3.2.2. Matériels et méthodes-----	93
3.2.3. Résultats-----	95
3.2.4. Discussion-----	103
3.2.5. Conclusion-----	108
Conclusion-----	109

Chapitre 4 : Sexuality vs clonality: preliminary results of larval performance of *P. perezi*, *P. kl. grafi* and *P. ridibundus* (Ranidae, Pelophylax).

4.1. Introduction-----	113
4.2. Matériels and methods-----	116
4.3. Results-----	118
4.4. Discussion-----	121
4.5. Conclusion -----	124

Chapitre 5: Utilisation de l'habitat

5.1. Introduction-----	128
5.2. Matériels and méthodes-----	132
5.2.1. Contexte de l'étude-----	132
5.2.2. Les paramètres physico-chimiques-----	133
5.2.3. Les grenouilles vertes-----	133
5.2.4. Les analyses statistiques-----	134
5.3. Résultats-----	134
5.3.1. Analyse des caractéristiques de l'habitat-----	134
5.3.2. Caractéristiques des différents types d'habitat-----	137
5.3.3. Le peuplement en grenouilles vertes-----	139
5.3.4. Relation entre le peuplement et l'habitat-----	141
5.3.5. Effet de l'habitat sur la morphologie des grenouilles vertes-----	144
5.4. Discussion-----	145
5.4.1. Le type d'habitat aquatique-----	146
5.4.2. Analyse des peuplements-----	146
5.4.3. Partition de niches-----	148
5.4.4. Effet de l'habitat sur la morphologie-----	149
5.5. Conclusion-----	151

Chapitre 6 : Phenotypic plasticity and adaptation ability: Larval performances of *Pelophylax esculentus* (Amphibia, Ranidae) tadpoles from two different habitats

6.1. Introduction-----	156
6.2. Materials and methods-----	159
6.2.1. Field-----	159
6.2.2. Experimental crosses-----	160
6.2.3. Experimental procedure-----	160
6.2.4. Measures of performances-----	161
6.2.5. Statistical analyses-----	161
6.3. Results-----	162
6.3.1. Temperature effect-----	162
6.3.2. Habitat of origin effect-----	163
6.4. Discussion-----	165
6.4.1. Larval performance and relation to fitness-----	165
6.4.2. Temperature effect-----	165
6.4.2. Habitat of origin effect-----	166
6.5. Conclusion-----	168

Chapitre 7: Discussion et Perspectives

7.1. L'identification taxonomique-----	170
7.2. L'utilisation de l'habitat chez le complexe <i>P. esculentus</i> -----	174
7.3. Fitness hybride et heterosis-----	176
7.4. Le devenir évolutif des grenouilles vertes-----	177
7.4.1. L'hybridogénèse : un modèle biologique en péril-----	177
7.4.2. La propagation du génome R-----	178
7.4.3. Biologie de la conservation-----	181

Bibliographie -----	184
----------------------------	-----

Annexes

Annexe 1: Fiche "caractérisation de l'habitat"-----	214
Annexe 2: A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs-----	219

Glossaire

Biodiversité

La biodiversité a été définie lors de la Convention sur la Diversité Biologique à Rio de Janeiro le 5 juin 1992. Il s'agit de la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes ».

Cliquet de Muller

La sexualité est souvent génétiquement très conservatrice. En revanche, chez une espèce sans reproduction sexuée, et donc sans recombinaison, un gène muté ne peut revenir à son état initial que par mutation réverse de probabilité faible. Si un chromosome est muté sur un locus particulier, le retour au chromosome initial est donc exceptionnel. L'impossibilité de cette restauration chez une espèce asexuée est appelée cliquet de Müller (cliquet car le retour est impossible) (Müller, 1964). Avec un tel processus, les populations clonales accumulent les mutations délétères, ce fardeau génétique pouvant induire une baisse de la fitness, et mener à l'extinction.

Espèce

Mayr (1942) définit les espèces comme des « groupes capables, ou potentiellement capables, d'inter-croisement et qui sont reproductivement isolés des autres groupes » (Mayr, 1942). Mais cette définition ne prend pas en compte certaines situations telles les cas d'hybridations. Ainsi, d'autres définitions plus ouvertes ont été proposées, comme celle de Shaw (1998) qui présente une définition faisant partie du concept phylogénétique de l'espèce, selon laquelle « l'espèce est définie comme un groupe de base d'organismes dont les membres sont plus proches entre eux qu'ils ne le sont d'autres organismes à l'extérieur du groupe, et qui ne compte pas de sous-groupe ».

Evolution concertée

Il s'agit d'un processus qui homogénéise les gènes multi-copies, tel qu'ITS2, entraînant au fil du temps une très faible variation au sein des individus (Nikoloudakis *et al.*, 2008). L'évolution concertée est due à une conversion génique faisant intervenir une recombinaison afin de remplacer une séquence par une autre.

Fitness

La fitness est un concept utilisé largement par les biologistes de l'évolution. Plusieurs définitions ont été proposées: c'est la valeur sélective d'un individu, ou, l'aptitude des espèces à survivre dans leur milieu au travers des performances des individus mais également des capacités de la descendance à évoluer et s'adapter aux variations de l'environnement (Blondel, 1993). Elle peut aussi se définir comme le nombre des descendants d'un individu qui atteignent la maturité sexuelle, ou comme la capacité individuelle à survivre et à produire des descendants = "lifetime reproductive success" (Futuyma, 1998).

FIS (coefficient de consanguinité)

Il mesure l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg à l'intérieur d'une sous-population. Si les populations sont à l'équilibre alors $FIS = 0$. Si FIS est négatif les sous populations présentent un excès d'hétérozygotie. Un FIS positif traduit quant à lui un déficit en hétérozygotes.

FST

C'est la proportion de la variance génétique totale présente dans une sous-population. FST mesure la réduction relative des hétérozygotes, lié aux différences alléliques entre populations. C'est un indice de diversification des populations compris entre 0 et 1 (0 pas de différenciation, 1 forte différenciation).

Heterosis

L'heterosis positive se manifeste lorsqu'un hybride manifeste une supériorité par rapport aux deux espèces parentales pour au moins un trait (Manwell *et al.*, 1963). Due à un fort taux d'hétérozygotie, l'hybride se caractérise par sa grande vigueur et sa grande valence écologique, qui sont supérieures à celles des espèces parentales.

Hybride

Les hybrides résultent du croisement entre des individus de deux espèces différentes, donc génétiquement distincts, au sein d'une zone d'hybridation (en sympatrie) (Harrisson, 1990). Ces croisements se produisent lorsque les barrières d'isolement reproducteur (Coyne, Orr, 2004) sont inexistantes ou inefficaces.

Introgression génétique

L'introgression génétique est le nom donné par Anderson et Hubricht (1938) au processus conduisant à ce qu'une partie du génome d'un individu d'une espèce intègre le génome d'un individu d'une autre espèce. Cette incorporation de gènes d'une espèce dans le complexe génique d'une autre se produit à travers l'hybridation. Ce flux de gènes interspécifique peut survenir dans certains cas, lors de la gamétogénèse chez un hybride, où il peut y avoir des phénomènes de recombinaison génétiques, et passage de fragments d'ADN d'un génome parental à l'autre. Ceux-ci ne sont alors pas détectés par les mécanismes de correction, et sont intégrés dans le génome des descendants (Griffiths *et al.*, 2000). Plusieurs générations d'introgression répétée peuvent aboutir à de la spéciation, cas souvent observé chez les plantes (Rieseberg, Wendel, 1993).

Métapopulation

La métapopulation (au sens dynamique de population) est un ensemble de populations de même espèce séparées dans l'espace mais interconnectées (plus ou moins fortement) par des flux d'individus qui en maintiennent l'unité génétique (Barault, 2003). Pour les Amphibiens, des sites aquatiques proches peuvent constituer un ensemble de populations fonctionnant en métapopulations.

Niche écologique

La niche écologique est définie par Grinnell (1917) comme étant l'ensemble des conditions environnementales au sein de laquelle chaque espèce peut survivre et maintenir ses populations. Ce concept est ensuite redéfini par Hutchinson (1957) comme un hypervolume où chaque dimension de l'espace représente une ressource ou une condition (température, pollution, etc) de l'environnement, en relation avec l'aire de distribution de l'espèce.

Population

La population représente un ensemble d'individus de la même espèce interagissant entre eux dans un même espace, notamment pour la reproduction (Barault, 2003). On considérera (de manière simpliste ?) que, pour les Amphibiens, un site aquatique représente une population.

Traits d'histoire de vie

Les traits d'histoire de vie d'une espèce décrivent le mode de vie d'une espèce, son régime alimentaire, les caractéristiques de sa reproduction, de sa dispersion et autres aspects de sa biologie.

Zone hybride

Les zones hybrides sont caractérisées par des groupes génétiquement distincts d'individus qui se rencontrent, se reproduisent, donnant naissance à une descendance générée par les deux parents (Harrisson 1990).

Chapitre 1

Introduction

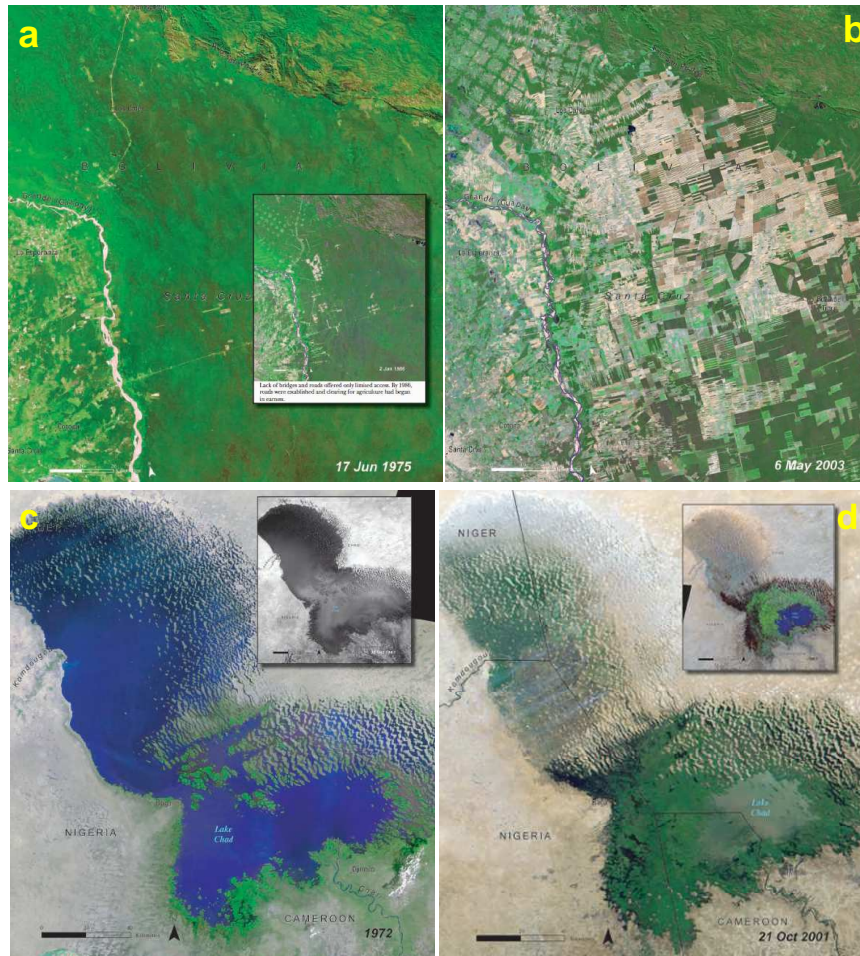


Figure 1.1 : Photos aériennes montrant les modifications des paysages. a : Forêt de Santa Cruz en Bolivie en 1975, b : déforestation intensive au profit des cultures en 2003, c : Lac Chad au Niger en 1972, d : assèchement quasi-total du lac en 2001 (Beckel, 1999).

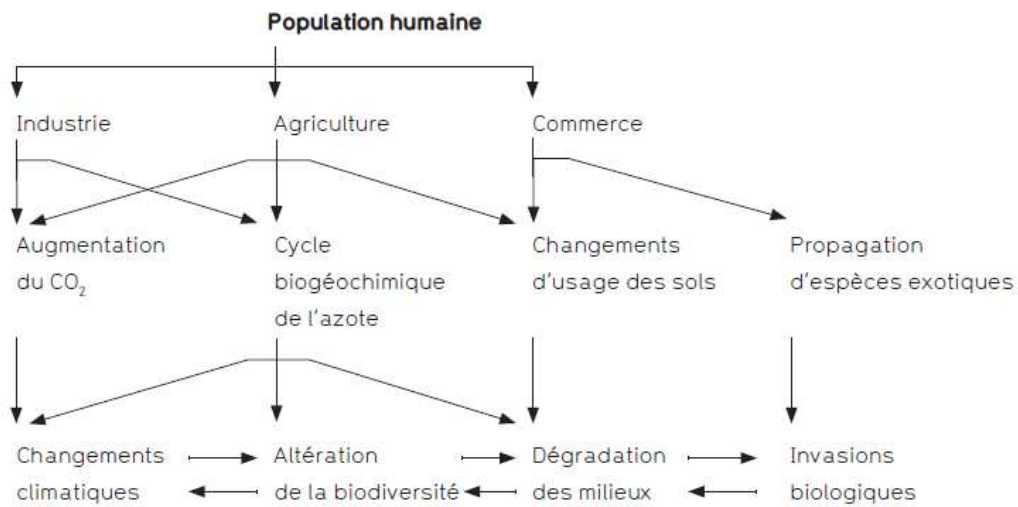


Figure 1.2 : Schéma représentant les principaux changements écologiques induits par l'activité humaine, modifié à partir de Vitousek et al. (1997) (Barbault, Chevassus-au-louis, 2004).

1.1. Le changement global

1.1.1. Une planète en pleine mutation

Notre planète est en évolution perpétuelle, mais depuis le vingtième siècle, cette évolution s'est accélérée sous l'impulsion de l'homme (Barbault, Chevassus-au-louis, 2004). Le concept de changement global est maintenant bien compris et accepté dans une large mesure par les scientifiques, les organisations et le public informé. Il comprend à la fois les changements à l'échelle de la biosphère (comme le changement climatique, l'élévation du niveau de la mer) ainsi que des changements à des échelles plus fines (pratiques agricoles, occupation du sol). Ce changement global est devenu une préoccupation mondiale depuis les années 1970, suite à une prise de conscience du poids de l'homme dans la dynamique de la biosphère, mais aussi de sa totale dépendance vis-à-vis de celle-ci (Barbault, Chevassus-au-louis, 2004; FAO, 2008 ; UNEP, 2010; Vitousek *et al.*, 1997).

Au début de l'histoire de la planète, seules des forces telles le climat, le vent, l'eau, le feu, les éruptions volcaniques, l'impact de météores étaient responsables de l'évolution des écosystèmes. Désormais, ces forces naturelles sont toujours présentes, parfois même de manière cyclique, mais sont surpassées par celles résultant de l'activité humaine : les pressions anthropiques sont dorénavant directes, nombreuses et en interaction (Barbault, Chevassus-au-louis, 2004). Dans les sociétés occidentales, l'urbanisation est sans doute l'un des facteurs majeurs de la modification des écosystèmes. Ce n'est, pour l'essentiel, que la conséquence des aménagements nécessaires aux besoins créés par l'augmentation démographique. En effet, la population mondiale a doublé durant les trente dernières années, dont 45% vit en zone urbaine (Beckel, 1999; UNEP, 2002).

Face aux 6 milliards d'habitants et à la mondialisation de la culture depuis le vingtième siècle, de nombreux problèmes se posent. La surexploitation des ressources naturelles (énergie fossile) en fait partie, tout comme la question du retraitement des déchets (Casagrande, Zaidman, 1999). Afin de subvenir aux besoins de tous, les pratiques culturelles et sylvicoles ont rapidement évolué (Merriam, 1984; Saunders *et al.*, 1991), et le pourcentage de terres cultivées à travers le monde a augmenté de 466 % entre 1700 et 1980 (Richards, 1990). Corrélativement, le taux net de déforestation a été estimé à 9 millions d'hectares par an dans

Tableau 1.1 : Evolution de l'occupation des terres végétalisées dans le monde et de la densité humaine (McNeill, 2000).

Year	Per cent of the Earth's Vegetated Land Area				Human Population (Billions)
	Forest and Woodland	Grassland	Pasture	Cropland	
8000 B.C.	51	49	0	0	0.005
1700 A.D.	47	47	4	2	0.6
1900	43	40	10	6	1.6
1920	43	38	12	7	1.9
1940	41	35	16	8	2.3
1960	40	31	20	9	3.0
1980	38	26	25	11	4.4
1990	36	27	26	11	5.3

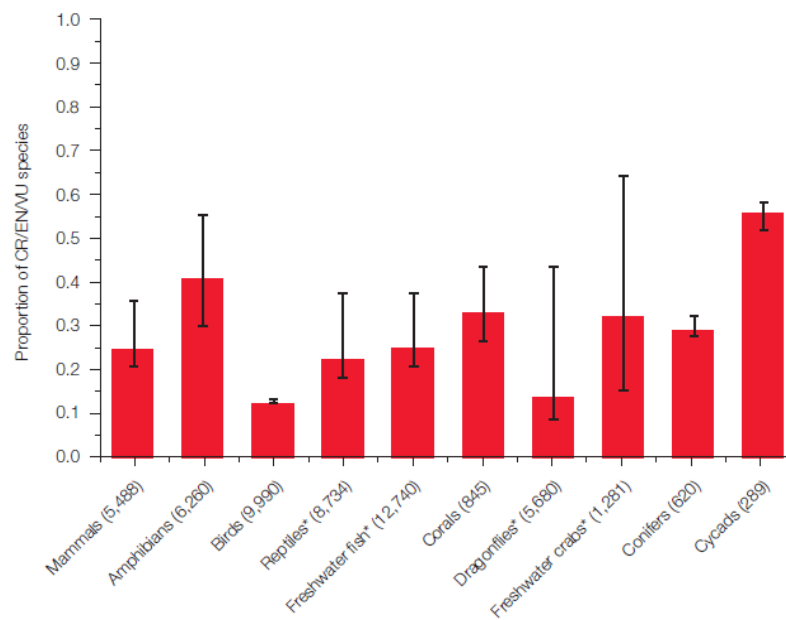


Figure 1.3 : Proportion des espèces menacées d'extinction selon les différents groupes taxonomiques (Vié *et al.*, 2009).

les années 1990 (FAO, 2001) (Tableau 1.1). A titre d'exemple, 46% de la forêt tropicale mondiale a été détruite dans les années 1970 (Sunquist, Sunquist, 2001). De plus, le développement de l'agriculture induit une forte érosion des sols et une consommation importante en eau douce. Les systèmes hydrologiques sont profondément modifiés à des fins d'irrigation, et de nombreuses zones humides ont disparu suite à des drainages, dont 50% en 30 ans en France (Bernard, 1994).

D'autres actions anthropiques affectent les écosystèmes : 1) l'altération progressive de la couche d'ozone (due à la pollution atmosphérique) contribue à l'augmentation des rayonnements UV jusqu'à la surface de la terre, ce qui est nocif pour les organismes ; 2) l'introduction d'espèces exotiques envahissantes par la main de l'homme (Barbault, Chevassus-au-louis, 2004; Beebee, Griffiths, 2005; Ficetola *et al.*, 2007; Gallant *et al.*, 2007) affecte fortement la biodiversité ; 3) la surexploitation des ressources naturelles (énergie fossile) est également invoquée ainsi que le l'accumulation des déchets et leur retraitement (Casagrande, Zaidman, 1999).

1.1.2. Conséquences sur la Biodiversité

Certains de ces changements induisent une profonde modification des écosystèmes dont nous dépendons, et constituent des risques environnementaux de grande ampleur pour la diversité biologique à l'échelle planétaire. En effet, la communauté scientifiques s'accorde à dire que nous sommes actuellement au cœur de la 6^{ème} crise d'extinction majeure des espèces (Barbault, Chevassus-au-louis, 2004; Koh *et al.*, 2004; Vié *et al.*, 2009). Ce déclin mondial est causé cette fois non pas par un bouleversement géologique (volcanisme intensif, collision avec une grande météorite...), comme dans les cas précédents, mais résulte de l'expansion démographique de notre espèce aux fortes exigences énergétiques et spatiales (Barbault, Chevassus-au-louis, 2004). Parmi les 44 838 espèces observées et incluses dans la liste rouge de l'UICN de 2008, la moitié sont menacées d'extinction, classées en danger ou vulnérables, et 1,7% ont totalement disparu (Vié *et al.*, 2009). Tous les groupes sont touchés par cette crise forte et rapide (Figure 1.3), dont 12% des oiseaux, 25% des mammifères 32% des coraux, 23% des reptiles, ainsi que 43% dans amphibiens, dont 31% sont menacés d'extinction (Stuart *et al.*, 2004; Vié *et al.*, 2009).

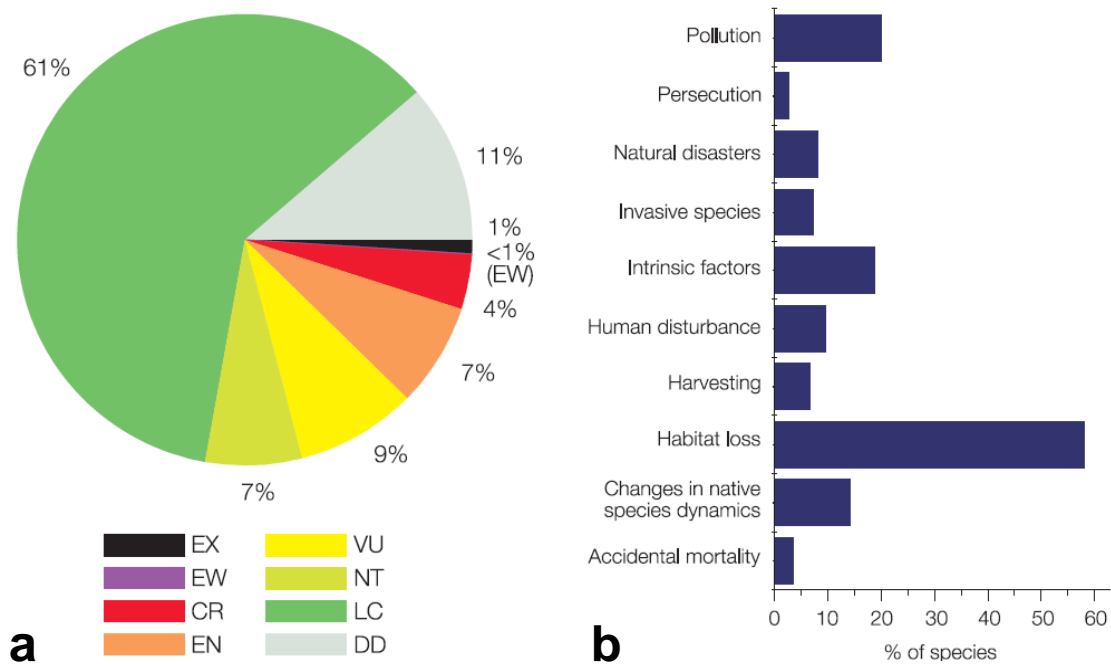


Figure 1.4 : a : Proportion des vertébrés terrestres menacés selon la classification de l'UICN ; b : Causes majeurs menaçant ces vertébrés (les oiseaux sont exclus de l'analyse) (Vié *et al.*, 2009). EX : extinction, EW : extinction dans la nature, CR : en danger critique, EN : en danger, VU : vulnérable, NT : quasi-menacé, LC : peu concerné, DD : pas de données.

La perte et la fragmentation de l'habitat, conséquences directs du changement global, sont aujourd'hui une menace pour la biodiversité reconnue par tous (Foley *et al.*, 2005), et semblent contribuer largement à la sixième crise majeure d'extinction des espèces (Wilcox, Murphy, 1985) (Figure 1.4). La perte de l'habitat diminue la quantité d'habitat, pouvant induire une réduction de l'effectif de la population, qui devient alors plus vulnérable aux processus stochastiques environnementaux et démographiques (Fahrig, 1997). La fragmentation de l'habitat contribue à la rupture de sa continuité (Lord, Norton, 1990). Une population isolée et de taille réduite peut ainsi être affectée par la consanguinité, l'érosion et la dérive génétique (Beebee, 2005; Keller, Waller, 2002; Marr *et al.*, 2006; Tallmon *et al.*, 2004). Cependant, c'est plus généralement l'association de ces deux processus qui est préjudiciable (Fahrig, 2003).

Des études récentes suggèrent que le réchauffement climatique pourrait être finalement considéré comme la cause majeure du déclin (Parmesan, 2006; Pounds *et al.*, 2006; Pounds *et al.*, 2007; Sinervo *et al.*, 2010). Les paramètres caractérisant les changements

climatiques tels les variations des températures, le rayonnement solaire, les UV, l'humidité, la couverture nuageuse, les précipitations et la fréquence des événements climatiques extrêmes, sont étroitement liés à la qualité et la perte de l'habitat (Araujo *et al.*, 2006; D'Amen, Bombi, 2009) et à la crise d'extinction.

D'autres facteurs sont impliqués dans la perte de biodiversité, comme la pollution (Bridges, Semlitsch, 2000; Collins, Storfer, 2003; Davidson *et al.*, 2002; Vié *et al.*, 2009), conséquence de la révolution industrielle et de l'intensification de l'agriculture. De nombreuses molécules rejetées dans l'environnement sont classées comme CMR (cancérogène, mutagène, et reprothératogène), et induisent des malformations, la stérilité et des taux importants de mortalités. La sur-exploitation de nombreuses espèces à des fins alimentaires ou médicales (Neveu, 2004), mais aussi l'introduction d'espèces exotiques, prédatrices et/ou compétitrices des espèces autochtones (Beebee, Griffiths, 2005; D'Amore *et al.*, 2009; Ficetola *et al.*, 2007), et la propagation de maladies (Bradley *et al.*, 2002; Miller, Gray, 2009; Murray *et al.*, 2009; Voyles *et al.*, 2009) sont aussi des menaces pour la biodiversité.

1.2. Réponses des organismes face à ces modifications

Ces nombreux changements exercent une pression considérable sur les populations. Face à ces modifications brutales de leur environnement, le devenir des organismes dépend de leur capacité à répondre, c'est-à-dire de leur aptitude à s'accommoder et à s'adapter à ces changements, afin d'éviter l'extinction.

1.2.1. Les différentes réponses

Plusieurs types de réactions peuvent être attendus en réponse à ces modifications, dont la gamme et l'amplitude diffèrent selon les organismes.

Ils peuvent migrer vers un habitat plus favorable, lorsque les corridors biologiques sont présents (Araujo *et al.*, 2006; Bancroft *et al.*, 2008). Une étude qui a évalué les impacts du réchauffement climatique et de la fragmentation de l'habitat sur plusieurs espèces d'herbacées forestières observe un décalage de l'aire de distribution vers le Nord (Skov, Svenning, 2004)

(Figure 1.5). Le même genre d'observation a été noté chez de nombreux organismes, tels les lépidoptères (Hill *et al.*, 2002; Mikkola, 1997), les amphibiens (Araujo *et al.* 2006), et les oiseaux (Thomas, Lennon, 1999).

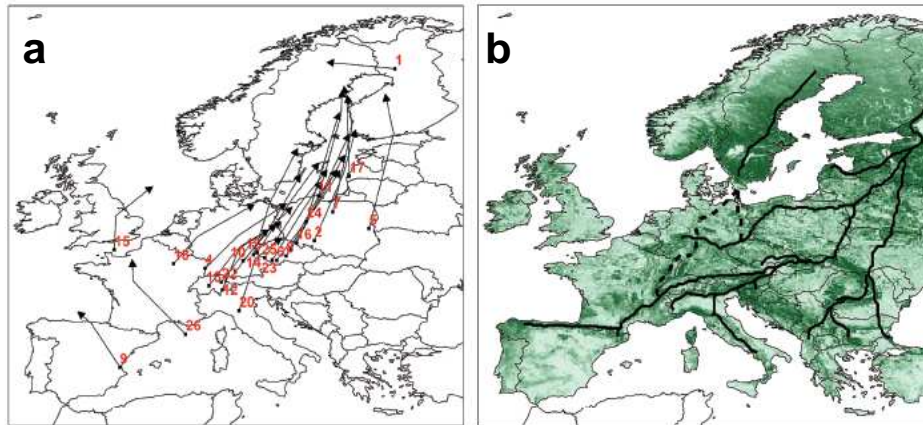


Figure 1.5 : a : Localisation actuelle des 26 espèces d'herbacées forestières (points), et les migrations futures (flèches) suite au réchauffement climatique ; b : corridors biologiques potentiels pour la migration des aires de répartition selon le modèle élaboré par (Skov, Svenning, 2004)

Un décalage phénologique est aussi observé en réponse aux modifications de leur environnement, particulièrement face au réchauffement climatique. Plusieurs critères indiquent l'allongement de la saison de croissance végétative chez les plantes de l'hémisphère Nord par exemple (Parmesan, 2006), comme le bourgeonnement précoce des cerisiers du Japon, ou encore les période de récolte de raisins en Europe (Menzel, Dose, 2005). La date d'émergence des papillons étant fortement corrélée aux températures, de nombreuses études ont observé un décalage phénologique suite aux réchauffement climatique (Roy, Sparks, 2000). Certains amphibiens sont capables de décaler leur période de reproduction (Blaustein *et al.*, 2001; Carroll *et al.*, 2009), comme la grenouille *Rana sylvatica* qui face au réchauffement climatique, parade et se reproduit plus tôt (Beebee *et al.*, 2002; Gibbs, Breisch, 2001).

Face à des modifications de leur environnement, la grande majorité des organismes montrent une variation de leurs traits d'histoire de vie. Des paramètres morphologiques tels une taille réduite à la métamorphose, des variations de la longueur des membres postérieurs ont été observé chez les amphibiens (Blouin, Brown, 2000; Brady, Griffiths, 2000; Negovetic *et al.*, 2001). En réponse au réchauffement climatique, le morphotype réticulé est plus

fréquemment observé que le linéaire chez le lézard vivipare (Figure 1.6) (Lepetz, 2009; Lepetz *et al.*, 2009).



Figure 1.6 : Variation du pattern dorsal chez le lézard vivipare. Morphotype linéaire à gauche, réticulé à droite (Lepetz, 2009).

1.2.2. Les processus mis en place

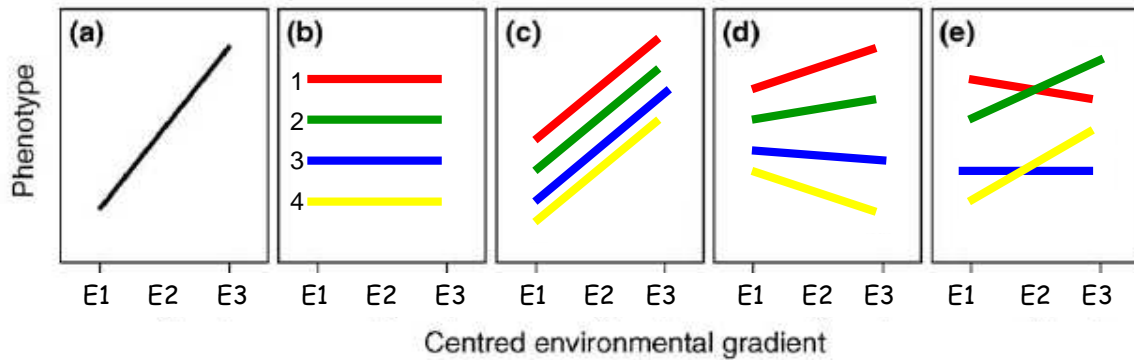
La nature de ces réponses est différente. Certaines sont dues à des mécanismes de plasticité phénotypique, tandis que d'autre sont dues à de l'évolution génétique et donc à de l'adaptation locale (Davis *et al.*, 2005; Jump, Penuelas, 2005). Depuis quelques années, l'origine de ses variations est devenue une question centrale en écologie évolutive ainsi qu'en génétique (Gotthard, Nylin, 1995). Cet intérêt se traduit par de nombreuses études expérimentales et théoriques sur le sujet, sur une large gamme de taxa et de traits, incluant les caractères morphologiques et d'histoire de vie (Groot *et al.*, 2005; Lind, Johansson, 2007; Newman, 1992; Newman, 1988; Plenet *et al.*, 2000a; Sultan, 1996). Lorsque les variations environnementales sont rapides et à court terme, seuls les organismes capables d'une grande plasticité phénotypique pourront survivre (Scheepens *et al.*, ; Tully, Ferrière, 2008). En revanche, à moyen et long terme, ils peuvent s'adapter au nouvel environnement par microévolution.

1.2.2.a. La Plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique est définie comme l'aptitude d'un organisme à réagir aux ressources environnementales disponibles en changeant de forme, d'état, de mouvement, ou de taux d'activité (West-Eberhard, 2003). Cette plasticité, appelée aussi acclimatation ou accommodation, permet à un génome d'ajuster ses traits à des conditions environnementales

différentes (Sultan, 2000). En effet, c'est la capacité d'un génotype à produire différents phénotypes en réponse à un changement des conditions environnementales (Garland Jr, Kelly, 2006), qu'il s'agisse de paramètres abiotiques tels que la pluie, la température, la lumière ou la disponibilité en nourriture, ou de paramètres biotiques tels que la présence de compétiteurs ou encore de prédateurs. C'est donc une variation intra-individuelle sous l'influence à la fois du génome et de l'environnement (Williams, 1992). Ainsi, elle permet une acclimatation plus rapide et flexible aux changements environnementaux que l'adaptation génétique (Sultan, 2000). Une faible variabilité génétique entraîne une faible plasticité, car le génome sera en mesure de produire peu de phénotypes (Chevin *et al.*, 2010). La plasticité peut être une réponse active lorsque le changement de phénotype atténue l'effet du niveau sub-optimal des ressources, ou passive lorsque le changement est simplement une fonction d'une réduction ou d'une augmentation des ressources (West-Eberhard, 2003). La plasticité permet souvent à l'individu d'améliorer sa survie et/ou sa fitness dans différentes conditions (Marshall *et al.*, 1986; Scheiner, 1993; Sultan, 1996; Sultan, 2001), mais pas toujours (définition de la « plasticité à fitness neutre ») (Schlichting, Pigliucci, 1998). Cette réponse positive, est souvent appelée « plasticité adaptative », néanmoins, certains auteurs préférant éviter toute confusion avec « adaptation » au sens génétique du terme utilisent plutôt l'expression « plasticité bénéfique » (Gotthard, Nylin, 1995). Tous les organismes n'ont pas les mêmes sensibilités, ni la même capacité d'acclimatation, de même, un individu n'est pas toujours apte à faire face à toutes les conditions environnementales : la plasticité a donc des limites (détection des modifications, fonctionnelles, de temps).

Le concept de « norme de réaction » permet de mesurer et de visualiser la plasticité (Gotthard, Nylin, 1995; Schmalhausen, 1949), et peut être définie comme « l'ensemble des phénotypes exprimés par un seul génotype pour toute une gamme de conditions environnementales » (Figure 1.7).



TRENDS in Ecology & Evolution

Figure 1.7: Normes de réaction de 4 géotypes (1 à 4) placés dans 3 environnements (E1, E2, et E3) (modifiée d'après Dingemanse et al. 2010). a) : les 4 géotypes sont doués de la même plasticité phénotypique. b) pas de plasticité phénotypique, absence d'interaction environnement x géotype. c) il y a une interaction entre les géotypes et l'environnement, ce qui montre la même plasticité. d) plasticité d'intensité et de sens différents. La différence entre les 4 géotypes est plus grande en E3 qu'en E1. 1 et 2 sont plastiques, et ont une plus forte valeur du trait en E3, tandis que 3 et 4 ont une plus faible valeur en E3 e) Les géotypes 1 et 3 ont une plus forte valeur du caractère dans E1, tandis que les 2 et 4 sont plus forts en E3. Le géotype 3 n'est pas plastique.

La plasticité phénotypique peut se traduire par des ajustements comportementaux, physiologiques, et morphologiques (Pigliucci, 2001; West-Eberhard, 2003). Elle peut induire des réponses réversibles, variations journalières ou saisonnières comme le bronzage chez l'homme : on parle alors de « flexibilité » (Williams, 1992). Dans d'autres cas, elle induit des réponses irréversibles (Stearns, 1989), comme des modifications morphologique induites durant les premiers stades de l'ontogénèse. C'est le cas des coraux par exemple, qui lorsqu'ils sont placés dans un milieu plus profond, vont être capable de modifier leur morphologie de manière irréversible durant leur croissance, avec des calices plus profonds et des septa plus petits (Ow, Todd, 2010). Ces réponses plastiques peuvent s'exprimer à des échelles de temps différents. En effet, elles peuvent être instantanées, c'est le cas d'un comportement, ou demander un certain délai comme dans le cas d'un changement de morphologie qui s'effectue généralement pendant le développement.

Cette plasticité phénotypique peut avoir un coût, constitutif ou induit. Le cas de la réponse des têtards d'amphibiens face au réchauffement climatique est un exemple de coût constitutif. En réponse à l'augmentation rapide de la température de l'eau de leur milieu perçue comme le signal d'un potentiel assèchement de la mare (Pounds *et al.*, 2006), le développement larvaire est accéléré et la métamorphose est plus rapide, leur permettant de s'affranchir du milieu aquatique. Or, cette métamorphose plus rapide qui est un bénéfice

immédiat, se traduit par une taille plus petite, et par un système immunitaire plus faible, ce qui, à long terme, pourrait avoir de lourdes conséquences (Berven, 1981; Gervasi, Foufopoulos, 2008; Smith, 1987b). Il s'agit donc d'un cas de plasticité phénotypique qui a pour « coût » une réduction de la fitness de l'individu qui dépend du degré de plasticité (Chevin *et al.*, 2010). En revanche, un coût induit va réduire la fitness d'un individu en fonction de la somme des variations phénotypiques.

Cette capacité de réponse à des modifications rapides est dépendante de l'organisme, du trait concerné, du moment pendant lequel il se produisent dans le cycle de vie et aussi de la durée d'exposition à une modification environnementale. C'est un processus particulièrement important dans le contexte actuel de changement global auquel il faut répondre rapidement pour éviter l'extinction, surtout chez les organismes ayant un cycle de vie complexe, comme les amphibiens.

1.2.2.b. Adaptation (plus de citations)

Les réponses des organismes face aux modifications de leur environnement peuvent être le fruit de processus adaptatifs, c'est-à-dire de l'adaptation au sens génétique du terme. En effet, lorsque l'environnement change, les individus peuvent être soumis à de nouvelles pressions sélectives qui vont alors favoriser un phénotype plutôt qu'un autre (Rose, Lauder, 1996). Ce phénomène est lié à la sélection naturelle, qui est un processus adaptatif fondé sur le différentiel de survie et de reproduction des individus. La sélection naturelle n'est pas la survie du meilleur, mais la contre-sélection du moins apte. Ce processus s'applique sur les phénotypes dans une population, et est responsable de l'évolution adaptatrice.

La sélection naturelle repose sur trois principes : celui de la variation, de l'héritabilité, et de l'adaptation. A l'échelle populationnelle, il y a une variabilité génétique plus ou moins importante pour chaque caractère. Plus la variation est importante, et plus la population pourra potentiellement faire face aux modifications environnementales (Chevin *et al.*, 2010). Le principe de l'hérédité, c'est-à-dire de la transmission à sa descendance via le patrimoine génétique des caractères, permet de maintenir cette variabilité génétique au sein des populations. Selon le principe d'adaptation, les individus les plus aptes ont un meilleur succès reproducteur, transmettent leurs avantages sélectifs à leurs descendants, et se retrouvent en majorité dans leur population au fil des générations (Jump, Penuelas, 2005). C'est via ce processus de sélection que certaines populations ou espèces sont dites « spécialisées », et

présentent des adaptations locales (Rose, Lauder, 1996). Le cas de spéciation allopatrique par sélection naturelle le plus cité est celui des pinçons des Galapagos observés par Darwin qui, selon leur niche écologique, ont des becs de différentes formes et tailles due à des pressions de sélections (Figure 1.8). Celles-ci s'exercent différemment d'une espèce à l'autre, ou d'un milieu à l'autre. L'adaptation génétique peut être lente dans un environnement hétérogène à l'échelle spatiale et temporelle.

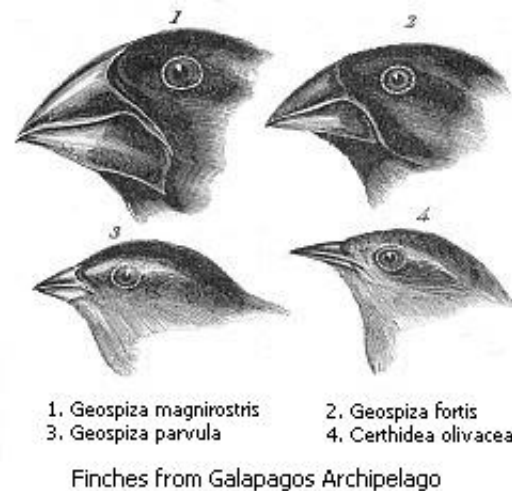


Figure 1.8 : Gravure représentant un échantillon des différents morphotypes des pinçons des îles Galapagos.

Les réponses dues à de l'adaptation génétique sont du même ordre que celles résultant de la plasticité phénotypique : morphologiques, physiologiques, et comportementales. L'exemple de l'évolution des morphotypes chez la phalène du bouleau due à un processus de sélection naturelle est un cas d'école. Ces papillons de jour étaient majoritairement de couleur claire jusqu'au début du dix-neuvième siècle. Puis, au cours du XIX^{ème} siècle, des morphotypes plus sombre (forme mélanique) ont été observés, et sont devenu les formes dominantes. Ainsi, en 1895, 98% des phalènes étaient mélaniques dans la banlieue de Manchester (Grant, Wiseman, 2002). Haldane a noté que ce changement de proportion de couleur était lié à l'industrialisation fleurissante de l'époque, dont la conséquence était la pollution de l'environnement qui a noirci le tronc des bouleaux. Les papillons les plus clairs ont alors été plus facilement repérés par leurs prédateurs, alors que les papillons sombres bénéficiaient d'un avantage adaptatif. On voit donc que des événements aléatoires et contingents comme dans ce cas, la pollution industrielle (Kettlewell, 1958), ont des effets directs sur la sélection et l'adaptation, et donc sur l'évolution de l'espèce.

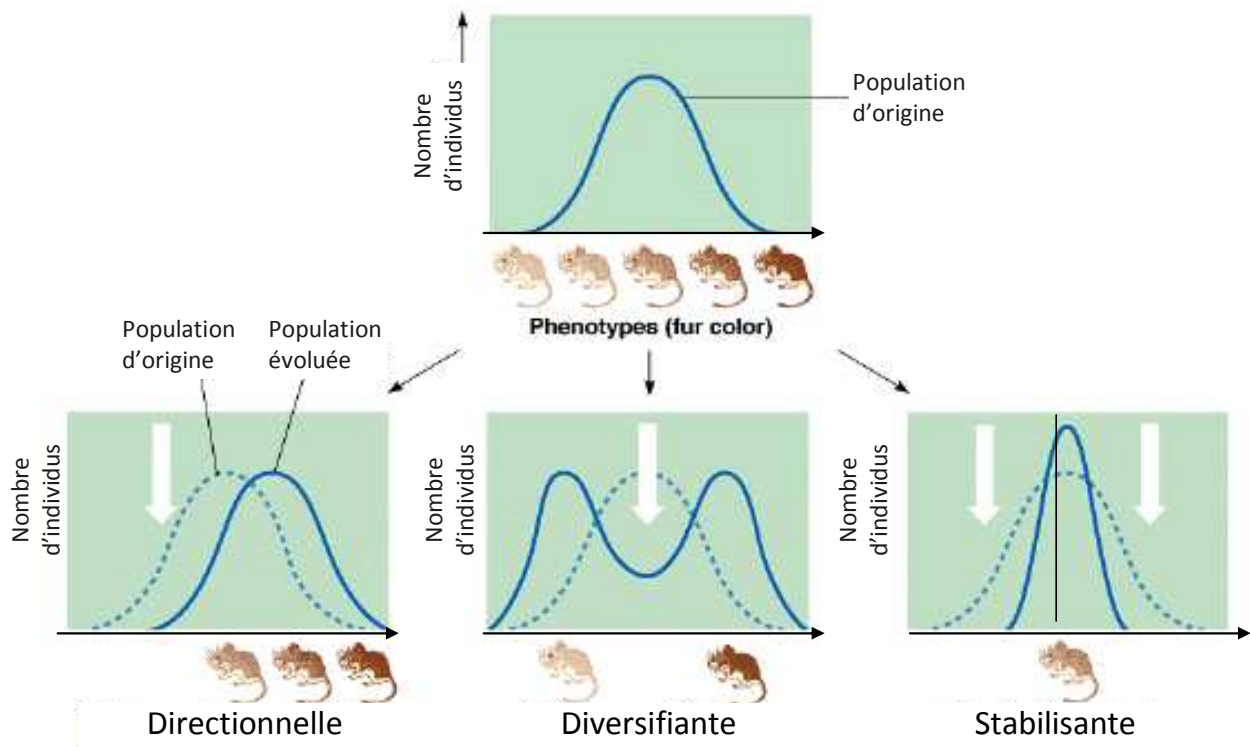


Figure 1.9 : Représentation schématique des trois formes de sélection naturelle. La courbe bleue en pointillés représente la fréquence phénotypique avant que la pression de sélection n'agisse. La courbe bleue représente la fréquence phénotypique après que la pression de sélection agisse.

On distingue trois formes de sélection naturelle : orientée (ou directionnelle), diversifiante (ou disruptive), et stabilisatrice (ou normalisante) (Figure 1.9). La sélection orientée favorise le développement d'un caractère au détriment d'un autre. C'est l'exemple classique du panache des orignaux mâles (Terry Bowyer *et al.*, 2001). La sélection diversifiante favorise au contraire les types extrêmes d'une population et est très rare en milieu naturel (Van Doorn *et al.*, 2009). C'est le cas des pyrénestes ponceaux africains où est observé un polymorphisme de la taille du bec (Clabaut *et al.*, 2009). Enfin, la sélection stabilisatrice tend quant à elle à éliminer les formes extrêmes d'un caractère au bénéfice des individus moyens. Elle réduit la variance génétique autour de la moyenne « optimale », comme la taille des éléphants de mer mâle, ou bien le poids des bébés chez l'homme.

L'adaptation est donc un processus à long terme, qui bien souvent est « pris de court » par la vitesse des modifications environnementales, et n'induit pas une réponse assez rapide pour permettre aux organismes de faire face au changement globale.

1.2.2.c. Distinction entre plasticité et adaptation

Face à des normes de réaction en réponse à des changements environnementaux, comment savoir s'il s'agit de plasticité phénotypique ou bien du processus d'adaptation génétique ? C'est une question centrale en écologie évolutive (Gotthard, Nylin, 1995). La distinction entre les deux peut être faite en utilisant des méthodes expérimentales de transplantations réciproques par exemple (Berven *et al.*, 1979; Trexler *et al.*, 1990). Les paramètres observés sont souvent des différences de performances, des mesures morphométriques, des tests de sélection sexuelle, et d'autres encore. Ainsi, l'expérimental permet d'identifier les sources des variations phénotypiques. L'approche moléculaire peut aussi mettre en évidence la présence de certains gènes produisant une réponse adaptée aux changements (Rose, Lauder, 1996).

Comprendre comment les organismes réagissent, à quelle ampleur, et quels sont leurs facteurs biotiques et abiotiques limitant, sont de véritables challenges en biologie de la conservation.

1.3. Le cas particulier des organismes asexués

Les organismes asexués constituent un cas particulier en écologie évolutive spécialement intéressant pour étudier les processus d'adaptation. Le paradigme de la biologie évolutive veut que la reproduction sexuée soit plus avantageuse que l'asexualité, puisqu'elle maintient un polymorphisme et une diversité génétique importants. Ainsi, plus les variations génétiques sont importantes, et plus la diversité phénotypique le sera, conférant aux organismes une grande plasticité. Les complexes de clones sont composés de membres présentant d'extrêmement grandes similarités écologiques (Wilson, Hebert, 1992). L'asexualité présente donc un désavantage à long terme à cause de la perte de variabilité génétique, mais aussi de l'accumulation d'allèles délétères, qui en l'absence de brassage génétique, ne peuvent être purgés (mécanisme du « cliquet de Muller »).

L'adaptation implique souvent un grand nombre de changement dans le génome, résultant de l'accumulation de plusieurs mutations « bénéfiques » chez un individu. Or, chez les organismes asexués, la combinaison des mutations doit être fixée au sein d'une même lignée

pour être bénéfique, car la sélection s'applique non pas sur les allèles, mais sur l'individu entier (Vorburger *et al.*, 2003). En revanche, chez les organismes sexués, populations qui échangent des informations génétiques, les mutations avantageuses peuvent se produire chez différents individus, et être combinées par la suite. Cette recombinaison accélère l'adaptation au sens génétique du terme, et se traduit par un avantage évolutif important de la reproduction sexuée (Neher *et al.*, 2010).

Mais la sexualité apparaît moins avantageuse si on prend en compte ses coûts : la recombinaison peut séparer et éliminer de bonnes combinaisons alléliques, et ce mode de reproduction est bien plus coûteux en dépense énergétique lors de l'accouplement, et nécessite la présence de mâles (Neher *et al.*, 2010). L'étude des interactions et assemblages chez les lignées clonales est particulièrement intéressante du fait des fortes pressions de sélection biotiques et abiotiques agissant sur ces organismes (Wilson *et al.*, 1999).

Les hybrides unisexués sont le résultat de croisements entre des espèces sexuées et se stabilisent via un mode de reproduction clonal (parthénogénèse, gynogénèse) ou hémiclinal (hybridogénèse) (Plenet *et al.*, 2005). Ce sont généralement des « cul-de sac » évolutifs car la majorité de ces lignées finissent par disparaître (Simon *et al.*, 2003). Néanmoins, la persistance de plusieurs lignées asexuées au sein de taxa indépendants, parfois anciennes, amène à s'interroger sur les avantages de ce mode de reproduction. Cet « état » hybride les aurait avantagés en leur permettant de coloniser de nouveaux habitats, la parthénogénèse ayant un rôle secondaire en stabilisant fortement certains génotypes hybrides (Kearney, 2005). Le modèle de Moore (1977) prédit ainsi que la supériorité hybride, appelée Heterosis pour vigueur hybride, serait due à un fort taux d'hétérozygotie (Moore, 1977). Le succès évolutif des lignées clonales, ainsi que la coexistence de taxa sexués et asexués, s'expliqueraient par deux modèles différents (Figure 1.10). Le premier est appelé « modèle du General-purpose-genotype » (noté GPG), selon lequel les lignées clonales sont écologiquement très tolérantes et géographiquement étendues (Baker 1965; Schultz 1971, 1977; Parker *et al.* 1977). Ces lignées sont donc généralistes, exploitent divers habitats aux caractéristiques écologiques différentes, et montrent une faible variation de leur fitness en fonction de l'environnement (Lynch, 1984). La clonalité peut ici être vue comme un atout permettant de coloniser des milieux instables et temporaires, du à la fixation de génotypes adaptés à une grande valence écologique plus aisée que pour les populations sexuées. Par exemple, parmi le groupe des Cyprinidés, les individus du taxon *Darwinula stevensoni* ayant

une reproduction asexuée montrent une grande tolérance face aux variations de température et de salinité, ce qui supporte le modèle GPG (Van Doninck *et al.*, 2002).

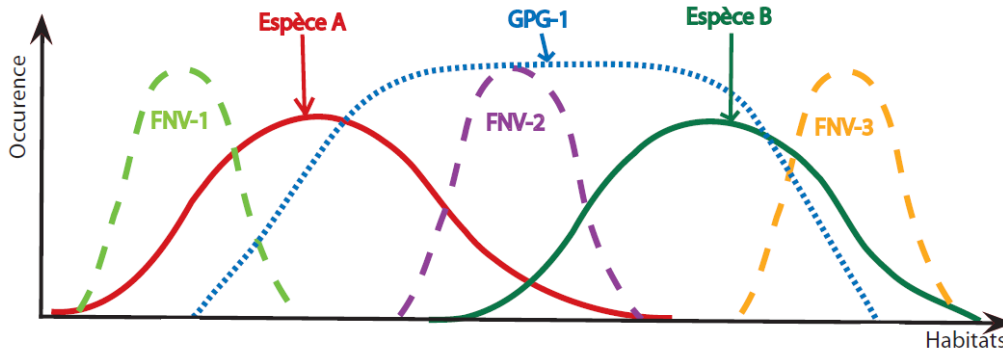


Figure 1.10 : Schéma représentant la sélection de l'habitat des lignées clonales selon les modèles GPG et FNV (adaptée selon Vrijenhoek 1994). Il s'agit de l'abondance des espèces parentales et des lignées clonales FNV et GPG en fonction d'un gradient d'habitat. Les hybrides GPG-1 ont une niche écologique de grande amplitude, tandis que les FNV-1, FNV-2 et FNV-3 occupent des niches restreintes et différentes.

Or, dans le cas où les hybrides sont dépendants des espèces parentales, ce modèle GPG impliquerait à long terme la disparition de celles-ci. Moore (1984) élabore alors le modèle de niche intermédiaire (Moore, 1984), repris par Vrijenhoek en 1984, qui propose un second modèle, celui de la ségrégation des habitats, appelé « modèle du Frozen-Niche-Variation », (noté FNV), qui prédit que différents clones sont chacun adaptés localement à des conditions distinctes. Ces hybrides occupent souvent une niche intermédiaire à celles des espèces parentales. Les clones peuvent coexister avec les espèces parentales dans un environnement hétérogène dans la mesure où ils sont rarement dans les mêmes niches écologiques (en sympatrie). Les lignées clonales sont spécialistes, et ont une bonne fitness dans leur habitat, tandis qu'elle est inférieure à celle des espèces parentales lorsqu'ils sont en sympatrie (Vrijenhoek 1979, 1994). Cette adaptation à des niches écologiques différentes de celle des espèces parentales permet de prédire et/ou d'observer des lignées hybrides persistantes (Arnold, Hodges, 1995). C'est le cas des lignées clonales chez *Daphnia pulex*, qui sont abondantes et dominantes dans les habitats à forte salinité. Lorsqu'expérimentalement, la salinité diminue, l'abondance des lignées clonales chute. Elles sont donc très spécialisées, adaptées à une certaine salinité (Wilson, Hebert, 1992), et sont considérées comme répondant au modèle FNV.

Ces cas sont intéressants pour l'écologie évolutive d'une manière générale et sont indispensable pour modéliser (prédire) les risques d'extinction et/ou de persistance des taxons du complexe d'hybridation (Hellriegel, Reyer, 2000). C'est le cas des grenouilles vertes européennes où l'on retrouve de tels phénomènes (Pagano, 1999). En effet, ce groupe d'amphibiens, présent dans toute l'Europe, comprend plusieurs complexes d'hybridations, notamment des lignées hybrides unisexuées, qui persistent depuis de nombreuses années. Ces dernières sont très largement réparties, et semblent peu touchées par la perte de biodiversité actuelle. Plusieurs études considèrent que les hypothèses GPG et FNV chez ces hybrides ne seraient pas exclusives, et leur combinaison expliquerait le maintien de nombreuses lignées clonales (Hotz *et al.*, 1999; Semlitsch *et al.*, 1997; Vrijenhoek, 1998). Ces deux modèles GPG et FNV prédisent tous les deux une bonne adaptation des clones. Cependant, dans le contexte actuel de changement global, on peut s'attendre à ce que le GPG soit préférentiellement sélectionné, car les clones à adaptation restreinte ont un risque d'extinction plus fort (Forbes, 1997). C'est pour ces raisons que nous avons choisi les grenouilles vertes comme modèle biologique pour cette étude.

1.4. Intérêt du groupe modèle

1.4.1. Les complexes d'hybridations en France

Le complexe *Pelophylax esculentus* est le plus répandu en Europe (Berger, 1988; Graf, Polls Pelaz, 1989; Pagano *et al.*, 2001a), impliquant les deux espèces *P. ridibundus* Pallas (1771) (génotype RR) et *P. lessonae* Camerano (1882) (génotype LL), ainsi que l'hybride *P. kl. esculentus* Linnaeus 1758 (génotype RL) issu du croisement entre les deux premières espèces (Berger, 1973; Heppich, 1977). Les hybrides de ce complexe ont un mode de reproduction particulier appelé l'hybridogénèse. Observée en 1969 par Schultz chez des poissons actinoptérygiens du groupe des Poeciliopsis, cette stratégie de reproduction, très rare, a été observée au sein d'autres complexes d'hybridations, comme chez les insectes *Bacillus rossius-grandii* (Tinti *et al.*, 1995), ainsi que le complexe alburnoïdes chez les Cyprinidés (ex: *Trophidophoxinellus*) (Collares-Pereira *et al.*, 1999). De nombreuses études ont observé ce mécanisme de reproduction chez *P. kl. esculentus*, l'ont mis en évidence grâce à des élevages expérimentaux (Berger, 1973; Tunner, 1979; Uzzell, Hotz, 1979), à des techniques telles que la gynogénèse (Graf J.-D., P., 1979) et les caryotypages, ainsi que par des analyses allozymiques (Uzzell *et al.*, 1980).

L'hybridogénèse impliquant les grenouilles vertes repose sur plusieurs caractéristiques: les hybrides sont viables, fertiles, et des deux sexes (Graf, Polls Pelaz, 1989). Lors de la gamétogénèse, l'hybride élimine systématiquement le génome de l'espèce parentale avec laquelle il est en sympatrie lors d'une phase pré-méiotique. Le génome restant subit ensuite une duplication avant d'entrer en méiose (Vinogradov, Chubinishvili, 1999b). Cet hybride ne produit alors que des gamètes contenant le génome d'une des deux espèces parentes. Il perpétue sa lignée par back-cross avec l'espèce parentale dont le génome a été éliminé, afin de rétablir à chaque génération le génome perdu lors de la gamétogénèse (Graf J.-D., P., 1979; Uzzell *et al.*, 1980). Il n'y a donc pas (a priori) de recombinaison lors de la formation des gamètes, et la reproduction est de type hémiclonale (Hotz, 1983; Uzzell *et al.*, 1980).

Chez ce complexe *P. esculentus*, Holsbeek & Jooris (2009) ont noté l'existence de trois stratégies de reproduction différentes, appelées « système », présentes dans régions distinctes (Figure 1.11).

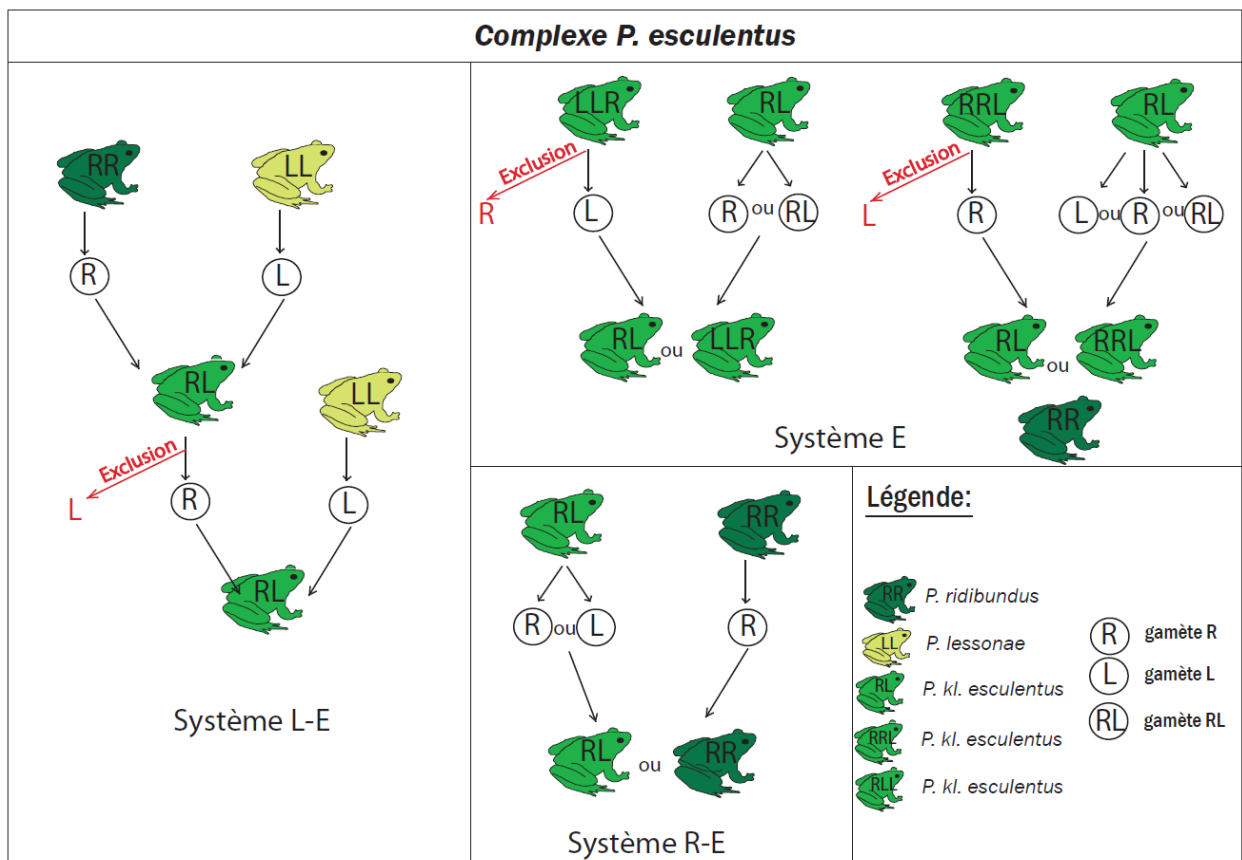


Figure 1.11 : Schéma de l'hybridogénèse chez les grenouilles du complexe *P. esculentus*.

Le système « *P. lessonae* – *P. kl. esculentus* » (L–E) est de loin le plus répandu, principalement dans l’Ouest de l’Europe (Graf, Polls Pelaz, 1989). Dans ce système, l’hybride, issu d’une hybridation primaire entre *P. ridibundus* et *P. lessonae*, vit en sympatrie avec la seconde espèce parentale, ou avec les deux à la fois. C’est le génome de l’espèce *P. lessonae* qui est exclu des cellules germinales, au cours de la gamétogénèse, lors d’une phase pré-méiotique, celle de la prolifération des ovogonies (Tunner, Heppich, 1981). Cette élimination du génome *Lessonae* pourrait faire suite à son inactivation, induite par certains gènes du génome *ridibundus* (Uzzell *et al.*, 1980). L’exclusion semble être graduelle, et ce ferait au cours de mitoses successives (Ogielska, 1994), ou bien serait due à une dégradation enzymatique durant laquelle la chromatine dégradée *Lessonae* serait rejetée hors du noyau sous forme de « nucleus-like-bodies » (Ogielska, 1994; Vinogradov, Chubinshvili, 1999a).

Le système « *P. kl. esculentus* » (E pur) (Graf, Polls Pelaz, 1989), seconde stratégie observée, est la reproduction entre deux hybrides *P. kl. esculentus*. La théorie, confirmée par les expérimentations, prévoit que la grande majorité de ces têtards *P. ridibundus* néo-formés meurent, à cause de l’accumulation stochastique d’allèles délétères (processus appelé cliquet de Muller). En effet, le génome R étant transmis clonalement par les gamètes des hybrides, les descendants portent deux jeux de chromosomes sans recombinaison, donc sans purge des mutations délétères, létales à l’état homozygote (Binkert *et al.*, 1982; Uzzell *et al.*, 1980). Néanmoins, de nombreuses autres expérimentations ont montré que les individus *P. ridibundus* néo-formés survivent normalement, car dans le milieu naturel, les génomes R portés par les 2 hybrides n’ont souvent pas la même origine parentale, et donc ne sont pas porteurs des mêmes mutations délétères (Graf, Mueller, 1979; Guex *et al.*, 2002; Vorburger, 2001d; Vorburger, Reyer, 2003). D’autre part, en conditions naturelles, les populations E pur ont « détourné et résolu » le problème par la production d’une mosaïque de gamètes (génome R, L ou diploïde RL). En conséquence, les descendants de ces croisements sont le plus souvent *P. kl. esculentus* (diploïdes ou triploïdes) mais parfois de l’espèce *P. ridibundus*.

Le système « *P. ridibundus* – *P. kl. esculentus* » (R–E), qui est l’inverse du système L-E. Certains hybrides réalisent une hybridogénèse imparfaite, et produisent une minorité de gamètes R, mais de nombreux gamètes L (Vinogradov 1991). Parmi les descendants on retrouve à la fois des *P. ridibundus* néo-formés (minoritairement) et des hybrides *P. kl. esculentus* (majoritairement).

Un second complexe d'hybridation est présent sur le territoire français, il s'agit du **complexe *Pelophylax grafi***. Ce dernier est localisé dans le Sud de la France ainsi qu'en Espagne (Crochet *et al.*, 1995; Daf *et al.*, 2006; Graf *et al.*, 1977; Graf, Polls Pelaz, 1989; Pagano *et al.*, 2001c), et comprend les espèces *P. ridibundus* Pallas (1771) (génotype RR) et *P. perezi* Seoane (1885) (génotype PP), ainsi que l'hybride *P. kl. grafi* Crochet 1995 (génotype RP) issu du croisement entre les deux premières espèces. Ce complexe est analogue au premier, les hybrides hybridogénétiques ne produisant que des gamètes renfermant le génome R (Figure 1.12). L'hybridation primaire à l'origine du génome R porté par l'hybride n'est pas connue, car il peut être transmis par un parent *P. ridibundus* ou bien par un hybride *P. kl. esculentus* (Arano *et al.*, 1995).

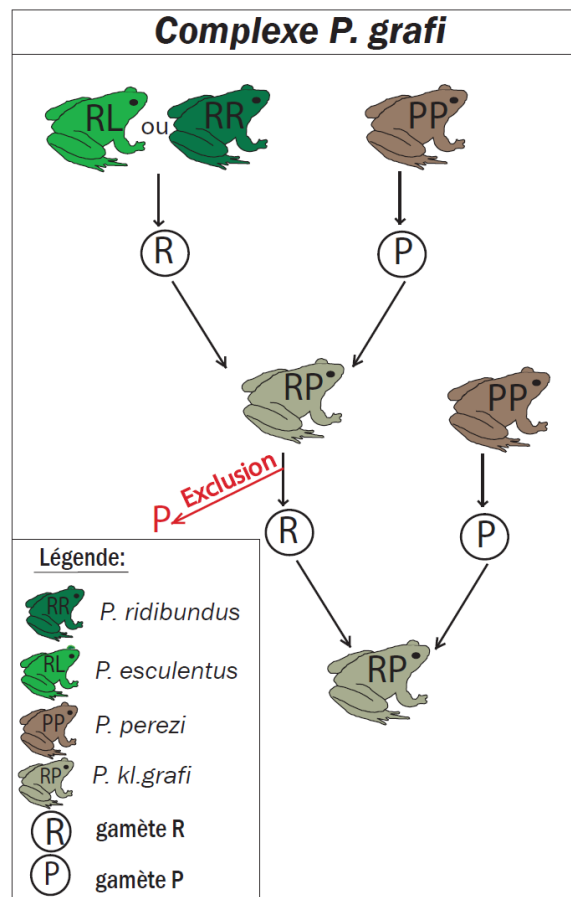


Figure 1.12 : Schéma de l'hybridogénèse chez les grenouilles du complexe *P. grafi*.

Les causes déclenchant une reproduction hybridogénétique et les mécanismes exacts gouvernant l'exclusion d'un des deux génomes parentaux restent à clarifier. Pols-Pelaz (1995) souligne que c'est toujours le même génome parental qui est impliqué dans tous les cas recensés d'hybridogénèse, que ce soit chez les complexes *Poeciliopsis*, les complexes

Bacillus, et les complexe Pelophylax. En effet de nombreuses observations suggèrent que certains allèles portés par le génome R induiraient l'élimination dans les cellules germinales du génome L. Tout d'abord, le génome exclu lors de la gamétogénèse est le plus souvent celui de l'espèce parentale *P. lessonae*. Ainsi, seul le génome *ridibundus* est transmis dans les gamètes (Graf, Polls Pelaz, 1989; Guerrini *et al.*, 1997; Polls-Pelaz, 1995; Vinogradov *et al.*, 1991). De plus, le génome *ridibundus* est présent dans tous les cas d'hybridogénèse. Et enfin, aucune des lignées hybrides n'impliquant pas de *P. ridibundus* ne montre un mode de reproduction hybridogénétique.

Par ailleurs, on observe une variation géographique dans la capacité de *P. ridibundus* à induire l'exclusion de génome. Le génome *ridibundus* de nombreuses hybrides venant de populations dans le sud de l'Europe n'ont pas de reproduction hybridogénétique (Guerrini *et al.*, 1997; Hotz *et al.*, 1985; Hotz, Uzzell, 1983). Ceci suggérerait que la capacité à induire l'élimination du génome de l'autre espèce parentale serait assez récente, et surtout, qu'il existerait différents groupes de *P. ridibundus* : ceux induisant l'hybridogénèse, et ceux non-hybridogénétiques.

1.4.2. L'origine des grenouilles vertes

La divergence de nombreuses espèces a eu lieu durant les différentes oscillations climatiques de ces dernières 2,4 millions d'années (Veith *et al.*, 2003), dominées par des phases de glaciations interrompues par de courte période interglaciaires (Hewitt, 1996; Hewitt, 1999; Hewitt, 2004). Au cours de ces périodes glaciaires du Pliocène et Pléistocène, la faune tout comme la flore en Europe se limitait aux zones chaudes (Babik *et al.*, 2004), dans trois régions : l'Italie, la péninsule balkanique, et la région Ibérique, qui constituaient les principales zones refuges. Ces dernières ont servi de « populations sources » lors de la recolonisation durant la déglaciation (Taberlet *et al.* 1998; Hewitt 1999). Néanmoins, ces zones sources ont été supplées par des zones refuges cryptiques situées au Nord et dans le Centre de l'Europe, où devaient régner un microclimat favorable (Snell *et al.* 2005; Zeisset, Beebee, 2001 ; Lymberakis *et al.* 2007; Plötner *et al.* 2001).

La différenciation des trois principales espèces présentes en France à eu lieu durant la dernière glaciation, le Würm (80 000 à 8 000 ans BP), durant laquelle le groupe ancestral de grenouilles vertes s'est réfugié dans les trois zones refuges. Ces trois groupes sont alors restés séparés durant de nombreuses années, ont évolué, aboutissant à de la spéciation géographique: *P. ridibundus* dans les balkans, *P. lessonae* en Italie, et *P. perezi* dans la péninsule ibérique

(Snell *et al.*, 2005; Zeisset, Beebee, 2001). Certains individus de l'espèce *P. lessonae* auraient migré de l'Italie vers le Nord en direction du Royaume Uni, connecté alors au continent par les terres émergées (Zeisset, Beebee, 2001) (Figure 1.13). A la fin de cette période glaciaire, l'aire de répartition de ces trois espèces s'est étendue à tout le Nord de l'Europe suivant un climat plus favorable, et sont entrées en contact, créant des zones d'hybridations.

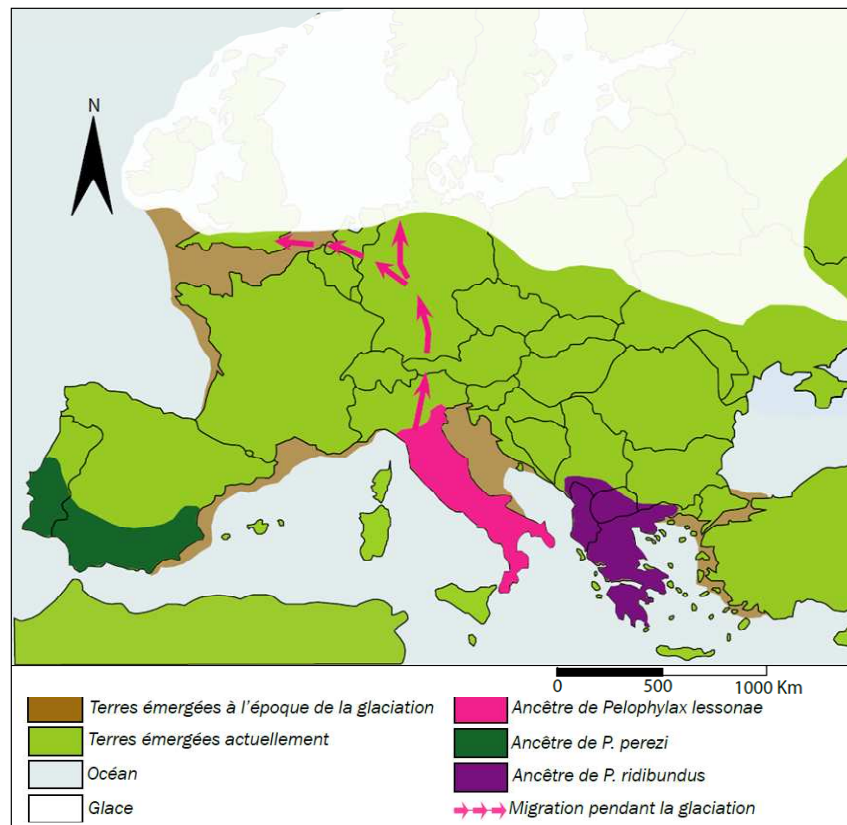


Figure 1.13: Répartition supposée des ancêtres des grenouilles vertes actuelles dans les trois principales zones refuges lors de la dernière glaciation, réalisée selon les analyses de Zeisset et al. (2001), Snell et al (2005), Lymperakis et al. (2005), Ohst (2008).

1.4.3. La systématique

Les grenouilles vertes font parties de la famille des Ranidés, qui est l'une des plus diversifiée (Che *et al.*, 2007). Elles appartiennent au genre *Pelophylax*, qui comprend 23 taxa (Frost *et al.*, 2006), et sont présentes dans toute l'Europe, mais aussi en Asie et dans les régions méditerranéennes. Du fait de leur répartition sur une large zone ayant une histoire géologique complexe (Poulakakis *et al.*, 2003), et de leur divergence tardive, les amphibiens du genre *Pelophylax* ont une phylogénie difficile et compliquée à élucider (Lymberakis *et al.*,

2007; Plötner, 2005). Dans les années 1870-1940, un grand nombre d'espèces ont été décrites sur des bases morphologiques et bioacoustiques. Puis, suite aux premières analyses génétiques, certaines espèces ne divergeaient pas suffisamment, et ont été regroupées au sein d'une même espèce. Les investigations à l'aide d'outils moléculaires plus sophistiqués s'étant développées, de nouvelles espèces ont alors été détectées et intégrées à ce genre, notamment *P. cerigensis* (Beerli, Hotz, Tunner, Heppich & Uzzell, 1994), et *P. cretensis* (Beerli, Hotz, Tunner, Heppich & Uzzell, 1994). De plus, un grand nombre de lignées étroitement liées aux *P. ridibundus* ont été identifiées ces dernières années, surtout dans le sud et de l'est de son territoire. Ainsi, *P. kurtmuelleri* (Gayda, 1940), décrite il y a de nombreuses années, a longtemps été confondue avec *P. ridibundus*, et est considérée désormais comme une espèce (Lymberakis *et al.*, 2007), appartenant au groupe *ridibundus* (ridibundus-like water frog species) (Ohst, 2008) ou encore *P. cf. ridibundus*. Les relations phylogénétiques parmi les *P. ridibundus* restent encore non résolues, et d'autres lignées sont encore actuellement sous le nom de *P. ridibundus*, comme *P. ridibundus caralitanus* présente en Anatolie (Lymberakis *et al.* 2007, Plötner 2005). La dernière révision de la systématique remonte à 2006, où l'ensemble des grenouilles vertes de la famille des Ranidés, genre *Rana*, sous-genre *Pelophylax*, s'est vu changer de nom de genre (du genre *Rana* au genre *Pelophylax* Fitzinger, 1843) (Frost *et al.*, 2006).

1.4.4. L'identification taxonomique

L'identification taxonomique des ces différents taxa peut être problématique chez les grenouilles du genre *Pelophylax*. La première méthode d'identification utilisée était basée sur des mesures morphométriques très sophistiquées (Berger, 1966; Crochet *et al.*, 1995), qui était complétées souvent par l'étude de paramètres bioacoustiques (Roesli Marzia, 2000; Wycherley *et al.*, 2002). Néanmoins, du fait de leur capacité à s'hybrider, de leur grande ressemblance, et des variations intra-taxon tant au niveau local que régional (Plötner *et al.*, 2001; Wycherley *et al.*, 2002), ces méthodes ont été fortement remises en questions, car pas assez robustes (Lodé, Pagano, 2000; Pagano, Joly, 1999; Plötner *et al.*, 2001). En outre, dans l'Ouest de l'Europe, ces méthodes d'identification sont d'autant plus inefficaces que l'existence d'hybridations importantes entre grenouilles autochtones et allochtones a été notée (Holsbeek *et al.*, 2008; Mezhzherin, Morozov-Leonov, 1997; Pagano *et al.*, 2003; Plötner *et al.*, 2008; Vorburger, Reyer, 2003), conduisant à toute une mosaïque de caractères. Du fait de tous ces biais, depuis les années 1980, les taxa du groupe des grenouilles vertes sont identifiés

par des méthodes génétiques, plus fiables (Gutmann *et al.*, 1994; Hotz, 1983), grâce aux allozymes, protéines possédant des allèles spécifiques de chaque taxon (Hotz, 1983; Uzzell, Berger, 1975; Uzzell, Hotz, 1979). De plus, avec les avancées importantes en biologie moléculaire, de nouveaux marqueurs ont été récemment développés (ND2, ND3, les microsattellites et autres séquences nucléaires) (Garner *et al.*, 2000; Holsbeek *et al.*, 2009a; Holsbeek *et al.*, 2008; Zeisset, Beebee, 2000) afin de tenter de rendre plus facile l'affiliation taxonomique des individus du complexe *P. esculentus*, qui reste de nos jours difficile à élucider.

1.4.5. La répartition

Parmi les grenouilles du groupe Paléarctique occidental décrites actuellement en France, l'espèce *P. ridibundus* (la grenouille rieuse) a la plus grande zone de distribution, qui comprend une grande partie de l'Europe et de l'Asie occidentale (Figure 1.14) (Günther, 1990; Ohst, 2008). Dans la partie occidentale de son aire de distribution, *P. ridibundus* a été introduite dans le Sud de l'Angleterre, et localement dans les péninsules Ibériques et Italiennes (Arano *et al.*, 1994; Arano *et al.*, 1995; Pagano *et al.*, 2001b). En France, l'aire de distribution est en évolution constante du fait des nombreuses et régulières importations de grenouilles rieuses en provenance d'Égypte, d'Anatolie et des Balkans. En effet, les cuisses de grenouilles faisant partie de la gastronomie française traditionnelle, au moins 5000 tonnes de grenouilles vertes vivantes en provenance de Yougoslavie ont été importée sur notre territoire de 1928 à 1965, soit 142 millions de spécimens en moyenne (Ljubisavljevic *et al.*, 2003). Désormais, les importations viennent essentiellement d'Orient, à raison de 700 à 800 tonnes par an (Neveu, 2004). Ainsi, l'aire de répartition de cette espèce s'étend très rapidement vers l'Ouest de la France, et il est très difficile de trancher quant au statut natif ou non des grenouilles rieuses (Pagano *et al.*, 2003), car elles ne sont réputées autochtones que dans l'Est du pays, autour du lac Léman et le long de la vallée du Haut-Rhône (Graf, Polls Pelaz, 1989).

Une seconde espèce de grenouilles vertes est présente en France, il s'agit de *P. lessonae* (la grenouille de Lessona), qui a une répartition proche de celle de son hybride associé *P. kl. esculentus*, et est relativement importante, s'étendant de la côte Atlantique française jusqu'à la Russie (Pascal *et al.*, 2003), mais qui ne descendrait pas autant au Sud-Est (notamment le Proche-Orient) que la répartition de *P. ridibundus* (Beebee *et al.*, 2005; Graf,

Polls Pelaz, 1989; Zeisset, Beebee, 2001). Enfin, le Sud de la France est colonisé par l'espèce *P. perezii*, qui est largement répartie dans la péninsule Ibérique (Arano *et al.*, 1994; Crochet *et al.*, 1995; Hotz, 1994). La répartition de son hybride associé est en revanche restreinte à la partie Nord de l'Espagne et au Sud de la France, ce qui pourrait être dépendant à la présence de la seconde espèce parentale. En effet, *P. ridibundus* n'est pas présente en Espagne, à l'exception de cas d'introductions anthropiques (Arano *et al.*, 1994).

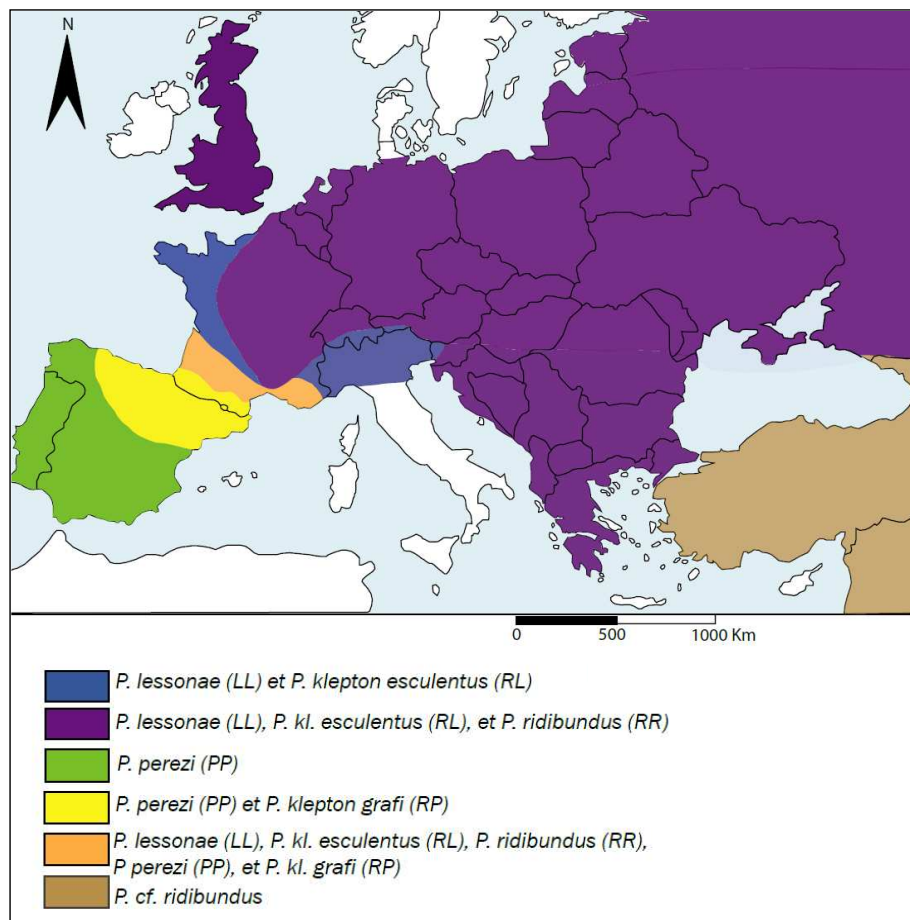


Figure 1.14: Répartition actuelle des grenouilles des complexes *P. esculentus* et *P. grafi* en Europe, réalisée d'après plusieurs auteurs (Beebee *et al.*, 2005; Crochet *et al.*, 1995; Ohst, 2008; Pagano *et al.*, 2001a; Pagano *et al.*, 2001c; Plötner *et al.*, 2001).

1.4.6. Partition de niche

Considérées comme ubiquistes, de nombreuses investigations ayant observé l'utilisation de l'habitat des grenouilles du complexe *P. esculentus* ont néanmoins montré que les deux espèces parentales (*P. ridibundus* et *P. lessonae*) occupent des habitats différents, suivant un gradient d'influence hydrographique, ce qui suggère une partition de niche

écologique (Pagano et al. 2001a; Pagano et al., 2001c; Holenweg-Peter et al., 2002). Des études expérimentales ont observées que les performances de développement et de croissance des têtards des différents taxa du complexe diffèrent selon les conditions écologiques (Figure 1.15): l'espèce parentale *P. lessonae* est bien adaptée à des milieux pauvrement oxygénés, contrairement à *P. ridibundus*. L'hybride montre ici des performances intermédiaires aux deux espèces parentales. La distribution des taxa varie donc en fonction des besoins en oxygène (Pagano et al., 2001b; Plenet et al., 2000a; Plenet et al., 1998; Plenet et al., 2000b).

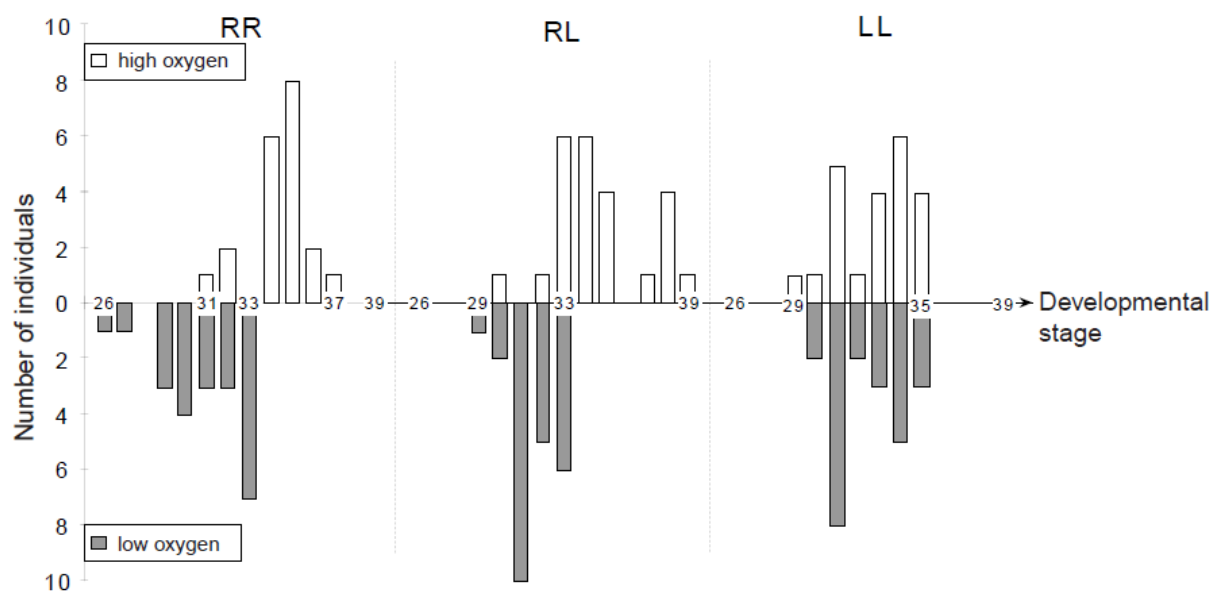


Figure 1.15 : Distribution des stades larvaires de chaque taxon du complexe *P. esculentus* à la fin de l'expérience sous faible (gris) et fort (blanc) taux d'oxygène (Plenet et al., 2000b). Ce graphique nous montre les différences d'exigence des taxa en oxygène, suggérant une partition de niche écologique.

Les grenouilles rieuses, occupent préférentiellement des milieux à forte influence fluviale, à eau renouvelée, et de grande taille, de type lacs, étangs, rivières, bras morts (boire) et gravière (Figure 1.16). Ces habitats sont caractérisés par un fort taux d'oxygène dissous dans l'eau, un courant assez important, et un substrat sableux ou gravillonneux. Au contraire, les grenouilles de Lessona occupent plutôt des habitats plus petits, isolés, parfois même temporaires, caractérisés par une eau stagnante et faiblement oxygénée, et un substrat vaseux (Berger, 1973; Morand, Joly, 1995; Pagano et al., 2001b; Plenet et al., 2000b; Regnier, 1983). Les hybrides *P. kl. esculentus* occupent une large gamme d'habitats, avec une présence plus affirmée dans les milieux intermédiaires (Berger, 1973). La persistance des lignées hybrides s'expliquerait donc par l'hypothèse de l'occupation de la niche intermédiaire par les hybrides

(Pagano et al. 2001a) bien que ceux ci cohabitent le plus souvent avec l'espèce qu'ils parasitent sexuellement (Pagano *et al.*, 2001a; Pagano *et al.*, 2001b; Plenet *et al.*, 2000b). Ces hybrides montrent une valence écologique plus large et présentent souvent une fitness supérieure à au moins l'une des deux espèces parentales, voire les deux, ce qui est appelé Heterosis, ou encore vigueur hybride (Berger, Rybacki, 1997; Gutmann *et al.*, 1994; Hotz *et al.*, 1999; Semlitsch, Reyer, 1992; Tietje, Reyer, 2004).

L'utilisation de l'habitat par le complexe *P. grafi* est en revanche très peu connue. D'après les quelques observations recensées, le complexe P-G serait relativement ubiquiste, présent aussi bien en milieu permanent que temporaire, tel des zones inondées, des rizières, des lacs de montagnes, des canaux d'irrigations, etc (Pagano *et al.*, 2001a).

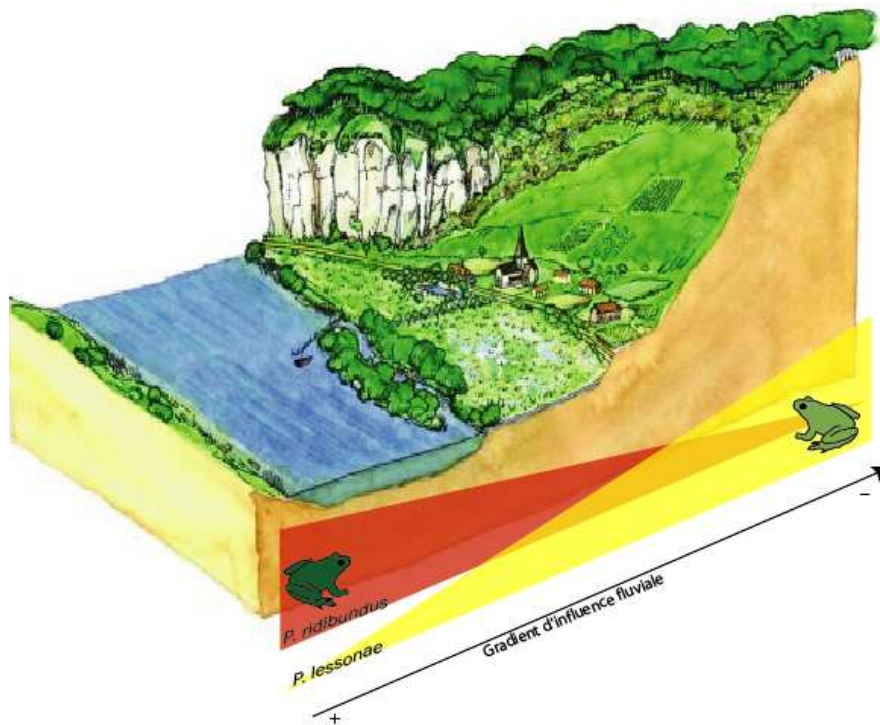


Figure 1.16 : Schéma représentant la présence des deux espèces du complexe *P. esculentus* en fonction du gradient d'influence fluviale.

1.5. Les objectifs de la thèse

L'objectif principal de la thèse est d'évaluer les exigences écologiques des grenouilles vertes, en comparant les capacités d'acclimatation des différents taxa. Pour se faire, plusieurs étapes sont nécessaires.

Dans le Chapitre II dédié à la méthodologie, sont présentées la biologie des grenouilles vertes, zones d'études, ainsi que méthode d'échantillonnage et étude des paramètres de leurs habitats.

Le premier volet du Chapitre III a pour but l'identification taxonomique par outils moléculaires des grenouilles vertes afin d'avoir une affiliation la plus fiable et la moins invasive possible. Ainsi, nous avons mis au point une nouvelle méthode d'identification des grenouilles vertes du complexe *P. esculentus* basée sur une séquence nucléaire, nous permettant de s'affranchir de la méthode de référence allozymique, très invasive. Dans une seconde partie, nous avons testé d'autres marqueurs moléculaires, développés il y a quelques années, les microsatellites, mais jamais utilisés à grande échelle (nombreux individus issus de nombreuses populations différentes). Ces analyses génétiques de tous nos échantillons nous permettent d'observer des phénomènes tels que l'hybridogénèse, la structure des peuplements et par la même occasion de remettre à jour la répartition des grenouilles vertes dans le Nord de la France.

Dans le Chapitre IV, l'hypothèse de l'Heterosis a été testée chez le complexe *P. grafi*, et évaluée les conséquences d'une reproduction unisexuée chez l'une des espèces parentales. Ainsi, lors d'un élevage expérimental, les variations des traits d'histoire de vie de têtards des différents taxa ont été observés, permettant d'évaluer et de comparer les performances larvaires.

Puis, le Chapitre V traite de l'utilisation de l'habitat des grenouilles du complexe *P. esculentus* en fonction de différents paramètres abiotiques, ceci dans le but de définir au mieux les exigences écologiques des 3 taxa. Les variations des peuplements et morphologiques ont été analysées à l'échelle globale et locale, et les variations environnementales susceptibles d'affecter les deux premiers paramètres ont été définies. Cette approche se veut à la fois descriptive, explicative voire prédictive.

Dans le Chapitre VI, l'objectif est de tester les capacités d'acclimatation de têtards hybrides en fonction de leur habitat d'origine, toujours dans le but de mieux définir les exigences et limites écologique des taxa. Ainsi, dans le cadre d'un second élevage expérimental, les normes de réaction de têtards originaires de milieux forestiers ou prairiaux ont été observées face à deux températures choisies pour imiter celles des milieux d'origine. Cette transplantation réciproque en milieu contrôlé nous permet de déterminer la nature, l'amplitude des réponses, et de tenter de comprendre les processus adaptatifs, et donc les modèles GPG-FNV, dirigeant leurs réponses face aux modifications de leur environnement.

Dans le Chapitre VII, je discuterai de l'ensemble des résultats obtenus lors de la thèse et émettrons des perspectives de travail.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

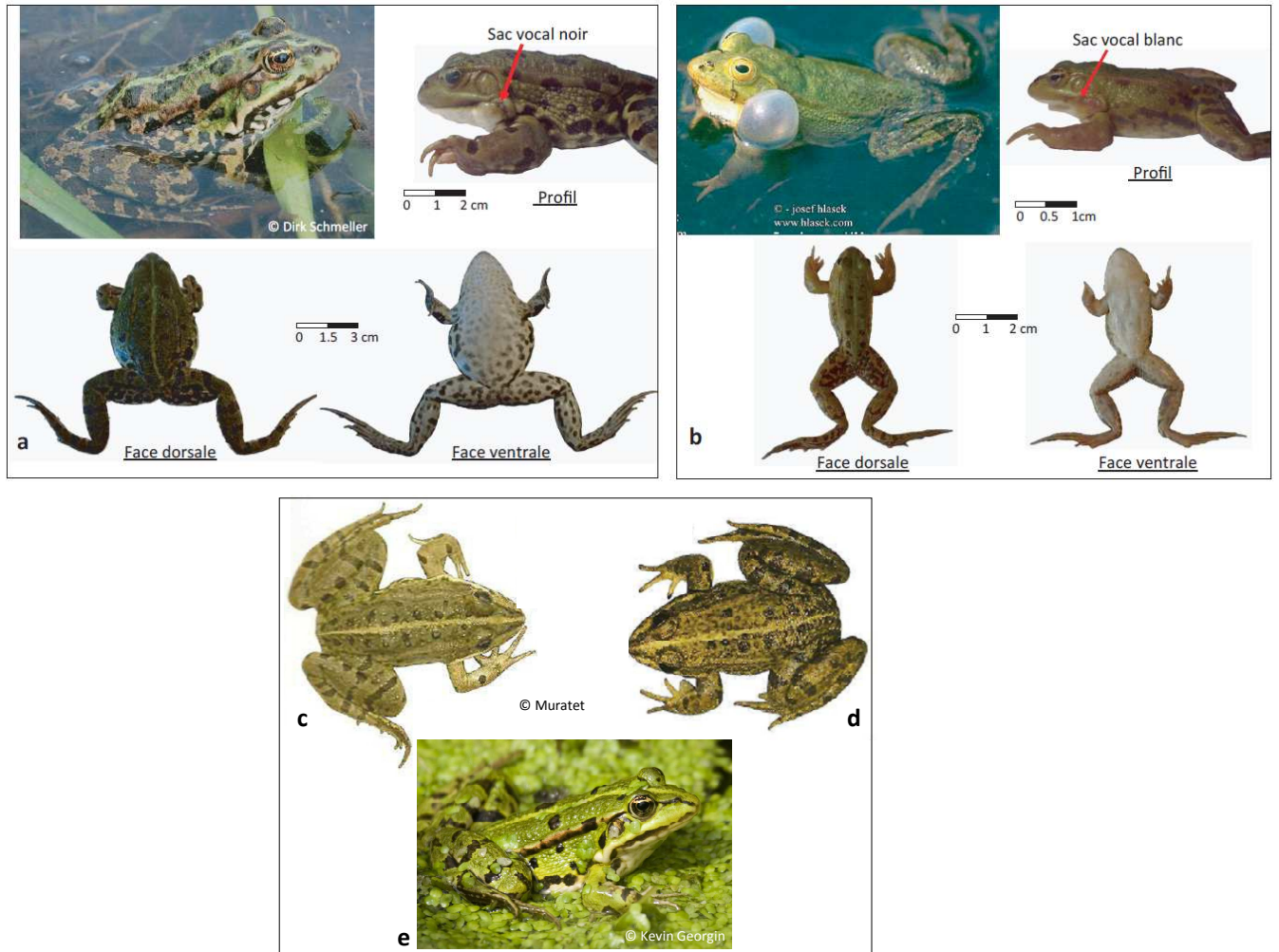


Figure 2.1: Photos des grenouilles vertes des deux complexes hybridogénétiques étudiés. a : grenouilles rieuses ; b : grenouilles de Lessona ; c : grenouille de perez ; d : hybride de graf ; e : grenouille verte.

2.1. Description du modèle biologique

2.1.1. Morphologie

Les Amphibiens du groupe des grenouilles vertes européennes sont caractérisés par un dimorphisme sexuel, les mâles étant plus petits, et possédant 2 sacs vocaux latéraux, ainsi que des callosités portées aux pouces lors de la période de reproduction. Elles possèdent toutes des tympanes bien visibles, et 2 bourrelets dorsaux-latéraux (Muratet, 2008).

D'une longueur de 8 à 15 cm chez l'adulte, la **grenouille rieuse** est l'une des plus grandes du genre *Pelophylax* (Figure 2.1a). Elles sont dotées de pattes longues et puissantes, d'un museau long et arrondi, et d'un tubercule métatarsien aplati de forme ovale ou de trapèze (Duguet, Melki, 2003). La face dorsale est très colorée et assez sombre, et la ventrale est caractérisée par une couleur crème, portant de nombreuses tâches grises voire noires. Les mâles ont des sacs vocaux très sombres, et ont un chant de parade nuptial bruyant, ressemblant à un ricanement (Le Garff, 1998; Muratet, 2008; Nöller, Nöller, 2003).

La **grenouille de Lessona** est bien plus petite, mesurant de 4,5 à 8 cm de long (Figure 2.1b). Ces pattes postérieures sont courtes et peu puissantes, son museau court, pointu et souvent jaune citron, et le tubercule métatarsien est très globuleux (Muratet, 2008). Sa robe est verte claire, parfois même tirant vers le jaune, et sa face ventrale est blanche sans aucune tâche. Les sacs vocaux des mâles Lessona sont très clairs, voire blancs, et ils ont un chant très rapide qui ressemble à un grésillement (Duguet, Melki, 2003; Nöller, Nöller, 2003).

Les **grenouilles de Perez** sont assez petites, 3 à 10 cm de longueur (Figure 2.1c). Aux pattes courtes et peu puissantes, elles possèdent un museau arrondi ou proéminent, et un tubercule métatarsien triangulaire (Duguet, Melki, 2003). De face dorsale verdâtre tirant vers le brun, sa face ventrale est blanchâtre avec des tâches grises ou brunes. Les sacs vocaux des mâles sont sombres, et leur chant ressemble beaucoup à celui de *P. lessonae* (Duguet, Melki, 2003; Le Garff, 1998; Muratet, 2008).

Les **hybrides** *P. kl. esculentus* et *P. kl. grafi* ont des caractéristiques intermédiaires aux espèces parentales (Figure 2.1d et e).

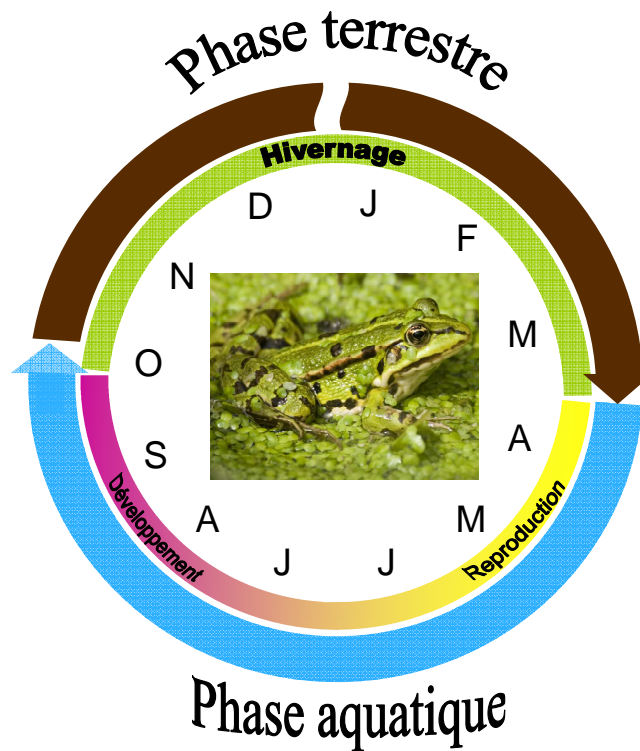


Figure 2.2 : Cycle de vie annuel des grenouilles vertes Européennes. Le cycle extérieur représente l’habitat où se trouvent les individus, tandis que le cycle intérieur représente leur activité au sein de cet habitat. Les lettres au centre représentent les mois de l’année.

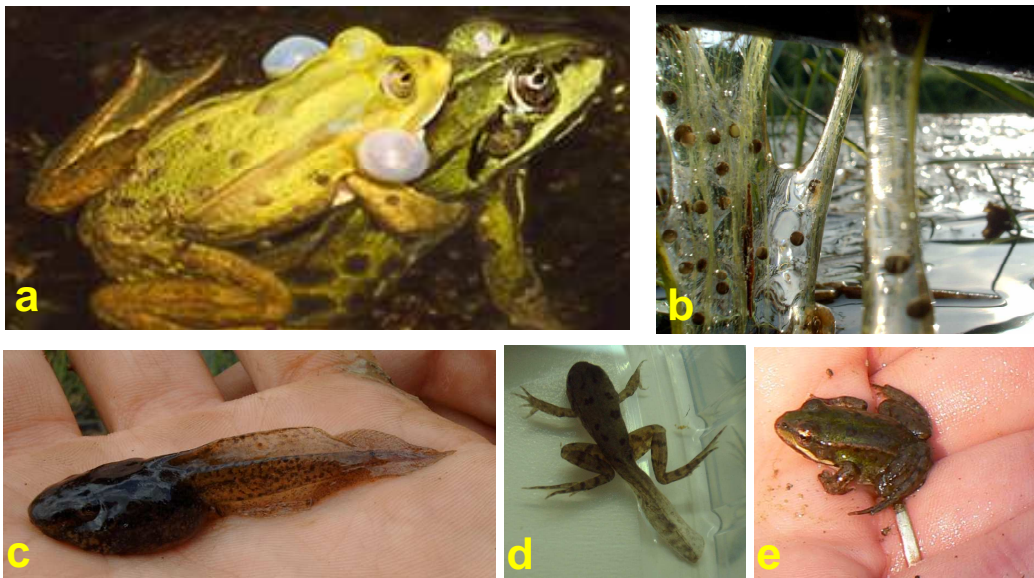


Figure 2.3 : Illustrations de différents stades du cycle de vie. a : mâle et femelle de grenouilles vertes en amplexus ; b : ponte (exceptionnellement hors d’eau) ; c : têtard ; d : têtard en cours de métamorphose ; e : juvénile récemment métamorphosé.

2.1.2. La biologie

Les grenouilles vertes sont parmi les amphibiens les plus aquatiques, et passent la moitié de leur cycle de vie dans l'eau, lors de la phase de reproduction et même après (Figure 2.2). La période de reproduction débute en avril et se termine au plus tard fin juillet. Certaines observations naturalistes ont observé un léger décalage dans le temps entre les différents taxa, les grenouilles de Lessona sortant en premier de l'hibernation, suivies par les hybrides, puis les rieuses (Schmeller, com pers., Patrelle, com pers.). Les adultes se rassemblent en milieu aquatique toujours dans le même site. On parle alors de phylopatricie, ou encore de fidélité au site de reproduction (Holenweg Peter, 2001). Les mâles, très territoriaux, initient alors une parade nuptiale via le chant, afin de séduire les femelles. Lorsque celle-ci est attirée par le « meilleur chanteur », le mâle monte alors sur le dos de la femelle, et l'agrippe au niveau des aisselles. Cette position appelé amplexus axillaire permet une fécondation optimale des ovocytes expulsés par la femelle dans le milieu extérieur (Figure 2.3). Chaque femelle peut pondre de 3 000 à 10 000 ovocytes (Berger, Uzzell, 1980) en forme de masse, fixés aux plantes subaquatiques (Duguet, Melki, 2003; Miaud, Muratet, 2004). A l'intérieur de chaque œuf, se trouve une larve qui va se développer en 4 à 8 semaines jusqu'au stade de métamorphose (Hotz *et al.*, 1999), où il subira une transformation profonde donnant une petite grenouille identique aux adultes. La maturité sexuelle est atteinte entre 1 et 2 ans chez les mâles, et 2 à 3 chez les femelles.

Une migration automnale permet aux grenouilles de rejoindre leurs quartiers d'hivernage terrestres (boisement, jardin, ripisylve, sous des feuillages). Ces derniers peuvent être assez loin du site de reproduction, allant en moyenne de 330 mètres (Holenweg Peter, 2001) et exceptionnellement jusqu'à 15 km (Tunner, 1992), ce qui est une longue distance par rapport aux autres amphibiens, ces derniers étant caractérisés par une faible capacité de migration (Blaustein *et al.*, 1994; Holenweg Peter, 2001). Parfois, l'hivernage a lieu dans l'eau au fond des étangs, mares, bras morts, notamment pour *P. ridibundus*.

2.1.3. Statuts réglementaires de protection

Les grenouilles vertes sont toutes protégées, comme le sont tous les amphibiens sur le territoire français. La Liste rouge des espèces menacées publiée par l'UICN est importante, car bien que n'ayant aucune valeur législative, elle est élaborée par un comité d'experts scientifiques, et sert de référence pour tous les textes réglementaires en France, ainsi qu'en Europe (Figure 2.1). Les grenouilles de Lessona et de Perez sont classées NT (quasi

menacée), les rieuses et grenouilles vertes LC (préoccupation mineure, car peu de risque d'extinction en France), tandis que la grenouille de graf est classée DD (données insuffisantes). D'après la liste rouge des vertébrés de France, seules les 3 espèces parentales sont « à surveiller ». Dans la directive habitat de 1992 la rieuse et les 2 hybrides sont classées en annexe V (Espèces animales et végétales dont l'exploitation doit faire l'objet de mesures de gestion), tandis que la Lessona et la perez en annexe IV (espèces animales et végétales à protéger strictement). Selon la convention de Berne, elles sont toutes classées en annexe III, ce qui signifie que ce sont des espèces dont l'exploitation doit être réglementée en vue de leur protection. Le journal officiel (JO) de la république est le texte le plus récent, classant les taxa des deux complexes hybridogénétiques dans différentes catégories. Les espèces parentales Lessona et Perez sont protégées par l'article 2, le plus restrictif (alinéa I. interdit la destruction ou l'enlèvement des œufs et des nids, la destruction, la mutilation, la capture ou l'enlèvement, la perturbation intentionnelle des animaux dans le milieu naturel ; II. Interdit l'altération ou la dégradation des sites de reproduction et des aires de repos des animaux, la détention ; III. Interdit le transport, la naturalisation, le colportage, la mise en vente, la vente ou l'achat, l'utilisation, commerciale ou non des spécimens). En revanche, les 2 hybrides sont régis par l'article 3 (alinéas I et III), et enfin, la rieuse par l'article 4 (interdits la mutilation, et a III).

Tableau 2.1 : Statuts législatifs et degré de menace des 5 taxa de grenouilles vertes étudiés. En gras, les statuts de protection les plus stricts.

Taxa	Listes et textes législatifs				
	Livre rouge des Vertébrés de France	Convention de Berne	Directive Habitat de 1992	JO de la République de 2007	Liste Rouge de l'IUCN de 2008
<i>P. ridibundus</i> la grenouille rieuse	A surveiller	Annexe III	Annexe V	Article 4	LC
<i>P. lessonae</i> la grenouille de Lessona	A surveiller	Annexe III	Annexe IV	Article 2	NT
<i>P. kl. esculentus</i> la grenouille verte		Annexe III	Annexe V	Article 3	LC
<i>P. perezii</i> la grenouille de Perez	A surveiller	Annexe III	Annexe IV	Article 2	NT
<i>P. kl. grafi</i> la grenouille de Graf		Annexe III	Annexe V	Article 3	DD

2.2. Description des zones d'études

2.2.1. L'Argonne Ardennaise

La zone d'échantillonnage des Ardennes se situe dans le sud du département, où les deux espèces de grenouilles vertes ainsi que l'hybride sont connues pour être présentes. Elle se concentre autour du massif forestier de la Croix-aux-Bois (Figure 2.4), est bordée à l'Est et au Sud par l'Aisne, et représente une surface d'environ 1000 km² (34 km du Nord au Sud, et 32 km d'Est en Ouest).

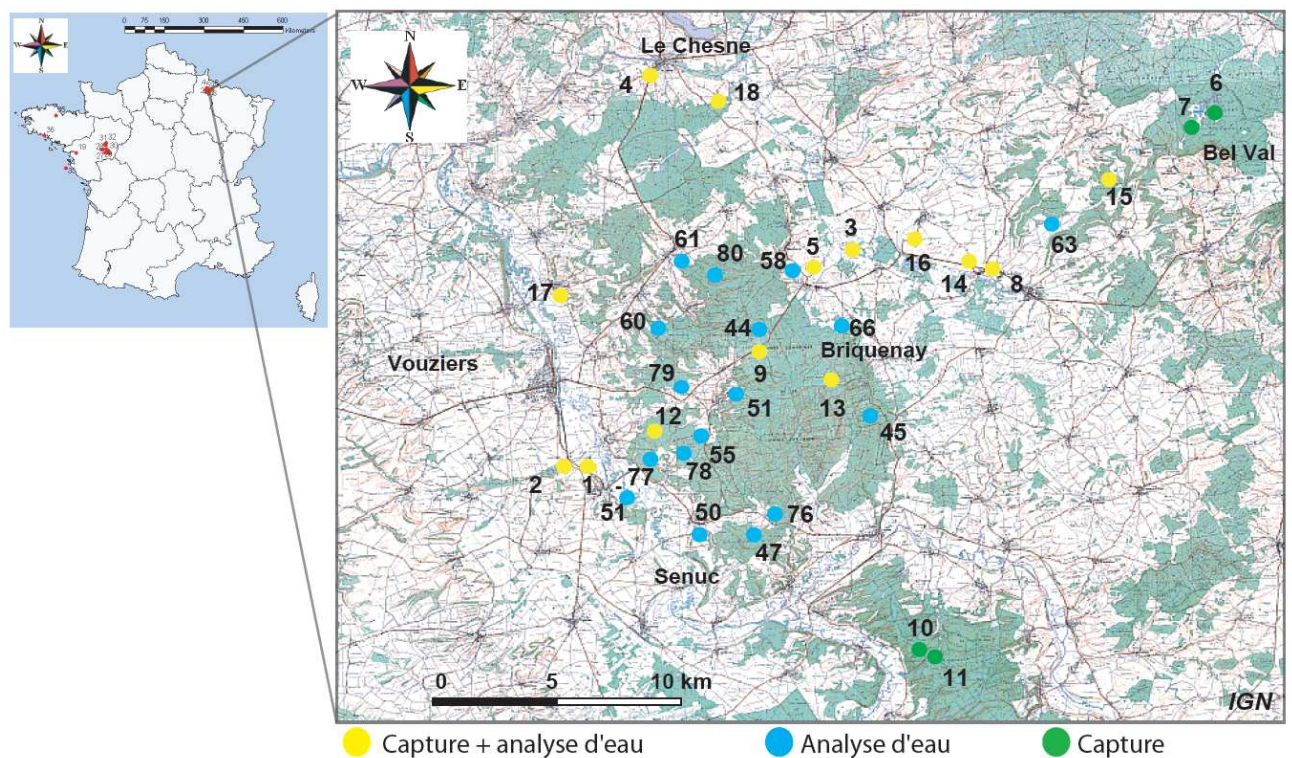


Figure 2.4 : Carte IGN représentant la zone d'étude de l'Argonne Ardennaise.

Le relief est vallonné et l'altitude moyenne est de 250 m (de 100 à 350 m d'altitude). Cette zone est caractérisée par une diversité paysagère assez importante, où l'on retrouve des forêts de pins, de feuillus, mixtes, des prairies pâturées, de fauche, un peu de bocage, des zones cultivées plus ou moins grandes, et une vallée alluviale (celle de l'Aisne). C'est une région rurale, faiblement peuplée (environ 10 habitants au km²), dont la population est répartie en petits villages isolés. L'Argonne est soumise à un climat de type semi continental, caractérisé pas des hivers longs et une forte amplitude thermique diurne l'été.

Tableau 2.1 : Numéro, nom, commune et coordonnées géographiques des sites échantillonnés dans la zone étudiée de l'Argonne Ardennaise. Les codes en jaune sont les sites où il y a eu capture et analyse d'eau, ceux en vert uniquement de la capture, et ceux en bleu uniquement des analyses d'eau.

N°	Code	Nom du site	Commune	X	Y
1	AAa	Bras Mort de l'Aisne a	Savigny-sur-Aisne	774950	2488040
2	AAC	Bras Mort de l'Aisne c	Savigny-sur-Aisne	774665	2487905
3	ABG	Mare entre "Boult-Germont"	Boult-aux-Bois	782880	2495640
4	ABN	Mare de "La Barbonne"	Le Chesne	775390	2503350
5	ABT	Mare de "Boult-aux-Bois" b	Boult-aux-Bois	781221	2495779
6	ABU	Etang Buard Domaine de BelVal	BelVal	796930	2502775
7	AGE	Grand Etang au domaine de BelVal	BelVal	796515	2501943
8	AHa	Etang d'Harricourt a	Harricourt	788525	2495710
9	ALL	Etang de "La Linette"	La Croix-aux-Bois	780468	2493318
10	AO73	Ornière du Bois Communal de Senuc	Senuc	784638	2483143
11	AO74	Ornière du Bois Communal de Senuc	Senuc	784828	2482893
12	AOU	Etang de "L'ouvions"	Falaise	776583	2490238
13	AROC	Mare du Rocan	Briquenay	782140	2491150
14	ASH	Sablière d'Harricourt	Harricourt	788375	2495750
15	ASP	Etang de "St-Pierremont" d	St-Pierremont	789455	2501135
16	ATG	Tourbières de Germont	Germont	785480	2496670
17	AZBZ	Zone Humide de "Bouzine"	Vandy	771665	2495325
18	ATO	Mare de "La Tuile"	Le Chesne	777803	2502853
44	ALP	Etang "les Plaines"	Boult-aux-Bois	780403	2494348
45	ASL	Etang de "Sous Lapion"	Briquenay	784851	2490925
47	ABO	Etang de "Beaurepaire"	Olizy-Primat	779304	2486128
51	APA	Etangs de "Le Paradis"	Olizy-Primat	775808	2487018
55	APV	Etang du "Prés de Vandy"	Longwé	778303	2490198
57	ALY	Etang de "Livry"	La Croix-aux-Bois	778743	2491753
58	ABTa	Mare de "Boult-aux-Bois" b	Boult-aux-Bois	781206	2495876
60	ANA	Etang de "La Noue Adam"	Ballay	775908	2494403
61	ATU	Etang "La Tuilerie"	Toges	776703	2495503
63	AGB a	Etang de "Gueule de Barnould" a	St-Pierremont	787580	2500995
66	AMN	Etang du CERFE	Boult-aux-Bois	781221	2495779
76	ABM	Etang du "Bois du Moulin"	Olizy-Primat	779709	2486495
77	ABR	Etang du "Bois des Roches" (La Zanne)	Falaise	775001	2489011
78	AERa	Etang des "Ermitiaux" a	Longwé	778558	2490243
79	ACHa	Etang de "Chestre" a	Le Chestre (Vouziers)	774323	2492808
80	ALF	Etang de "La Fontaine"	Toges	777388	2494148

Bien qu'ayant un réseau hydrographique peu développé, notre zone d'étude compte quelques zones humides, et est particulièrement riche en mares et plans d'eau. La majorité des ces derniers datent de la fin de la seconde guerre mondiale, époque à laquelle de nombreux propriétaires terriens ont creusé les sols afin d'en extraire des matériaux de construction, ou de constituer des réserves pour abreuver le bétail, ou lutter contre les incendies en zone forestière. Pas moins d'une centaine de « pièces d'eau » (zones humides, mares, étangs et lacs) ont été identifiées lors de notre phase de prospection. Cette zone d'étude est située dans la région agricole de l'Argonne, dont la Surface Agricole Utile (SAU) représente 59,4% du total des terres (31,6% de prairies et 27,8% de terres cultivées), le reste étant recouvert majoritairement par la forêt, qui représente environ 40% du total des terres (données 2003

DDAF 08 ; <http://ddaf.ardennes.agriculture.gouv.fr>). L'activité sylvicole reste essentielle dans cette zone. Les massifs forestiers, notamment celui de la Croix-aux-Bois, sont domaniaux, gérés par l'ONF, et exploités par de nombreux entrepreneurs privés. On y retrouve des sites classés NATURA 2000 et des Sites d'Intérêts Communautaires (SIC), le marais tourbeux de Germont-Buzancy (FR2100287), et les prairies de la vallée de l'Aisne (FR2100298) (<http://natura2000.environnement.gouv.fr>).



Figure 2. 5 : Photos de quelques sites suivis. a) mare forestière 13 AROC, b) étang tourbeux 16 ATG, c) ornière forestière 11 A074, d) zone humide temporaire dans la vallée de l'Aisne 17 AZBZ, e) mare de jardin 5 ABT, f) ancienne sablière 14 ASH, g) mare en prairie pâturée 4 ABN, h) ancien lit de l'Aisne 2 AAc.

D'avril à juillet 2007, un suivi de 34 sites localisés dans notre zone d'étude a été effectué (Tableau 2.1). Il s'agit de pièces d'eau variées, de type mare en prairie pâturée, mares et ornières forestières, étang en tourbière basique encore exploitée, étang de pêche, mare de jardin, zones humides dans la vallée de l'Aisne (Figure 2.5). Parmi ces sites, afin d'étudier le peuplement en grenouilles vertes, nous avons procédé à une campagne d'échantillonnage intensif sur 18 sites. En parallèle, une analyse de paramètres physico-chimiques de 16 nouveaux sites et 14 des 18 sites échantillonnés a été effectuée (Figure 2.4).

2.2.2. L'Anjou

La zone d'étude située dans le Maine-et-Loire est localisée au centre du département, où les taxa de grenouilles vertes *P. lessonae* et *P. kl. esculentus* sont présents (Mourgaud, Pailley, 2005), tandis que *P. ridibundus* n'est que suspectée. Elle se concentre autour d'Angers, aux portes de 3 vallées aux paysages variés, et représente une surface d'environ 14000 km² (Figure 2.6). Contrairement à l'Argonne, l'Anjou comprend très peu de forêts, juste quelques bois épars. La SAU représente 65% des terres totales du département, où les activités principales sont la viticulture, l'horticulture, et l'élevage, le restant étant constitué essentiellement de zones urbanisées (<http://fdsea49.fr>). C'est une région urbaine et dynamique, avec une densité d'environ 107 habitants au km². L'Anjou possède un climat tempéré de type océanique, caractérisé par des hivers doux et des étés frais, avec peu d'amplitude thermique.

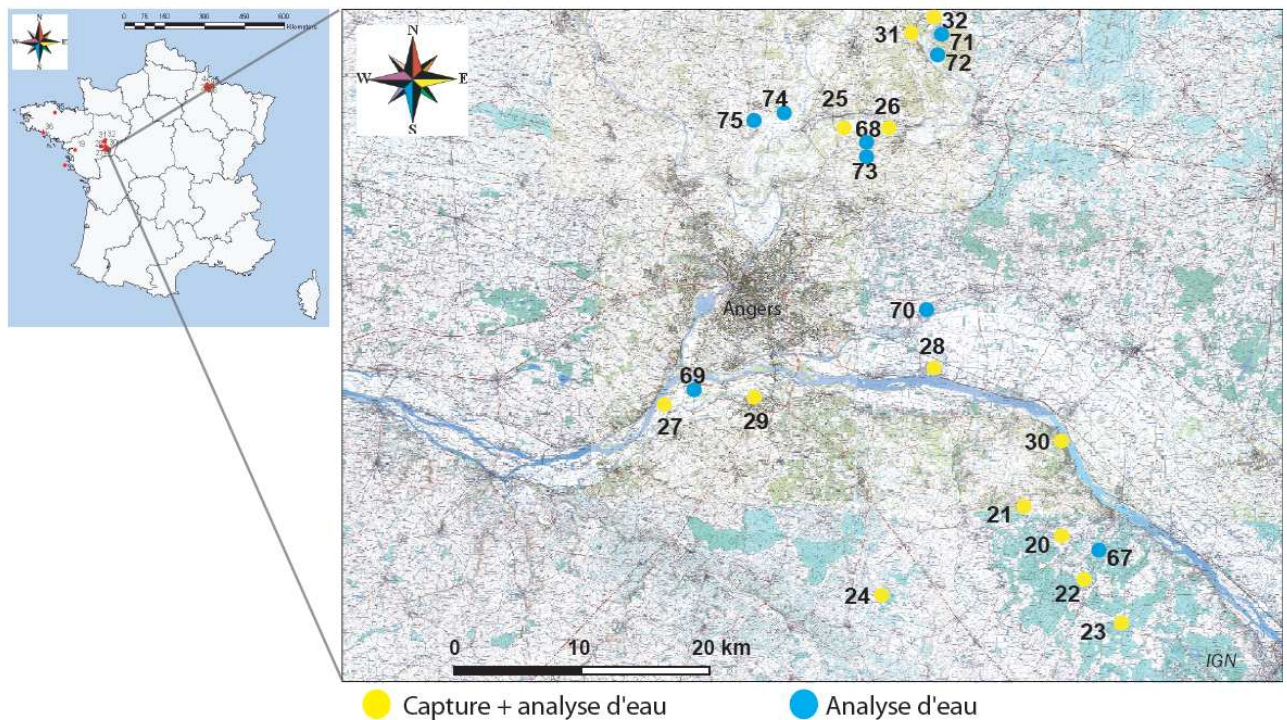


Figure 2.6 : Carte IGN représentant la zone d'étude de l'Anjou

Tableau 2.2 : Numéro, nom, commune et coordonnées géographiques des sites échantillonnés dans la zone étudiée de l'Anjou. Les codes en jaune sont les sites où il y a eu capture et analyse d'eau, et ceux en bleu uniquement des analyses d'eau.

<i>N°</i>	<i>code</i>	<i>Nom du site</i>	<i>Commune</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>
20	MBD1	mare dans le "Bois de Davy"1	Le Thoureil	401839	2267007
21	MBD2	mare dans le "Bois de Davy"2	Le Thoureil	401816	2266914
22	MBMC1	mare dans le "Bois Marchais Creux" 1	Gennes	404522	2259151
23	MBMC2	mare dans le "Bois Marchais Creux" 2	Gennes	404637	2259095
24	MBR	mare dans le "Bois de Roux"	Luigné	391588	2257602
25	MCH	mare à chevaux	Villevêque	389396	2288209
26	MER	zone humide "Ermites"	Villevêque	393177	2287876
27	MJU	mare "les Jubeaux"	Denée	376994	2270534
28	MLC	mare "Courte"	La Bohalle	395163	2272553
29	MME	zone humide de "mMûrs-Erigné"	Mûrs Erigné	381643	2270764
30	MMH	mare du "Bois Menhir"	Le Thoureil	402258	2267265
31	MSE1	étang de Seiches/ Loir 1	Seiches-sur-le-Loir	394326	2294960
32	MSE2	mare de Seiches/ Loir 2	Seiches-sur-le-Loir	395150	2295611
67	MCU	étang de Cunault	Gennes	406294	2261436
68	MCR	mare "Craon"	Villevêque	390194	2288229
69	MCA	mare "Calvaire"	St-Jean-de-La-Croix	378970	2271501
70	MRE	zone humide "Réservoir"	Brain-sur-l'Authion	393361	2274911
71	MSE3	étang de Seiches/ Loir 3	Seiches-sur-le-Loir	394759	2294769
72	MSE4	étang de Seiches/ Loir 4	Seiches-sur-le-Loir	394568	2295603
73	MTH	mare "à Thierry"	Villevêque	390288	2288104
74	MVE	mare "aux vêtements"	Briollay	385085	2289586
75	MMA	mare "marottière"	Briollay	384072	2289962

La zone d'étude est caractérisée par un réseau hydrographique très dense, comptant pas moins de 12 rivières, et est traversée par la Loire, plus long fleuve français (plus de 1 000 km). Ce dernier compte parmi les cours d'eau les moins aménagés d'Europe ce qui permet la présence d'une grande variété de milieux semi-humides profitant à de très nombreuses espèces animales et végétales, remarquables par leur diversité et souvent leur rareté. Les méandres du fleuve et de ses affluents ainsi que les activités humaines créent de nombreux bras morts (appelées aussi boires), des étangs et des mares, dont l'alimentation est assurée par de fréquentes inondations. Ainsi, la portion de la Loire entre Sully-sur-Loire dans le Loiret, et Chalonnes-sur-Loire en Maine-et-Loire a été inscrite au patrimoine mondial de l'UNESCO en 2000 (<http://whc.unesco.org>).

Dans la partie Est de la zone étudiée, la Loire est dirigée par l'aménagement d'une levée initiée sous Henri II Plantagenêt, laissant en contrebas le Val d'Authion. Cette zone a traditionnellement une vocation agricole, grâce à la fertilité des sols et la Loire, avec des cultures de type pommeraie et maraichage.

En aval de ce site, de vastes plaines dessinées dans le calcaire laissent place à une vallée plus étroite où coule de manière permanente un bras de la Loire, le Louet. Cette seconde vallée a

été le lieu dans les années 1970 d'un plan d'aménagement agricole, réorganisant le paysage pour une fonction productrice affirmée. Elle est donc composée de grandes zones de cultures intensives.

Au Nord d'Angers, les eaux du bassin versant Mayenne, Sarthe et Loir convergent pour former la Maine. Cette zone, où l'activité essentielle a été durant longtemps la populiculture, est la première zone française où la réglementation boisement est passée au dessus du droit de propriété, afin de limiter la cette activité pour maintenir une certaine hétérogénéité de la matrice paysagère. Ces vallées appelées Basses Vallées Angevines (BVA), sont particulièrement suivies, car on y retrouve des espèces à forte valeur patrimoniale (rôle des genets, barges à queue noire). Afin de conserver ces espaces naturels et de les inclure dans les politiques environnementales, ce site est classé comme zone humide d'importance internationale (convention RAMSAR), et au niveau européen comme zone Natura 2000 (FR5200630 et FR5210115) (<http://natura2000.environnement.gouv.fr>).

D'avril à juillet 2008, un suivi de 22 sites localisés dans ces 3 vallées autour d'Angers a été effectué (Tableau 2.2). Les pièces d'eau suivies sont de type mare en prairie pâturée, mare forestière, étang ancienne carrière, étang de pêche, mare d'agrément, bras mort (annexe hydraulique connectée en aval à la Loire) (Figure 2.7). Parmi ces sites, 13 ont été inclus dans notre campagne d'échantillonnage de grenouilles vertes, et les autres ont fait l'objet d'une analyse de paramètres physico-chimiques (figure 2.6).



Figure 2. 7 : Photos de quelques sites suivis. a) étang de pêche 67 MCU, b) mare forestière 30 MMH, c) mare en prairie pâturée 68 MCR, d) mare en carrière d'extraction de graviers 32 MSE2, e) zone humide temporaire dans les BVA, 74 MVE, f) boire alluviale dans la vallée du louet, 29 MME, g) mare en prairie de fauche 28 MLC.

2.2.3. Les sites annexes

2.2.3.a. L'île d'Yeu

Un inventaire en grenouilles vertes a été réalisé sur 2 mares (33 et 34) localisée au cœur de l'île d'Yeu (Figure 2.8). Les échantillons ont été collectés par 2 étudiants en stage au sein de notre laboratoire. Cette île vendéenne, à 2h de bateau du continent, est peu urbanisée et est restée relativement naturelle et sauvage.

2.2.3.b. La réserve du Massereau

Une étude du peuplement en grenouilles vertes a été effectuée durant le printemps 2009 dans la réserve du Massereau à la demande de la délégation de Loire Atlantique de l'ONCF. Cette zone humide est localisée dans la commune de Paimboeuf, au niveau de l'estuaire de la Loire (Figure 2.8).

2.2.3.c. L'étang du Loch

Cet étang a fait l'objet d'un inventaire en grenouilles vertes durant le printemps et l'été 2008 et 2009, à la demande de la Fédération des Chasseurs du Morbihan. Ce site, d'une superficie de 80 ha, est localisé dans le Morbihan, près de Lorient, en zone littorale. Il est classé ZNIEFF de type 1, NATURA 2000 (FR5300059), et Réserve Naturelle Régionale (Figure 2.8).

2.2.3.d. Bois d'Avaugour

Une étude du peuplement en grenouilles vertes a été effectuée durant le printemps 2007 dans le Bois d'Avaugour à la demande du bureau d'étude AEPE-GINGKO (Figure 2.8). Ce site est localisé dans la commune de Lanrodec près de Guingamp. Cette forêt, récemment achetée par le Conseil Général des Côtes d'Armor, fut longtemps exploitée pour son bois ainsi que son substrat sableux, comme le témoigne la présence de plusieurs anciennes carrières d'extraction (dont la mare étudiée).



Figure 2. 8 : Orthophotos aériennes des « sites annexes » suivis. a) Ile d'Yeu, b) Réserve du Massereau, c) Etang du Loch, d) Bois d'Avaugour.

2.3. Les campagnes d'échantillonnage

Les campagnes d'échantillonnage ont eu lieu durant la période de reproduction des grenouilles vertes, qui s'étale d'avril à juillet-août (Duguet, Melki, 2003), dans les Ardennes durant l'année 2007 et dans le Maine-et-Loire en 2008. Les individus ont été capturés essentiellement de nuit, durant leur pic d'activité, à la main essentiellement ainsi qu'à l'épuisette. Pour avoir un nombre suffisant d'individus (au moins 30), 1 à 2h de prospection étaient nécessaires selon les sites. La localisation des 18 sites de capture dans les Ardennes et des 13 sites dans le Maine-et-Loire est visible Figures 2.4 et 2.6. Les individus capturés ont été stockés dans des sacs en toile humidifiées par l'eau du site afin qu'ils ne se déshydratent pas et pour éviter les potentielles blessures, ils ont été placés dans un seau fermé (un seau par site), et transporté jusqu'au laboratoire, où ils passaient la nuit (Figure 2.9).

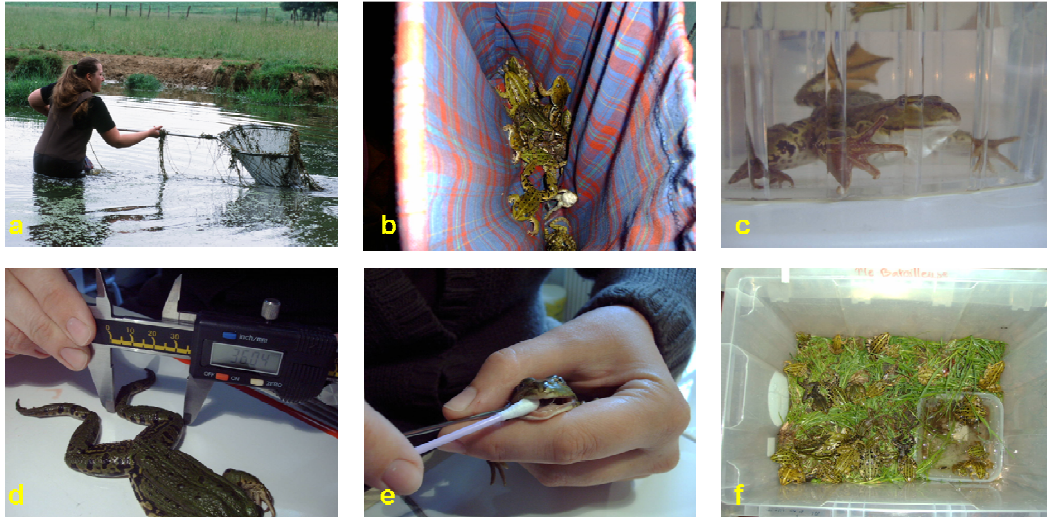


Figure 2.9 : Photos des différentes phases de captures et d'observations. a) capture de grenouilles de jour, b) sac de transport des individus capturés, c) anesthésie transcutanée, d) mesures morphométriques, e) prélèvement de cellules buccales, f) bac de réveil.

Le lendemain de leur capture, chaque individu a été anesthésié à l'aide de MS222 (m-aminobenzoic acid ethyl ester methansulfonate) à une concentration de 1g/L (Cakir, Strauch, 2005). Cette solution passe dans le corps de l'animal en transcutanée, et est efficace durant environ 1h30, nous laissant le temps de procéder aux étapes suivantes tout en veillant le plus possible au bien être de l'animal (Berger *et al.*, 1994). Une fois anesthésié, 3 prélèvements ont été effectués sur chaque individu. Les 2 phalanges distales (P2 et P3) du doigt 4 du membre postérieur droit furent prélevées puis « déshabillées » en séparant les muscles et la peau de l'os. Ce dernier a été placé dans un tube eppendorf à température ambiante contenant de l'éthanol à une concentration de 70%, afin de déterminer ultérieurement l'âge des individus par squelettechronologie (Miaud, 1992; Yilmaz *et al.*, 2005), tandis que les parties charnues ont été placées dans un tube contenant de l'eau distillée et stockées au congélateur à -20°C dans le but d'effectuer d'éventuelles analyses allozymiques (Hotz, 1983; Uzzell, Berger, 1975). Dans un 3ème temps, un prélèvement buccal a été effectué à l'aide d'un coton-tige (Pidancier *et al.*, 2003) (Figure 2.9). Le coton a été placé dans un tube eppendorf contenant de l'éthanol à 70% et conservé à température ambiante (Poschadel, Möller, 2004), afin de procéder aux analyses moléculaires ultérieurement (Broquet *et al.*, 2007; Goldberg *et al.*, 2003; Miller, 2006).

Ensuite, une phase d'observation a été réalisée, afin de sexer l'individu, noter dans le cas d'une femelle son état de gravidité (gravide ou non), observer certains critères pouvant aider à une identification morphologique, et la prendre en photo (face ventre, dorsale, et latérale). Enfin, des mesures morphométriques ont été effectuées (Figure 2.9), incluant une

pesée de chaque individu (balance de précision de 0,01g), la mesure à l'aide d'un pied à coulisse de la longueur du museau jusqu'au cloaque (Snoot vent length : SVL), la longueur du tibia, et la longueur du tubercule métatarsien. Chaque mesure a été relevée 2 fois, afin d'éviter les risques d'erreurs. Les individus mesurant moins de 40 mm en SVL ont été considéré comme des juvéniles (Holenweg Peter *et al.*, 2001).

Après toutes ces étapes, chaque grenouille a été placée dans un bac de réveil (32 cm x 32 cm x 55 cm), au fond tapissé de mousse humide, et contenant un bac d'eau dans lequel les grenouilles éveillées pouvaient s'immerger (Figure 2.9). Ces dernières ont été relâchées dans leur site d'origine, sur le lieu exact de capture, le soir suivant, soit un peu plus de 24h après leur réveil. L'anesthésiant étant normalement totalement éliminé de leur organisme en 8h vue la dose utilisée (Cakir, Strauch, 2005), ce délai nous assure un bon état de l'animal au moment de son retour dans le milieu naturel.

Pour les échantillons venant des sites annexes, la procédure a été légèrement différente. Suite à leur capture, seul un prélèvement de cellules buccales a été effectué, sur place, nous permettant de relâcher les individus quelques minutes après leur capture. Aucune ablation de phalanges ni aucune données morphométriques n'ont été collectées.

2.4. Caractérisation de l'habitat

2.4.1. Habitat et étude paysagère

Chaque site où ont été échantillonnées des grenouilles vertes a fait l'objet d'une analyse, afin de mieux définir et mieux comprendre les exigences écologiques de chaque taxon. Pour se faire, une fiche « Habitat et Paysage » a été élaborée, spécifique au cas des grenouilles vertes, en se basant sur d'autres fiches pré existantes (fiche du Pôle Relais « Mares et Mouillères », « Fiche régionale d'inventaire des mares » diffusée en 2007 par le Conservatoire Fédératif des Espaces Naturels de Basse-Normandie), et modifiée en prenant en compte des études scientifiques (Ficetola, De Bernardi, 2004; Oertli *et al.*, 2005; Scribner *et al.*, 2001), afin de standardiser la prise de données (**Annexe 1**). Cette fiche renseigne diverses rubriques telles que 1) les caractéristiques hydrologiques du site, tel que sa temporalité, le nombre de connexions, ceci afin d'estimer les corridors éventuels ; 2) le type de site (déterminé selon le code Corine Land Cover), son exposition au soleil et la nature du substrat ; 3) l'état du site, avec une caractérisation des berges, et la végétalisation du site ceci

afin de savoir s'il s'agissait d'une mare en voie de fermeture ou d'un site stable. L'entretien du site qui peut être d'origine anthropique (curage, fauchage des berges) ou d'origine animale (pâturage) a été noté. L'utilisation passée et actuelle de la mare, déterminée grâce à une enquête auprès des propriétaires, ainsi que l'accessibilité au site nous permettait aussi de distinguer les mares d'intérêt socio-économique. Enfin, la dernière partie de l'analyse paysagère est centré sur le milieu environnant du site dans un rayon de 50m et 250m (périmètre visible à l'œil nu), afin notamment de mieux définir la matrice paysagère. Les renseignements à indiquer sont le nombre d'habitations, de voie ferrée, de routes et l'occupation du sol par exemple.

2.4.2. Les paramètre physico-chimiques

Les paramètres abiotiques et plus particulièrement physico-chimiques jouent un rôle non négligeable dans la répartition, la croissance et l'évolution des populations tant animales que végétales (Dajoz, 2006).

Nous avons réalisé un suivi de quelques paramètres sur la plupart des sites où ont été prélevées nos grenouilles vertes, plus quelques sites additionnels, afin de caractériser les sites de reproduction des grenouilles vertes, et d'évaluer indirectement les menaces potentielles portant sur ces sites.

Deux plannings de prélèvements ont été réalisés :

1. Dans un premier temps, une campagne de terrain a été réalisée une fois par mois durant 3 mois consécutifs dans les Ardennes, et durant 2 mois dans le Maine-et-Loire. L'objectif de cette campagne fut de prélever en un minimum de temps (2h) de l'eau dans chaque site suivi, en changeant tous les mois l'ordre de prélèvement, afin de comparer les données entre les sites. Ainsi, 3 équipes se sont partagés la campagne, réalisée entre 7h et 9h du matin, moment où les paramètres sont encore relativement stables (Oertli *et al.*, 2005). Pour chaque site, 1,5 litre d'eau a été prélevé dans une bouteille à l'aide d'une perche de 1,5 mètre (la moitié avec de l'eau de surface, l'autre à plus de 50 cm de profondeur), l'eau remplissant totalement la bouteille. Celle-ci a été placée dans une glacière le temps de la mission, puis stockée au réfrigérateur à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'aux analyses, ceci afin d'éviter l'altération des éléments à mesurer. En même temps que le prélèvement d'eau, la température a été mesurée sur place, et l'heure du prélèvement a été notée. Une fois de retour au laboratoire, 7 variables ont été mesurées avec un photomètre (Palintest 7500): Nitrates, Nitrites, Turbidité, Phosphates, dureté totale, dureté calcique et couleur. De plus, la concentration en ions H⁺

(pH) et la conductivité (Careaga fuentes U. ,2001) qui indique la capacité des ions à transmettre le courant ont été mesurées par un conductimètre (Hanna combo HI 98129 – HI 98130, $SD_{pH}=0,01$, et $SD_{conduct.}= 1 \mu S$) (Figure 2.10). Le taux d'oxygène dissous dans l'eau a été mesuré à l'aide d'un oxymètre (Ponsel, $SD=0,1 \text{ mg/L}$). Enfin, l'alcalinité ou titre alcalimétrique (TA) qui donne la teneur en alcalins libres (OH^-) et en carbonates et le titre alcalimétrique complet (TAC) qui mesure la somme des alcalins libres, des carbonates et des bicarbonates ont été obtenus par une méthode de titration (dosages).

2. Une étude de la variation circadienne de ces 5 paramètres a été réalisée, uniquement dans les Ardennes, en juin et juillet : des mesures ont été prises entre 12 et 14h, et enfin entre 19h30 et 21h30. Ces données viennent compléter celles relevées le matin une fois par mois, et nous permettent d'observer les variations de ces paramètres au cours d'une journée.

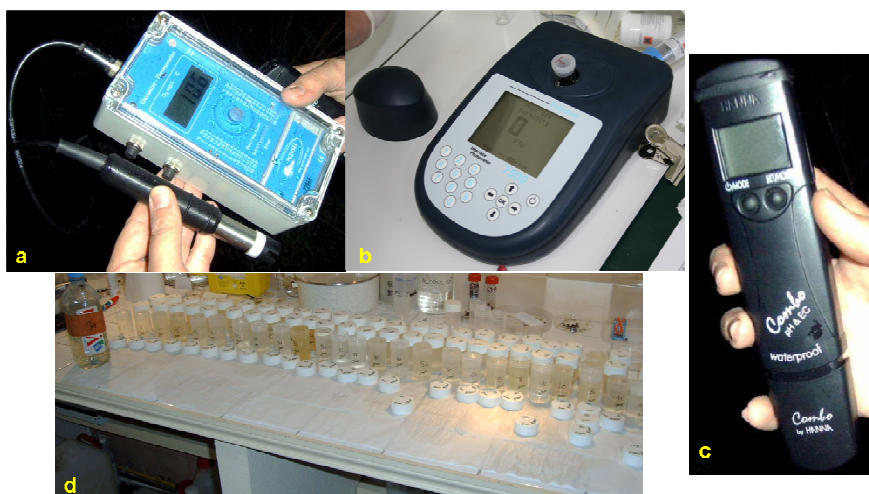


Figure 2.10 : Photos du protocole d'analyse de l'eau. a) oxymètre, b) spectrophotomètre Palintest 7500, c) conductimètre et pHmètre Hanna combo, d) échantillons d'eau en cours d'analyse.

Chapitre 3

Identification taxonomique à l'aide d'outils moléculaires

Introduction

La diminution de la biodiversité est devenue une préoccupation à l'échelle mondiale depuis les années 1990 (Beebee *et al.*, 2005; Blaustein *et al.*, 1994). Dans ce contexte de déclin, touchant particulièrement les amphibiens, la communauté scientifique tente de comprendre les causes de ce phénomène inquiétant (Araujo *et al.*, 2006; Carey *et al.*, 2001; Collins, Storfer, 2003; Cushman, 2006; Ficetola, De Bernardi, 2004; Gallant *et al.*, 2007; Houlahan *et al.*, 2000; Pasmans *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2004; Swihart *et al.*, 2003). Afin d'étudier et d'évaluer l'ampleur de ce déclin, la première étape est l'identification de toute la biodiversité existant actuellement. Connaitre la richesse spécifique totale, avec une classification précise et correcte des espèces, ainsi que les espèces cryptiques est donc essentielle (Bickford *et al.*, 2007). La biologie moléculaire peut s'avérer être un outil important dans ce contexte, permettant de mettre à jour de nouvelles espèces dites cryptiques, car confondues auparavant avec d'autres espèces du fait de leurs morphologies non distinguables. Les espèces cryptiques sont souvent présentes au sein de complexes d'hybridations, ce qui est cas notamment chez les grenouilles vertes européennes (Graf, Polls Pelaz, 1989).

Le complexe hybridogénétique le plus répandu implique les espèces parentales *Pelophylax lessonae* Camerano 1882 (la grenouille de lessona de génotype LL), *P. ridibundus* Pallas 1771 (la grenouille rieuse de génotype RR), et leur hybride hémiclinal *P. klepton esculentus* Linnaeus 1758 (de génotype RL) (Graf and Polls-Pelaz 1989). Présent tout d'abord dans le Centre et l'Est de l'Europe, ce complexe a étendue son aire de répartition jusqu'au Nord-Ouest de la France. Cet hybride naturel a un mode de reproduction particulier appelé « hybridogénèse », ne produisant que des gamètes contenant le génome rieuse. Il coexiste avec l'espèce parentale *P. lessonae* de laquelle dépend le maintien de sa lignée hybride (Uzzell, Berger, 1975). L'hybride *P. kl. esculentus* est très abondant, et bénéficie de l'effet d'hétérosis qui se caractérise par sa grande vigueur et sa grande valence écologique, qui sont supérieures à celles des espèces parentales (Hotz *et al.*, 1999).

L'identification taxonomique de ces 3 taxa s'avère importante pour au moins deux raisons :

- d'une part en terme de gestion conservatoire, notamment en France, car ils n'ont pas le même statut de protection législatif (Ministère de l'Ecologie, du Développement et de

l'Aménagement durables, 2007), la grenouille de lessona étant plus protégée car plus menacée que les 2 autres (Vié *et al.*, 2009),

- d'autre part pour la recherche, nombre de protocoles d'études nécessitent une affiliation taxonomique fiable, rapide et la moins invasive possible.

Jusque dans les années 1980, l'identification taxonomique était basée sur deux méthodes, des mesures morphométriques très sophistiquées (Berger, 1966; Crochet *et al.*, 1995), ainsi que sur le chant (Roesli Marzia, 2000; Wycherley *et al.*, 2002). Plusieurs études ont montré que la méthode morphométrique n'était pas assez robuste (Lodé, Pagano, 2000; Pagano, Joly, 1999; Plötner *et al.*, 2001), du fait notamment de leur capacité à s'hybrider, et de leur grande ressemblance. L'identification par le chant a aussi de sérieuses limites, car seuls les mâles adultes chantent, et de plus, de nombreuses variations tant au niveau local que régional ont été observées (Plötner *et al.*, 2001; Wycherley *et al.*, 2002). Les hybridations fréquentes entre les espèces parentales très similaires rendent la situation plus complexe encore, car les hybrides ont des caractéristiques morphologiques et vocales intermédiaires aux espèces parentales. Contrairement aux grenouilles vertes d'Anatolie et du centre de l'Asie, les espèces centrale *P. lessonae*, *P. ridibundus*, et leur hybride associé possèdent des caractères morphologiques et bioacoustiques bien spécifiques permettant de les distinguer (Günther, 1990; Plötner, 2005). Toutefois, dans l'Ouest de l'Europe, ces méthodes d'identification sont inefficaces, du notamment aux hybridations importantes entre grenouilles autochtones et allochtones (Holsbeek *et al.*, 2008; Mezhzherin, Morozov-Leonov, 1997; Pagano *et al.*, 2003; Plötner *et al.*, 2008; Schmeller *et al.*, 2007; Vorburger, Reyer, 2003), conduisant à toutes une mosaïque de caractères. En effet, depuis la dernière décennie, de nombreuses *P. ridibundus* en provenance du bassin Méditerranéen ont été régulièrement introduites par l'Homme en Europe (Neveu, 2004; Neveu, 2009), rendant ces deux méthodes d'identification inefficaces, car inadaptées. De plus, l'expression des différents caractères varie souvent avec l'âge des individus, les formes spécifiques étant moins marquées chez les juvéniles que les adultes.

Du fait de tous ces biais, seul les analyses génétiques permettent une affiliation suffisamment fiable (Gutmann *et al.*, 1994; Hotz, 1983). Depuis les années 1980, les taxa du groupe des grenouilles vertes sont identifiés grâce à des allozymes, spécifiques de chaque taxon (Hotz, 1983; Uzzell, Berger, 1975; Uzzell, Hotz, 1979). Les plus couramment utilisées sont la LDH-B (lactate déshydrogénase ; E.C.1.1.1.27), l' α -GDH (glucose déshydrogénase ; E.C.1.1.1.8), la MPI (mannose-6-phosphate isomérase ; E.C.5.3.1.8), la PGM-2 (phosphoglucomutase ; E.C.5.4.2.2), la GCDH (glucose déshydrogénase), la GAPDH

(glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase ; E.C.1.2.1.12), la 6PGDH (6 phosphoglycérate déshydrogénase), et l'ADH (Alcool Déshydrogénase ; E.C.1.1.1.1). Néanmoins, cette méthode d'affiliation est très invasive, car elle requière un fragment de tissu (peau, muscle ou foie), nécessitant au mieux l'ablation d'un doigt, voir même le sacrifice de l'individu. Les scientifiques tentent donc de mettre au point de nouvelles méthodes d'identification moléculaires à une échelle très fine, utilisant de l'ADN issu de simples prélèvements salivaires (Pidancier *et al.*, 2003). Plusieurs marqueurs moléculaires ont ainsi été développés depuis quelques années, d'origine mitochondriale, avec les séquences ND2, ND3 (Plötner *et al.*, 2008), ou nucléaire, essentiellement des microsatellites (Garner *et al.*, 2000; Holsbeek *et al.*, 2009a; Holsbeek *et al.*, 2008; Zeisset, Beebee, 2000), mais aussi RanaCR1 et SAI-1 (Plötner *et al.*, 2009).

Ce chapitre dédié à la génétique des grenouilles vertes présente le résultat de l'identification des échantillons collectés dans différentes régions de France basée sur des méthodes de biologie moléculaire. Dans une première partie, je présenterai la nouvelle méthode d'affiliation du complexe Nord des grenouilles vertes Européennes, utilisant le principe de la méthode RFLP sur la séquence ITS2, en détaillant la phase de mise au point, puis les résultats de l'analyse des échantillons collectés durant la thèse. Puis, dans une seconde partie, les microsatellites seront utilisés afin de réaliser une identification spécifique, mais aussi et surtout afin de voir si ces marqueurs nous permettent une analyse plus fine, en mettant en évidence l'existence de différentes lignées hybrides potentielles au sein des *P. kl. esculentus*.

3.1. Identification des grenouilles vertes du complexe *P. esculentus* grâce à la méthode PCR-RFLP sur la région ITS2

Ce travail a donné lieu à publication dans Molecular Ecology Resources (Patrelle et al., in press) en Annexe 2.

Travaillant à l'échelle spécifique, l'objectif est d'élaborer une méthode d'identification des différents groupes (espèces et hybrides) de grenouilles vertes rapide, efficace, peu onéreuse, et surtout moins invasive que la méthode de référence utilisant les allozymes. Un certain nombre de marqueurs moléculaires ont été mis en évidence, mais ils ne répondent pas

à ces critères. Afin d'identifier les deux espèces de grenouilles du Nord de l'Europe, mais aussi et surtout les hybrides, l'utilisation d'une séquences d'ADN nucléaire est indispensable. Ainsi, l'objectif de ce chapitre est de mettre au point une nouvelle méthode d'identification des grenouilles vertes du complexe *P. esculentus* avec la séquence nucléaire ITS2 en utilisant la technique de PCR-RFLP. Cette méthode sera testée à partir d'échantillons de muscles, comme l'ancienne méthode de référence, ainsi qu'à partir d'échantillon de salive, afin de vérifier si ce mode de prélèvement, moins invasif, peut se substituer à une amputation.

3.1.1. Mise au point d'une nouvelle technique d'identification

3.1.1.1. Introduction

L'ADN ribosomal, localisé dans le noyau, est une bonne source d'informations car les régions fonctionnelles produisant les ribosomes sont hautement conservées, tandis que les espaceurs transcrits ou non ont une variabilité inter et intra-spécifique élevée (Gottschling *et al.*, 2005a; Gottschling *et al.*, 2005b; Li, Wilkerson, 2007; Schon *et al.*, 2003). Ces derniers sont intéressants pour des études de phylogénie afin d'expliquer les relations entre espèces ayant récemment divergé, ainsi que pour l'identification d'espèces morphologiquement similaires (Joseph *et al.*, 1999; Nikoloudakis *et al.*, 2008), notamment dans le cas de complexes d'hybridations (Malécot *et al.*, 2009). Parmi eux, ITS2 est la sous-unité n°2 d'un espaceur interne transcrit (Internal transcribed spacers subunit), présent en de nombreuses copies dans l'ADN, et porté par plusieurs chromosomes (autosomaux et sexuels). Malgré le fait qu'ITS2 montre des variations de longueur de séquences importantes parmi les vertébrés, sa taille reste relativement homogène au sein de chaque grand groupe d'espèces (Joseph *et al.*, 1999). De plus, l'une des caractéristiques les plus remarquables est que ces paralogues sont assez homogènes au sein de l'individu, ce qui est du à l'évolution concertée (Encart 3.1) (Joseph *et al.*, 1999; Nikoloudakis *et al.*, 2008). Cette région de l'ADN a donc été utilisée afin d'identifier les différentes espèces de grenouilles vertes présentes dans l'Ouest de l'Europe. Pour cela, la méthode d'analyse utilisant le polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) a été testée. Cette technique repose sur l'utilisation d'enzymes de restrictions qui reconnaissent systématiquement des zones nucléotidiques spécifiques de l'ADN, appelées « sites de restrictions », et les coupent, permettant de mettre en évidence certaines variations au sein des séquences d'ADN. L'ADN ainsi digéré est soumis ensuite à une électrophorèse sur gel d'agarose permettant de séparer les fragments d'ADN de taille

différente. Cette méthode est très souvent employée, car elle est simple, rapide, efficace, et peu coûteuse (Tagu, 2003).

Encart n°3.1 : L'évolution concertée

Il s'agit d'un processus qui homogénéise les gènes multi-copies, tel qu'ITS2, entraînant au fil du temps une très faible variation au sein des individus (Nikoloudakis *et al.*, 2008). L'évolution concertée est due à une conversion génique faisant intervenir une recombinaison afin de remplacer une séquence par une autre. Par exemple, si deux copies d'ITS2, présent en millier d'exemplaires dans l'ADN, ont divergé, on retrouvera deux séquences identiques après l'intervention de l'évolution concertée (Harry, 2008). On retrouve parfois un polymorphisme intra-individuel lorsque l'évolution concertée est incomplète, ou ne peut intervenir entre paralogues portés par des chromosomes non-homologues, ou dans des cas d'hybridation (Muir *et al.*, 2001). La phase où ce mécanisme intervient est assez mal connue, seules quelques études l'ont observé au courant de la méiose.

3.1.1.2. Matériels et méthodes

3.1.1.2.a. Séquençage de ITS2

Des échantillons de muscles ont été prélevés sur 89 grenouilles vertes collectés par l'équipe de Plötner, venant de 28 localités situées en Europe ainsi que dans le bassin méditerranéen, afin d'étudier le polymorphisme des séquences ITS2. Les échantillons de muscles étant stockés dans de l'éthanol pour préserver au mieux l'ADN, trois étapes de rinçage à l'eau distillé durant 48h ont été réalisés avant l'extraction de l'ADN génomique, effectué en utilisant les kits « QIAmp blood and tissue » (Qiagen GmbH). Une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est ensuite effectuée afin d'amplifier le segment ITS2 souhaité, à l'aide d'un couple d'amorces ITS2-Hin (5-GGATCACTCGGCTCGTGCGTCGATGAAG-3) et ITS2-Rück (5-CGGGGATTTCGGCGCTGGGCTCTTCCC) (Plötner, Ohst, 2001) dans un thermocycleur iCycler® gradient (BIO RAD). Cette réaction est réalisée dans un volume total de 37 µl contenant 0.27 µM de chaque amorce, 0.27 mM de chaque dNTP, 1.35 mM de MgCl₂, 7 µl de Q-Solution, et 2 unités de *Taq* DNA polymerase (Promega).

Le protocole PCR est le suivant : une dénaturation initiale à 96°C durant 3 minutes, suivie de 40 cycles constitués d'une phase de dénaturation à 96 °C durant 30 s, d'une phase d'hybridation à 64 °C durant 20 s, et d'une phase d'extension à 72 °C durant 50 s, pour

terminer par une élongation finale à 72°C durant 5 minutes. Les fragments ITS2 sont ensuite isolés des autres séquences parasites en soumettant le produit de PCR à une électrophorèse sur gel d'agarose au bromure d'éthidium à 1,4%, suivi d'une purification des bandes souhaitées grâce au kit de purification de produit de PCR QIAquick (Qiagen). L'étape de séquençage a été effectuée en utilisant le kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems). Les produits de PCR sont ensuite séparés dans un séquenceur ABI Prism 377 (Applied Biosystems), en utilisant un marqueur de taille genescan 500-LIZ size standard avant d'être analysés.

3.1.1.2.b Analyse des séquences ITS2

Les séquences nucléotidiques ITS2 obtenues lors de la première étape ont été alignées à l'aide du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 afin d'observer leur polymorphisme inter et intra spécifique. Cette étape s'effectue à l'œil pour faire correspondre un maximum de nucléotides d'une séquence à l'autre. Ces séquences ont été utilisées afin de construire un arbre phylogénétique le plus parcimonieux. Les paramètres du modèle pour les recherches de probabilité ont été estimées à l'aide Modeltest V.3.7 (Posada, Crandall, 1998), qui compare la véracité de l'ajustement des modèles en utilisant des tests du rapport de vraisemblance. Des arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant des paramètres du modèle choisis. L'analyse du maximum de vraisemblance a été réalisée en utilisant le programme PHYML (Guindon, Gascuel, 2003). La robustesse de l'arbre a été évaluée par analyse de bootstrap (Felsenstein, 1985), en réalisant 1000 itérations. Ensuite, le polymorphisme inter-spécifique a été mis en évidence grâce à la méthode RFLP (polymorphisme de longueur de fragment de restriction) en utilisant le logiciel CLC Combined Workbench version 2.2.4., permettant de tester « virtuellement » différentes enzymes de restriction. L'objectif est donc de sélectionner des enzymes ne coupant spécifiquement que les séquences portées par les individus du groupe *ridibundus*, et d'autres que les séquences spécifiques de *P. lessonae*, quelque soit le polymorphisme intra-spécifique, suivant des critères tels que leur efficacité, leur coût, leur disponibilité, et leur stabilité.

3.1.1.2.c. Méthode RFLP sur ITS2

Cette nouvelle méthode d'affiliation génétique des grenouilles vertes Européennes a été comparée à la méthode d'identification taxonomique selon les marqueurs allozymiques. Ainsi, 93 nouveaux individus ont été collectés en France, et préalablement identifiés grâce à

4 marqueurs allozymiques (LDH-B lactate déshydrogénase, E.C.1.1.1.27; α -GDH glucose déshydrogénase, E.C.1.1.1.8; MPI mannose-6-phosphate isomérase, E.C.5.3.1.8; and PGM-2 phosphoglucomutase, E.C.5.4.2.2). Il s'agit de 26 *P. lessonae*, 36 *P. ridibundus*, and 31 *P. esculentus* (Pagano *et al.*, 2001a). Des échantillons de muscles ainsi que de salive ont été conservés dans de l'éthanol 70%, et l'ADN fut extrait en utilisant la méthode de résine échangeuse d'ions Chelex 5% (Walsh *et al.*, 1991). Une petite portion de la séquence ITS2 a été amplifiée grâce à une PCR, à l'aide d'un nouveau couple d'amorces que nous avons dessiné, ITS2-WFL (5'-TTCGTCCCCCGAAGGCCAGA-3') et ITS2-WFR (5'-CTTAAATTCAGCCCCTCGCC-3'). La PCR a été réalisée dans un volume total de 10 μ l, contenant 0.24 μ M de chaque amorce, 0.25 mM de chaque dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 0.8 μ M de DMSO, et 0.4 unité *Taq* DNA polymerase (Promega). Le protocole PCR est le même que celui décrit pour l'étape de séquençage. Le produit issu de la PCR est ensuite soumis à une étape de digestion par les enzymes de restriction sélectionnées lors de l'analyse du polymorphisme. Cette étape de restriction enzymatique se fait à 37°C durant 6 heures pour chaque enzyme, dans un volume total de 12 μ l, avec 2 μ l de produit de PCR ITS2, 3.6 unités d'enzyme, 1mM de tampon (10mM Tris-HCl à pH 7.4, 200mM de KCl, 0.1mM d'EDTA, 1mM de DTT, 0.5mg/ml de BSA, 50% de glycerol), and 0.1 mM de BSA. Le polymorphisme de taille des fragments d'ITS2 digérés est ensuite observé grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose au bromure d'éthidium à concentration 3%, et les bandes sont visualisées sous UV.

3.1.1.3. Résultats et Discussions

3.1.1.2.a. Séquençage de ITS2

Parmi tous les individus séquencés, 29 sont du « groupe *P. lessonae-bergeri* », comprenant les *P. lessonae* et les *P. bergeri* (Italie) et 60 font partie du « groupe *P. ridibundus* » (*ridibundus*-like water frog species) (Ohst, 2008), comprenant les *P. ridibundus*, mais aussi des espèces très proches morphologiquement et allochtones, les *P. kurtmuelleri* (Balkans), *P. bedriagae* (Le Levant), et les grenouilles vertes d'Anatolie (*P. cf. bedriagae*). A l'issue de l'analyse du polymorphisme intra-groupes, 6 séquences différentes ont été observées parmi le groupe *P. lessonae-bergeri* séquencé, et 14 séquences différentes parmi le groupe *ridibundus* analysé (Tableau 3.1) dont la répartition géographique a été cartographiée (Fig. 3.1). Ainsi, on remarque que certaines séquences ITS2 ont une localisation spécifique, comme par exemple la séquence « R11 » qu'on ne trouve qu'en Turquie, tandis que d'autres

semblent assez communes, comme la séquence « L2 » présente dans de nombreux pays (Allemagne, Russie, Roumanie, France, Pologne, Estonie, Suisse, Ukraine). Parmi les séquences *ridibundus*, on remarque que toutes celles localisées en Grèce ne se retrouvent nulle part ailleurs (« RC11 » et « RC12 »), idem pour les séquences syriennes (« RC9 » et « RC10 »). Ces résultats de localisation semblent intéressants pour d'éventuelles études de phylogéographie des grenouilles vertes, et pourraient peut être permettre d'identifier l'origine des différentes lignées de grenouilles vertes, notamment de rieuses.

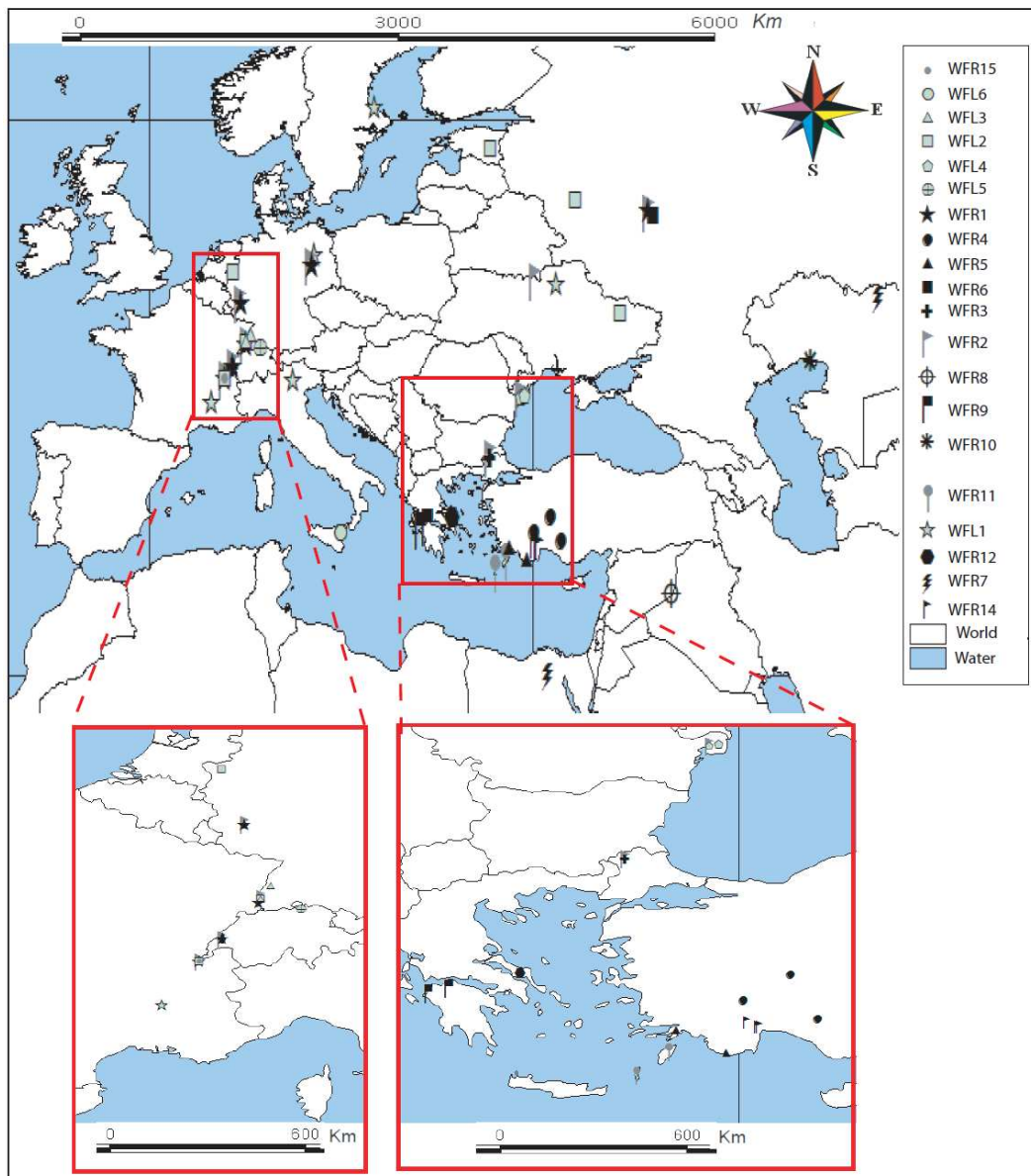


Figure 3.1 : Cartes représentant la localisation à l'échelle européenne des différentes séquences ITS2 mise en évidence lors de la phase de séquençage.

Tableau 3.1 : Allèles ITS2 (séquences) spécifiques pour les grenouilles vertes des groupes *P. ribibundus* (WFR) et *P. lessonae-bergeri* (WFL) avec le numéro d'accèsion correspondant (GenBank), l'origine (localité, coordonnées) des individus étudiés. Les allèles ont été désignés selon la nomenclature de Ohst (2008).

Taxon/Group	Allele	Accession No	Origin				N
			Country	Locality	Latitude	Longitude	
<i>P. lessonae/P. bergeri</i>	WFL1	HM445714	Germany	Niemegk	52.08 N	12.70 E	1
			Germany	Wernitz	52.57 N	12.92 E	1
			France	Ramière	44.77 N	4.85 E	1
			Italy	Carbonara	45.93 N	11.22 E	2
			Sweden	Uppland	60.60 N	17.62 E	1
			Ukraine	Chernigov	51.03 N	31.88 E	1
	WFL2	HM445715	Estonia	Tartu	58.37 N	26.72 E	1
			France	Chautagnes	46.05 N	5.88 E	1
			Germany	Flüren	51.67 N	6.52 E	2
			Russia	Smolensk	55.60 N	33.30 E	1
			Sweden	Skåne	55.37 N	13.10 E	1
			Switzerland	Bremgarten	47.90 N	7.58 E	5
	WFL3	HM445716	Germany	Ettenheim	48.27 N	7.87 E	2
			Switzerland	Bremgarten	47.90 N	7.58 E	2
	WFL4	HM445717	Romania	Donau-Delta	45.03 N	29.17 E	1
			Romania	Caraorman	45.08 N	29.40 E	1
	WFL5	HM445718	Switzerland	Dätwil-Garden	47.60 N	8.70 E	1
	WFL6	HM445719	Italy	Pianadi	37.67 N	15.00 E	3
<i>P. ridibundus</i> group	WFR1	HM445720	Germany	Niemegk	52.08 N	12.70 E	9
			Germany	Pünderich	50.04 N	7.14 E	2
			France	Chautagnes	46.05 N	5.88 E	1
			Russia	Moskau	54.98 N	39.07 E	1
			Switzerland	Creux de Terre	46.72 N	6.57 E	2
	WFR2	HM445721	Germany	Niemegk	52.08 N	12.70 E	2
			France	Chautagnes	46.05 N	5.88 E	6
			Romania	Donau-Delta	45.03 N	29.17 E	2
			Russia	Moskau	54.98 N	39.07 E	1
			Switzerland	Bremgarten	47.90 N	7.58 E	1
			Switzerland	Arnex	46.70 N	6.52 E	2
			Turkey	Edirne	41.78 N	26.82 E	1
			Ukraine	Chernobyl	51.27 N	30.23 E	1
			WFR3	HM445722	Switzerland	Creux de Terre	46.72 N
	Turkey	Edirne			41.78 N	26.82 E	1
	WFR4	HM445723	Turkey	Akcapinar	37.20 N	32.20 E	2
			Turkey	Burdur Lake	37.72 N	30.10 E	2
			Turkey	Aksehir Lake	38.47 N	31.42 E	1
	WFR5	HM445724	Turkey	Mugla	36.85 N	28.23 E	2
			Turkey	Antalya	36.20 N	29.63 E	2
	WFR6	HM445725	Russia	Ryazan	54.73 N	39.52 E	2
	WFR7	HM445726	Kazakhstan	Aktobe	50.28 N	57.22 E	1
	WFR8	HM445727	Syria	Abu Kamal	34.43 N	40.93 E	1
	WFR9	HM445728	Greece	Kalanistra	38.07 N	21.87 E	1
			Greece	Lechena	37.93 N	21.27 E	1
	WFR10	HM445729	Kazakhstan	Atyrau	47.10 N	51.92 E	3
	WFR11	HM445730	Greece	Olympos	35.58 N	27.13 E	2
			Greece	Archipolis	36.25 N	28.03 E	1
	WFR12	HM445731	Greece	Mistros	38.52 N	23.85 E	1
	WFR13	HM445732	France	Chautagnes	46.05 N	5.88 E	2
	WFR14	HM445733	Turkey	Antalya	36.98 N	30.56 E	1
			Turkey	Antalya	36.96 N	30.51 E	1
<i>P. epeiroticus</i>	EPE1	HM445712	Greece	Nea Manolada	37.7 N	21.4 E	1
	EPE2	HM445713	Greece	Igouminitsa	39.5 N	20.27 E	1

3.1.1.2.b Analyse des séquences ITS2

La longueur des différentes séquences ITS2 variaient de 233 à 244 bases, ce qui résulte de délétions et d'insertions de nucléotides au cours de l'histoire évolutive des populations. Pour la construction de l'arbre phylogénétique le plus parcimonieux, le modèle le plus approprié pour ces séquences *Pelophylax* est HKY, avec un ratio TS / TV = 1,0742. On observe deux clades monophylétiques distincts, “*P. ridibundus* group” et “*P. lessona-bergeri* group” (Figure 3.2). Chaque clade est séparé par un bootstrap élevé (> 80%), et la variabilité génétique intra-clade est relativement faible par rapport à celle inter-clade (cf longueur des branches de l'arbre Figure 3.2). Entre ces deux clades, on retrouve 2 séquences de *P. eperotica* (EPE1 et EPE2).

Lors de l'alignement des séquences, des domaines conservés ont été observés pour chaque groupe, quelque soit la provenance des individus portant ces séquences et quelque soit le polymorphisme intra-spécifique. Ainsi, la recherche de la mise en évidence d'un polymorphisme inter-groupe a permis de sélectionner trois enzymes de restriction ayant des sites de restriction différents (Figure 3.3): KpnI qui coupe spécifiquement la séquence ITS2 des grenouilles du groupe *ridibundus* (fragments de 47 et 224 bp), ainsi que HaeII et SmaI qui coupent uniquement la séquence ITS2 des grenouilles du groupe *P. lessonae-bergeri* (respectivement fragments de 48 et 223 bp, ou 62 et 209 bp).

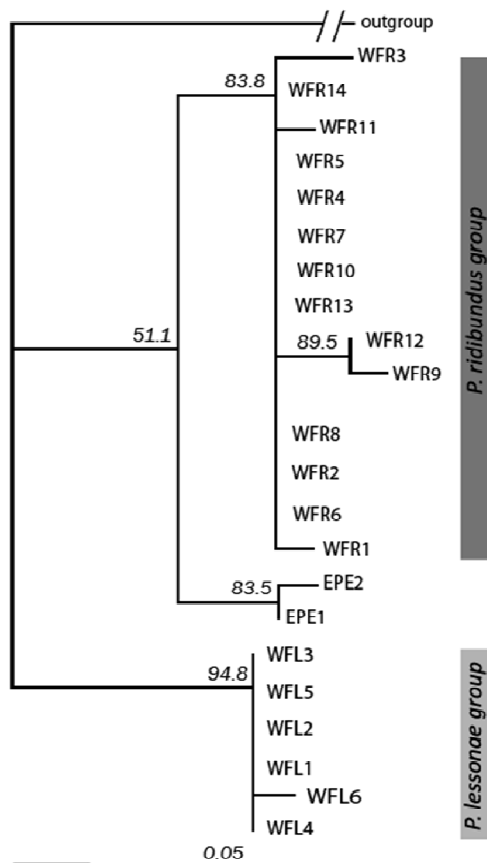


Figure 3.2 : Arbre phylogénétique des espèces du groupe *Pelophylax* étudiées basée sur les séquences ITS2. L’outgroup est un individu de l’espèce *P. nigromaculata*. Les abréviations correspondent au nom de code des séquences listées dans le tableau 1.

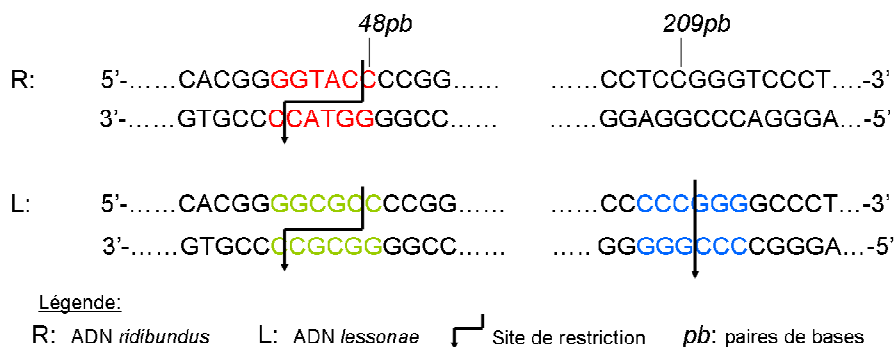


Figure 3.3: Schéma représentant les sites de restrictions des trois enzymes utilisées sur les segments ITS2 amplifiés. Les nucléotides en rouge sont le motif de restriction reconnu par l’enzyme Kpn I, ceux en vert sont le site de l’enzyme Hae II, et ceux en bleu sont le site de l’enzyme Sma I (coupure en Blunt).

3.1.1.2.c. Méthode RFLP sur ITS2

Les échantillons de salive ont permis de bonnes amplifications, meilleures que celles issues de fragments de muscles, car ces échantillons contiennent moins de déchets.

L'identification de tous nos échantillons « français » a été fructueuse avec notre nouvelle méthode, et les trois enzymes de restriction ont donné les mêmes résultats taxonomiques. De plus, les trois enzymes sélectionnées ont produit des patrons de bandes bien différents et faciles à distinguer pour les 3 taxa (Figure 3.4). A l'issue de la digestion par, d'une part, l'enzyme Hae II, et d'autre part, par l'enzyme Sma I, l'ADN *lessonae* est coupé en 2 fragments. Ces fragments étant plus petits, ils migrent plus loin lors de l'électrophorèse, et se retrouvent tout en bas du gel. Les fragments d'ADN de *ridibundus* ne sont pas coupés par ces enzymes. Ils sont donc plus grands, migrent moins loin, et sont alors en haut dans le gel. Lors de la lecture, les individus ne portant qu'une bande basse sont des homozygotes *P. lessonae*, ceux possédant une bande haute sont des homozygotes *P. ridibundus*, et ceux possédant 2 bandes (une haute et une basse) sont des hétérozygotes *P. kl. esculentus*.

L'enzyme Kpn I donne les résultats inverses, car elle coupe l'ADN *ridibundus* en 2 fragments. Ces derniers migrent plus loin dans le gel d'agarose lors de la révélation, car ils sont plus petits. Les bandes les plus basses sont alors les fragments d'ADN de *ridibundus*. L'ADN de *lessonae* n'est pas coupé par cette enzyme (fragments plus grands, migrent moins loin c.a.d. bandes les plus hautes dans le gel). Pour Kpn I, les individus ayant une bande basse sont des homozygotes *P. ridibundus*, ceux ayant une bande haute sont des homozygotes *P. lessonae*, et ceux possédant 2 bandes (une haute et une basse) sont des hétérozygotes *P. kl. esculentus*.

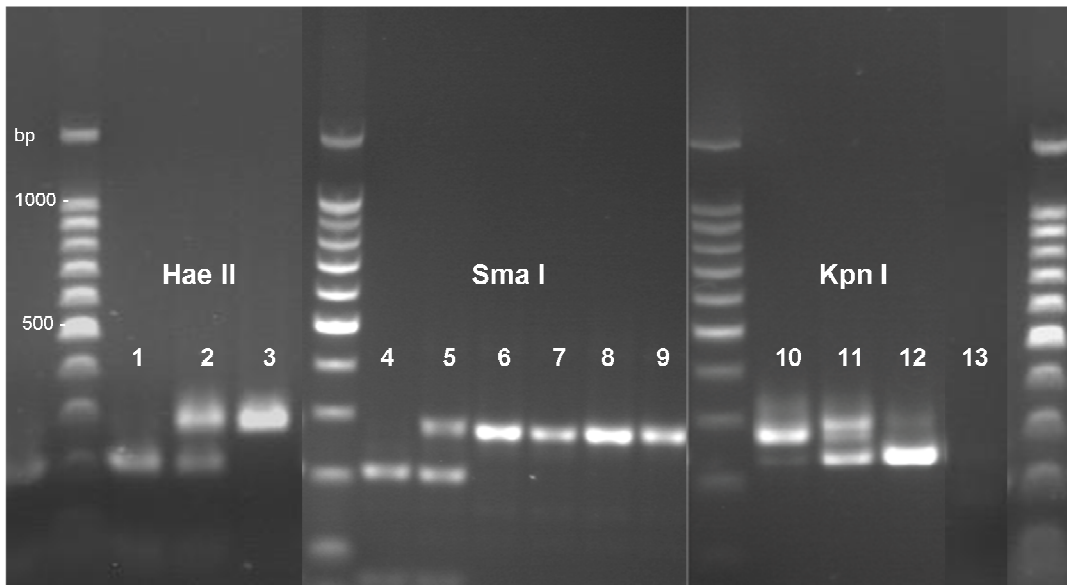


Figure 3.4: Photographie d'un gel d'agarose où l'on distingue les différents profils de restriction enzymatique de segments ITS2. Hae II, Sma I (coupe spécifiquement l'ADN *lessonae*), et Kpn I (coupe spécifiquement l'ADN *ridibundus*). Colonnes 1, 4 et 10: *P. lessonae*; colonnes 2, 5 et 11: *P. esculentus*; colonnes 3, 6 et 12: *P. ridibundus*. Colonnes 7, 8 et 9: Produits de PCR de *P. lessonae*, *P. esculentus* et *P. ridibundus* non digérés. Ladder : marqueur de taille, avec une bande tous les 100 paires de bases (100bp). 13 : contrôle négatif sans ADN.

La comparaison de l'identification taxonomique grâce à notre nouvelle méthode à celle obtenue grâce aux allozymes montre une correspondance de 83.12 %. Les 27 individus classés dans le groupe *ridibundus* par notre nouvelle méthode avaient tous la même identification taxonomique grâce aux allozymes (100% de correspondance). Parmi les 29 *P. lessonae* identifiées par la méthode PCR-RFLP sur ITS2, une correspondance de 77.17% avec l'identification allozymique a été obtenue, car 5 individus apparaissaient comme *P. esculentus*. Pour les 37 échantillons nouvellement identifiés comme étant des hybrides *P. esculentus*, on note une correspondance de 78.38%, 2 individus étaient identifiés préalablement comme des *P. lessonae* et 6 comme des *P. ridibundus*.

Notre méthode PCR-RFLP sur ITS2 permet une affiliation taxonomique efficace car elle est basée sur un arbre phylogénétique robuste, et sur trois sites de restriction différents. La discordance relativement faible entre les deux méthodes d'affiliation pourrait être due à des erreurs de lecture lors de la phase de révélation, ou encore à de mauvaises digestions enzymatiques (non optimal et/ou non terminées). Mais puisque chaque échantillon a été soumis à 3 digestions différentes, cela semble peu probable. La cause majeure expliquant cette discordance entre les deux méthodes est l'introgession génétique (Encart 3.2). En effet,

ce phénomène a déjà été observé parmi les grenouilles vertes de l'Ouest (Mezhzherin, Morozov-Leonov, 1997; Pagano *et al.*, 2003; Pagano, Joly, 1999; Pagano, Schmeller, 1999), où des évènements d'introgession entre *P. lessonae* et *P. ridibundus* ont été décrits et vice versa, par l'intermédiaire de l'hybride hybridogénétique *P. esculentus* (Holsbeek *et al.*, 2008; Pagano *et al.*, 2003; Pagano *et al.*, 2001c; Plötner *et al.*, 2008; Vorburger, Reyer, 2003). Contrairement à l'Europe Centrale et de l'Est, une fréquence plus importante de recombinaisons et introgressions génétiques peut être attendue chez les grenouilles vertes de l'Ouest de l'Europe, du fait des nombreuses hybridations entre grenouilles autochtones et allochtones (Holsbeek *et al.*, 2008; Mezhzherin, Morozov-Leonov, 1997; Pagano *et al.*, 2001a; Pagano *et al.*, 2003; Pagano *et al.*, 2001c; Plötner *et al.*, 2008; Vorburger, Reyer, 2003). Les rétrocroisements de ces hybrides avec des *P. lessonae* and *P. ridibundus* peuvent aboutir à des individus dont le patrimoine génétique est une mosaïque d'ADN portant les caractéristiques de plusieurs espèces (Ohst 2008). Afin d'estimer les évènements d'introgession, et dans le cas où les échantillons pourraient contenir des espèces allochtones, une analyse multi-locus devrait être effectuée, en utilisant d'autres marqueurs moléculaires tels les microsatellites (Garner *et al.*, 2000; Hotz *et al.*, 2001; Zeisset, Beebe, 2000), l'intron 1 du serum albumin (Plötner *et al.* 2009). Néanmoins, la possibilité d'une identification biaisée ne peut pas être exclue, due notamment à celle issue de la méthode allozymique. En effet, la détermination des allèles allozymiques spécifiques a été établie à partir d'échantillons témoins identifiés morphologiquement. Or, ceci pourrait être problématique car un gradient morphologique est observé suite aux nombreuses introgressions et aux cas de triploïdies ce qui rend parfois hasardeux l'identification taxonomique sur des critères morphologiques.

Encart n° 3.2 : L'introgession génétique

L'introgession génétique est le nom donné par Anderson et Hubricht (1938) au processus conduisant à ce qu'une partie du génome d'un individu d'une espèce intègre le génome d'un individu d'une autre espèce. Cette incorporation de gènes d'une espèce dans le complexe génique d'une autre ce produit à travers l'hybridation. Ce flux de gènes interspécifique peut survenir dans certains cas, lors de la gamétogénèse chez un hybride, où il peut y avoir des phénomènes de recombinaison génétique, et passage de fragments d'ADN d'un génome parental à l'autre. Ceux-ci ne sont alors pas détectés par les mécanismes de correction, et sont intégrés dans le génome des descendants (Griffiths *et al.*, 2000). Plusieurs générations ayant subi des évènements d'introgession répétée peuvent aboutir à de la spéciation, cas souvent observé chez les plantes (Rieseberg, Wendel, 1993).

3.1.1.4. Conclusions et perspectives

Une identification taxonomique correcte est cruciale pour les programmes de surveillance et de protection des grenouilles vertes. Notre nouvelle méthode PCR-RFLP sur ITS2 permet une identification taxonomique fiable, car elle est basée sur une analyse de séquences venant de toute l'Europe, sur un arbre phylogénétique robuste, et sur trois sites de restrictions différents. Au vu du fort taux de correspondance, cette nouvelle méthode semble être une bonne alternative aux marqueurs allozymiques, car seul un prélèvement salivaire est nécessaire, ce qui est moins invasif que l'ancienne méthode de référence. De plus, cette nouvelle technique d'affiliation est particulièrement intéressante, car elle permet d'identifier les taxa du complexe *P. esculentus*, y compris les hybrides, contrairement aux marqueurs mitochondriaux. Notre nouvelle méthode RFLP sur ITS2 est intéressante car simple, plus que les analyses via les marqueurs microsatellites, rapide, et peu coûteuse. Ainsi, il serait plus facile d'entreprendre des analyses génétiques lorsque des identifications fiables sont nécessaires (pour des élevages expérimentaux, des études à l'échelle de l'individu ou de la population, etc...). Elle permet d'avoir une première identification, utilisable pour les questionnaires environnementaux et pour les suivis à long termes. Notre méthode pourrait notamment être utilisée dans le cas du suivi de petites populations en déclin de *P. lessonae* en Europe centrale, qui sont très difficile à identifier et à protéger (Foster, Beebe, 2004). Toutefois, afin d'estimer les événements d'introgession génétique, ou lors d'analyse d'échantillons pouvant contenir des grenouilles allochtones (originaire des Balkan, d'Egypte, d'Anatolie), l'identification taxonomique doit s'appuyer sur une approche multi-locus pour plus de fiabilité.

Il serait intéressant d'étudier le polymorphisme intra-individuel des segments ITS2, en séquençant l'ADN de plusieurs clones, donc de plusieurs copies présentes chez un même individu, afin de mieux comprendre nos résultats et d'affiner cette nouvelle technique d'identification.

De plus, cette méthode RFLP pourrait être utilisée pour répondre à d'autres questions, comme par exemple identifier l'origine des *P. ridibundus* en appliquant d'autres enzymes de restrictions, afin d'identifier les espèces des grenouilles vertes allochtones, et de comprendre les différentes voies d'introduction.

3.1.2. Identification taxonomique des grenouilles vertes échantillonnées dans la Nord de la France

3.1.2.1. Introduction

La zone étudiée durant la thèse contient les 3 taxa du complexe *P. esculentus*, et probablement des espèces allochtones venant notamment des Balkans et d'Anatolie. Ces dernières ne pouvant être détectées ni par les marqueurs allozymiques, ni grâce à notre nouvelle méthode PCR-RFLP sur ITS2, ont longtemps été confondues avec les *P. ridibundus*. Il sera considéré comme le propose (Ohst, 2008) qu'elles font partie du « groupe *ridibundus* » (*ridibundus*-like water frog species). La méthode PCR-RFLP ne permet pas de distinguer entre *P. lessonae* et *P. bergeri* mais, *P. bergeri* est endémique (présente en Italie), et n'a jamais été rapportée dans la zone étudiée. Par conséquent, la méthode PCR-RFLP sur ITS2 a été choisi pour l'identification taxonomique de toutes les grenouilles vertes prélevées au court de la thèse, car elle est simple, rapide, peu couteuse, et surtout moins invasive que les allozymes puisque seul un échantillon de salive suffit.

3.1.2.2. Matériels et méthodes

Les échantillons de grenouilles vertes prélevés durant les deux années consécutives de terrain dans la moitié Nord de la France (énoncés en chapitre 2) ont été analysés grâce à cette nouvelle méthode d'identification. Ainsi, 1005 échantillons de salives, en plus des 93 échantillons témoins, ont été soumis à la méthode RFLP sur la séquence ITS2 : 514 venant des Ardennes, 357 du Maine-et-Loire, 35 de Loire-Atlantique, 33 de l'île d'Yeu en Vendée, 21 des Côtes d'Armor, et 45 du Morbihan. Nous avons appliqué le protocole précédemment développé dans la partie « mise au point » page 70, en utilisant, après chaque PCR, les 3 enzymes testées. Lors de la phase de mise en évidence du polymorphisme de taille des fragments d'ADN digéré, des témoins identifiés grâce à 3 allozymes et à notre nouvelle méthode RFLP (cf partie 3.1.1 « mise au point ») ont été judicieusement placés dans chaque gel : un échantillon identifié comme étant *P. ridibundus*, un échantillon *P. lessonae*, et un *P. kl. esculentus*. Ainsi, lors de la phase de lecture de chaque gel, la digestion de ses trois témoins nous permet de « caler » notre interprétation pour tous les autres échantillons. Tous les individus dont l'interprétation était difficile voir impossible ont été analysés une seconde fois. Pour une identification la plus robuste possible, une double lecture à l'aveugle a été

effectuée, puis, ces deux lectures ont été confrontées. Dans un premier temps, nous avons identifié le taxon de chaque grenouille verte échantillonnée en comptant le nombre de bandes présentes. Nous obtenons alors 3 catégories : RR (homozygote de l'espèce *P. ridibundus*), RL (hétérozygote hybride *P. kl. esculentus*) et LL (homozygote de l'espèce *P. lessonae*) (cf Figure 3.5). Puis, dans un second temps, nous avons en plus tenu compte de l'intensité des bandes d'ADN pour être plus précis. Nous notons alors 5 catégories : RR, RL (hétérozygote, avec une bande « R » plus intense que la bande « L »), RL, rL (hétérozygote, avec une bande « R » moins intense que la bande « L »), et LL (Figure 3.5).

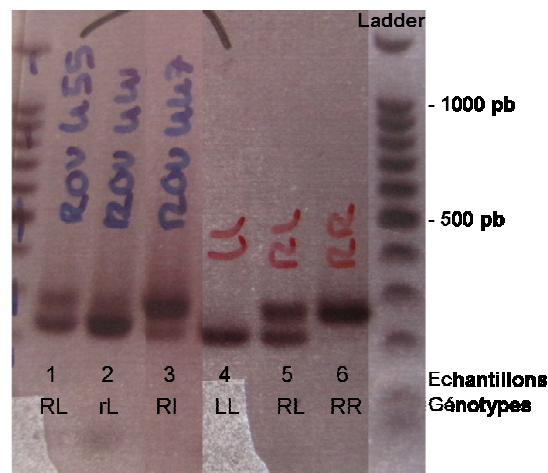


Figure 3.5: Photographie d'un gel d'agarose où l'on distingue les différences d'intensité des bandes d'ADN pour la digestion par l'enzyme Sma I (coupant spécifiquement l'ADN *lessonae*). L'échantillon 1 possède 2 bandes d'égales intensité : géotype RL ; l'échantillon 2 a 2 bandes dont celle du bas est nettement plus marquée : géotype rL ; l'échantillon 3 a 2 bandes dont celle du haut est plus marquée : géotype RI ; l'échantillon 4 est un témoin *P. lessonae* ; le 5 un témoin *P. kl. esculentus* ; et le 6 un témoin *P. ridibundus*. Ladder : marqueur de taille, avec une bande tous les 100 paires de bases (100bp).

Une analyse comparative du peuplement en grenouilles vertes sera effectuée uniquement pour les deux départements contenant le plus grand nombre d'échantillons, à l'aide d'un test du χ^2 (comparaison de proportions).

3.1.2.3. Résultats

3.1.2.3.a Peuplement total des zones d'étude

Parmi les 1005 échantillons analysés, 991 ont pu être identifiés. 9 échantillons restent indéterminés malgré plusieurs analyses, et 5 autres sont notés « Indécision » car les enzymes ne nous donnaient pas le même taxon. En effet, pour ces 5 individus, une enzyme nous indiquait qu'il s'agissait d'hybrides *P. kl. esculentus* (génotype RL), tandis qu'une autre enzyme les coupait comme s'il s'agissaient de *P. lessonae* (génotype LL). Ne pouvant trancher entre les deux enzymes malgré les avoir analysé plusieurs fois, nous les considérons comme non identifiés. On peut noter que notre échantillon de grenouilles vertes provenant du Nord de la France est composé de 564 hybrides (soit 56,16%), de 235 rieuses (23,38%), et de 192 lessona (19,10%) (Figure 3.6, Tableau 3.2 et 3.3).

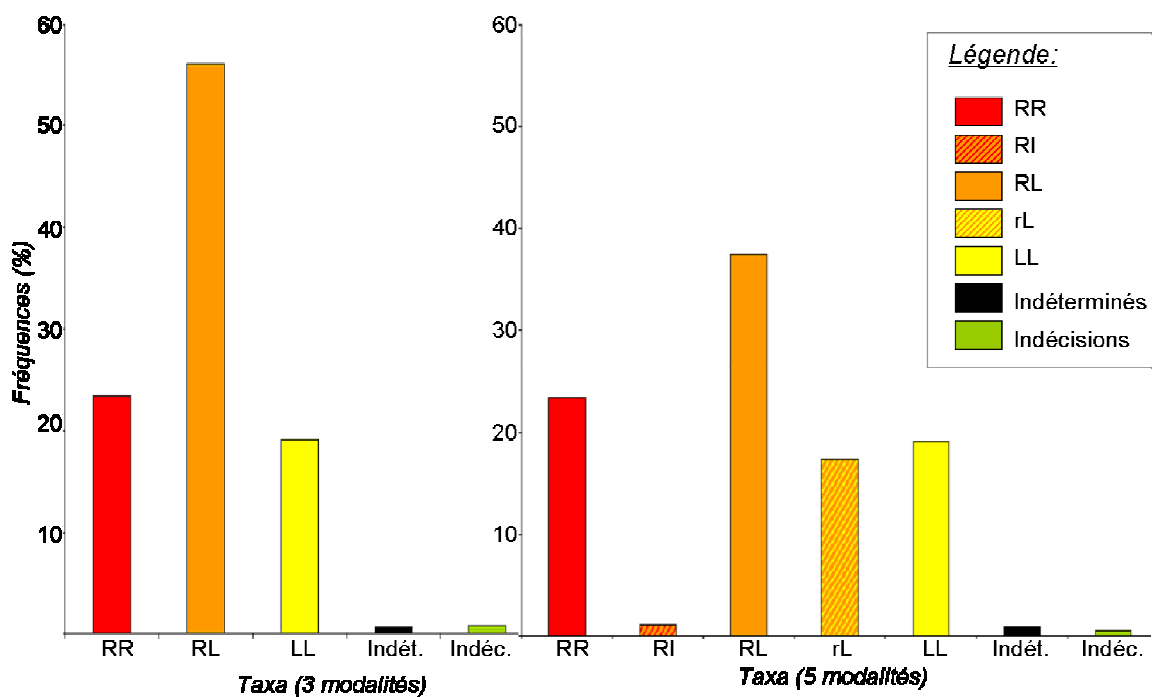


Figure 3.6 : Graphiques représentant le pourcentage des différents groupes de grenouilles identifiées dans le Nord de la France.

3.1.2.3.b. Peuplement à l'échelle des départements échantillonnés

Les proportions des taxa des différents départements sont représentées Figure 3.7, et Tableau 3.2 et 3.3. Le peuplement en grenouilles vertes dans les Ardennes comprenant 514 échantillons est majoritairement composé d'hybrides (Figure 3.7, Tableau 3.2 et 3.3), avec 379 individus, soit 73,74%. 120 grenouilles de Lessona ont été identifiées (23,35%), ainsi que 9 rieuses (1,75%), 2 échantillons non identifiés (0,39%), et 4 « indécisions » (0,78%). Si on décompose en 5 catégories, on compte alors parmi les hybrides 6 (RI) (1,17%), 206 (RL) (40,08%), et 167 (rL) (32,49%). Celui dans le Maine-et-Loire constitué de 357 échantillons est composé majoritairement de grenouilles rieuses, avec 167 individus, soit 46,78%. 54 grenouilles de lessona (15,13%), 134 hybrides ont été identifiées (37,54%), et 2 échantillons non identifiés (0,56%). Avec une analyse plus fine, on dénombre parmi les hybrides 6 (RI) (1,68%), 120 (RL) (33,61%), et 8 (rL) (2,24%). Parmi les 33 échantillons en provenance de la Vendée, on observe 16 rieuses (48,48%), 15 lessonae (45,45%), 1 échantillon non identifié (3,03%) et 1 « indécision » (3,03%). Il est à noter qu'aucun hybride n'a été détecté. En Loire-Atlantique, l'échantillonnage de 35 individus est composé de 5 rieuses (14,29%), 27 hybrides (77,14%), 2 lessona (5,71%), et 1 indéterminée (2,86%). On observe seulement 3 catégories différentes de grenouilles (pas de décomposition des hybrides en 3 modalités). Dans les Côtes d'Armor, le peuplement en grenouilles est constitué à 100% d'hybride, avec 21 *P. kl. esculentus* identifiées. Et enfin, dans le Morbihan, parmi les 45 échantillons, 38 rieuses ont été observées (84,44%), 3 hybrides (6,67%), 1 lessona (22,22%), et 3 échantillons indéterminés (6,67%).

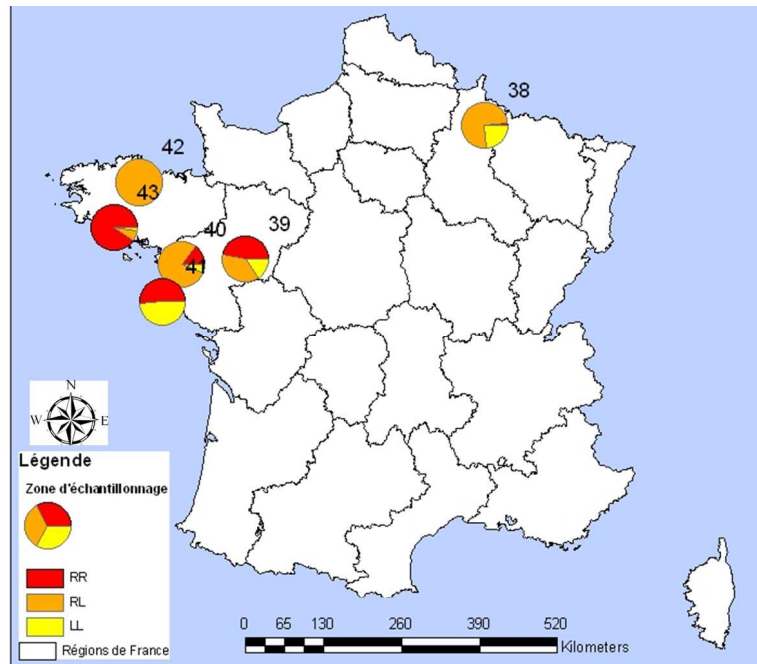


Figure 3.7 : Secteurs représentant le pourcentage de taxa de grenouilles vertes identifiés dans les différents départements étudiés en France.

Lorsque nous faisons une étude comparative du peuplement en grenouilles vertes entre les deux zones d'étude principales, on remarque qu'il y a significativement plus de grenouilles de *Lessona* dans les Ardennes que dans le Maine-et-Loire (test du χ^2 , $\chi^2 = 8.3983$, $dl = 1$, $p = 0.0037$). De même, il y a plus d'hybrides dans les Ardennes que dans le Maine-et-Loire de manière significative (test du χ^2 , $\chi^2 = 112.5544$, $dl = 1$, $p < 0.0001$), et il y a significativement moins de grenouilles rieuses dans les Ardennes que dans le Maine-et-Loire (test du χ^2 , $\chi^2 = 262.1332$, $dl = 1$, $p < 0.0001$).

3.1.2.3.c. Peuplements à l'échelle des sites échantillonnés

Les proportions des taxa des 18 sites des Ardennes, des 13 sites du Maine-et-Loire, des 2 sites de la Vendée, et du site en Loire-Atlantique, Côtes d'Armor et Morbihan sont représentées Figure 3.8, et Tableau 3.2 et 3.3. Dans les Ardennes, le peuplement est essentiellement constitué d'hybrides, ainsi que de *Lessona*. Nous avons observé plusieurs mares localisées dans le Sud de la zone échantillonnée dont les grenouilles vertes ont toutes été identifiées comme étant des hybrides (mares 1, 2, 10, et 13). Seules 9 rieuses ont été identifiées, présentes dans les mares 3, 5, 7, 12, 15, et 17. Dans la zone d'étude du Maine-et-Loire, on retrouve une grande majorité de rieuses, présentes dans toutes les mares, à

l'exception des sites 20, 23 et 31. Les mares 20 et 31 ne sont d'ailleurs composées que d'hybrides. Les grenouilles de lessona sont présentes dans 6 mares, toutes localisées dans le Sud de la zone d'étude. Sur l'île d'Yeu, 2 sites ont été échantillonnés, l'un dont le peuplement en grenouilles vertes n'est constitué que de grenouilles de lessona (le site 33), et l'autre composé de rieuses et de lessona (le site 34).

En Loire-Atlantique, n'ayant échantillonné qu'un seul site, les résultats sont les mêmes que ceux présenté dans la partie « échelle départementale ». En Bretagne, la zone humide étudiée du Loch (Morbihan) contient les 3 taxa, dont en majorité des grenouilles rieuses. Seule une grenouille de lessona a été observée. Dans la mare étudiée dans le Bois d'Avaugour (Côtes d'Armor), seuls des hybrides ont été identifiés.

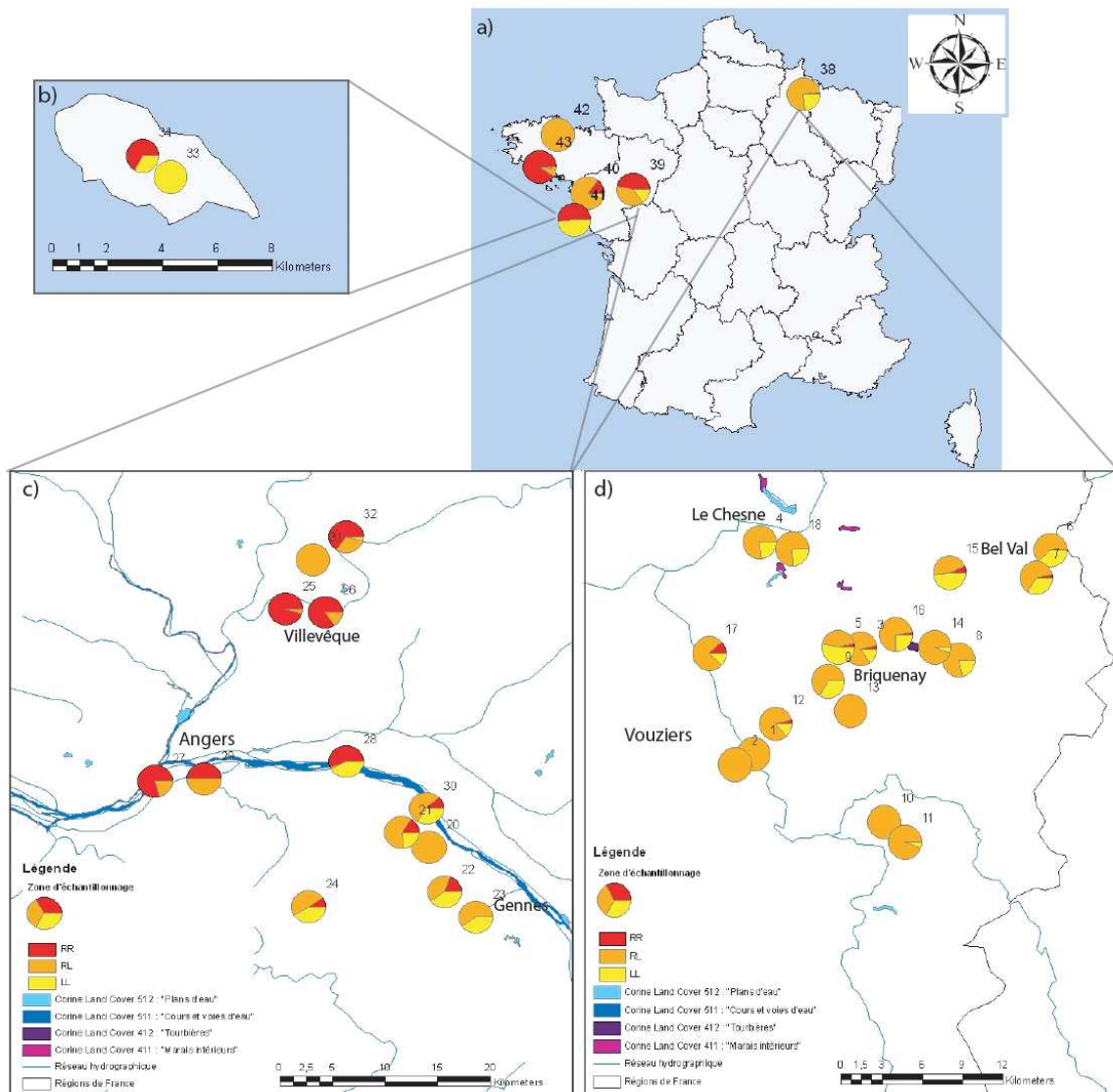


Figure 3.8 : Secteurs représentant le pourcentage de taxa de grenouilles vertes identifiés dans les différents sites d'étude en France. a) Localisation des zones d'étude en France, b) Zone d'étude de l'île d'Yeu, c), zone d'étude de l'Anjou, d) zone suivie de l'Argonne ardennaise.

3.1.2.4. Discussion

3.1.2.4.a. La répartition des grenouilles vertes en France

Le cas de la grenouille rieuse dans l'Ouest

La répartition des différents taxa de grenouilles vertes n'est pas claire en Europe ainsi qu'en France, car du fait des grandes difficultés d'identification, les naturalistes ne se risquent plus à désigner d'espèces, et notent simplement « *Pelophylax sp.* » pour ne pas faire d'erreur. La précision des données est rarement standardisée, et la finesse du maillage varie selon les cartes de répartition. Jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle, l'aire de répartition de la rieuse était représenté s'arrêtant à l'Est de la France (Figure 3.9) , et colonisant progressivement l'Ouest (Duguet, Melki, 2003; Le Garff, 1998; Nöller, Nöller, 2003; Pagano, 1999; Pagano *et al.*, 2001a; Pagano *et al.*, 2003; Santiani, 2002). De fait, plusieurs auteurs qualifient *P. ridibundus* d'espèce « invasive » (Holsbeek *et al.*, 2009b; Pagano *et al.*, 2003; Schmeller *et al.*, 2007). Les dernières analyses génétiques des grenouilles vertes en Bretagne n'avaient identifié aucune rieuse (Regnier, 1983). Muratet dans son guide d'identification est le premier à étendre l'aire de répartition potentielle de la rieuse jusqu'à l'Ouest de la France (Muratet, 2008). Grâce à nos résultats, nous pouvons confirmer de manière fiable la présence de *P. ridibundus* dans le Nord Ouest de la France. Effectivement, nous retrouvons des rieuses jusqu'à la pointe Ouest du pays, en Bretagne, ainsi que sur l'île d'Yeu (Figure 3.10) ce qui est conforme avec l'hypothèse d'une invasion biologique.

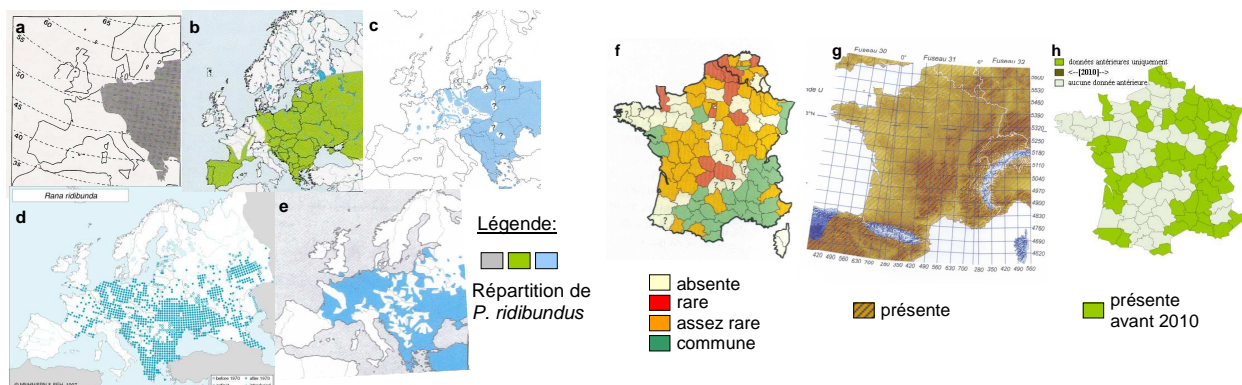


Figure 3.9 : Cartes de répartition de la grenouille rieuse en Europe et en France dans les différents guides naturalistes. a) (Le Garff, 1998), b) (Santiani, 2002), c) (Nöller, Nöller, 2003), d) MNHN, e) (Duguet, Melki, 2003), f) (Duguet, Melki, 2003), g) (Muratet, 2008), h) Muséum national d'Histoire naturelle [Ed]. 2003-2010. *Inventaire national du Patrimoine naturel*, site Web : <http://inpn.mnhn.fr>.

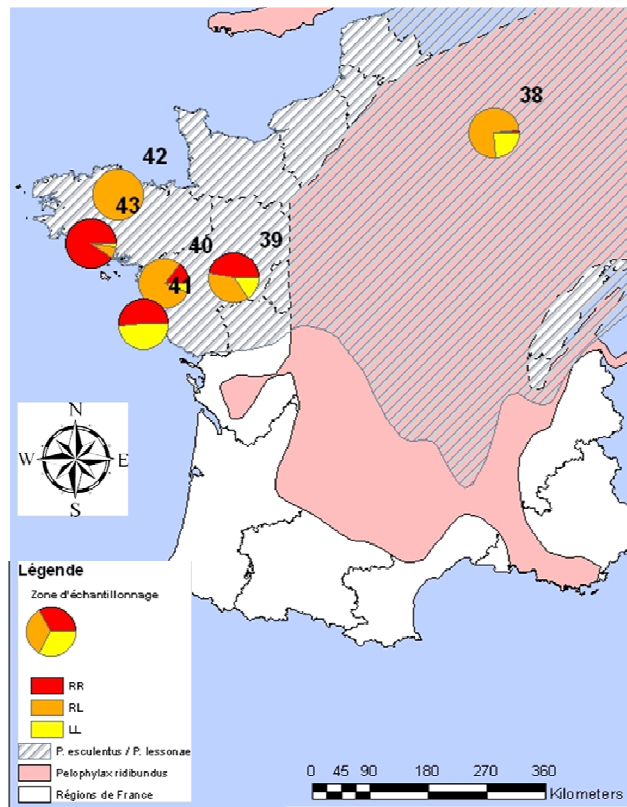


Figure 3.10 : Carte de répartition des *P. ridibundus*, *P. lessonae*, et *P. esculentus* en France selon l'IUCN, avec les secteurs représentant nos résultats de l'identification génétique grâce à la méthode RFLP-ITS2.

Au regard des distributions historiques des différents taxons de grenouilles vertes en France, la présence de grenouilles rieuses peut s'expliquer selon trois hypothèses : 1) il s'agit d'une espèce native, au même titre que la grenouille de lessona, à tout le moins le long de la vallée du Rhône (Graf, Polls Pelaz, 1989), 2) certaines populations sont natives et relictuelles, les autres étant exotiques (allochtones), et 3) toutes les populations de rieuses proviennent d'importations-introductions, et sont exotiques. Des études ont montrées qu'actuellement en France, cette espèce est majoritairement exotique, originaire des Balkans, d'Egypte et d'Anatolie (Pagano *et al.*, 2001a; Pagano *et al.*, 2003; Schmeller *et al.*, 2007). Elle a été et est toujours importée en France pour essentiellement des raisons culinaires, à hauteur de 700 à 800 tonnes de grenouilles vivantes par an (Neveu, 2004). Ces importations ont de nombreuses conséquences sur le peuplement en amphibiens, avec l'arrivée d'une nouvelle espèce compétitrice, et le risque d'introduction par la même occasion de nouvelles maladies et parasites. A l'échelle des grenouilles vertes, l'arrivée massive de ces rieuses allochtones a de nombreux effets, en augmentant les cas d'hybridations avec la grenouille de lessona, et par la

même occasion la fréquence des phénomènes d'introgression génétique (Holsbeek, Jooris, 2009). Des gènes exotiques sont en effet retrouvés dans des lignées rieuses natives, ainsi que chez des hybrides. Certains chercheurs considèrent alors ce phénomène comme une invasion de gènes exotiques d'une espèce à une autre, que l'on appelle aussi « pollution génétique » (Pagano et al. 2003).

La grenouille rieuse dans l'Argonne Ardennaise

Il est intéressant de noter que dans les Ardennes, seules 9 grenouilles rieuses ont été identifiées parmi les 514 échantillons analysés. Ce résultat est assez étonnant, dans la mesure où la colonisation présumée de cette espèce se fait d'Est en Ouest, comme le montre la carte de répartition de l'IUCN (Figure 10). Or, on compte plus de rieuses en Bretagne que dans les Ardennes. Ceci suggère soit une répartition discontinue de la rieuse, qui est présente par patches sur le territoire (l'Argonne étant une zone sans patches), soit que le front de colonisation se fait en passant par le Sud Est et progressivement, remonte vers le Nord de la France et l'Ouest, soit encore que les rieuses échantillonnées n'ont pas les mêmes exigences écologiques pour l'utilisation de l'habitat selon qu'elles sont natives ou autochtones.

La grenouille rieuse sur l'île d'Yeu

Le peuplement en grenouilles vertes en Vendée serait constitué uniquement de rieuses et de lessona. Il est intéressant de noter que la mare n° 33 (VIY9) ne contient que de grenouilles de lessonae, tandis que la mare n°34 (VIY11) est composée de rieuses et lessona en sympatrie, mais d'aucun hybride. Néanmoins, du fait des amplexus observés nous soupçonnons fortement la présence d'hybrides sur l'île.

Nos résultats nous amène à penser que sur l'île d'Yeu, la sympatrie entre les deux espèces serait très récente. Les grenouilles de lessona seraient l'espèce autochtone de l'île, et les rieuses auraient été importées depuis peu. Ces dernières en seraient à leur phase de colonisation et d'expansion, et commenceraient à s'hybrider avec les grenouilles de lessona rencontrées. Nous préconisons donc un suivi régulier du peuplement de cet île, afin d'évaluer la progression des rieuses et d'observer l'évolution du peuplement en grenouilles vertes. D'un point de vue évolutif, c'est aussi l'occasion d'observer des hybridations primaires entre les deux espèces parentales (RRxLL), ce qui est relativement rare, les hybrides descendant souvent d'une hybridation secondaire (RLxLL).

3.1.2.4.b. Hybridogénèse parfaite ?

Système « E-pur »

Les échantillons venant de la mare 42 (Bois d'Avaugour dans les Côtes d'Armor), ainsi que ceux des mares 1, 2, 10, et 13 (Ardennes), 21 et 30 (Maine-et-Loire) ne contiennent que des hybrides ne côtoyant pas leurs espèces parentales, ce qui n'était pas attendu (Christiansen *et al.*, 2005; Pagano *et al.*, 2001a). En effet, puisque les hybrides présentent un mode de reproduction hybridogénétique, on les retrouve en sympatrie avec les deux espèces parentales, ou au moins avec celle qu'ils parasitent sexuellement, la grenouille de lessona, dont dépend la pérennisation de leur lignée. Ici, nous avons identifié une population « pure » d'hybrides, qui pourraient s'auto-entretenir. Ce genre de cas a déjà été observé, appelé système « E pur », par Uzzell et Berger (1975), montrant que les individus *P. esculentus* d'Europe Centrale produisent 95% de gamètes de génotype R, et 5% de gamètes de génotype L, LL, RL, et RR. Ces dernières ne feraient donc pas une hybridogénèse parfaite, tout comme les hybrides venant des ces sites.

Un gradient d'hybridation

Lors de la lecture des gels d'agarose, nous avons classé les hybrides en 3 catégories différentes en fonction des différences d'intensité des fragments d'ADN digérés chez certains hybrides. Un modèle de gradient d'hybridation pourrait alors être proposé, dans lequel on identifie plusieurs catégories de grenouilles vertes au sein du complexe hybridogénétique du Nord de la France. Ces différences d'intensité peuvent avoir 4 raisons :

La digestion enzymatique des individus de génotype (RL) n'a peut-être pas été totalement efficace. Ceci semble peu probable, car dans chaque gel, nous avons placé des échantillons témoins, qui eux, ont bien été digérés. De plus, nous avons effectué trois digestions avec des différentes enzymes, coupant à des sites différents. La probabilité que les trois enzymes nous amènent à la même conclusion est relativement faible, mais ne peut être totalement exclue.

D'autre part, durant la PCR, il y a eu une création de matrice biaisée en faveur d'un des deux génomes. Le nombre de copie pour le génome R serait supérieur à celui du génome L chez les individus notés RL, et vice et versa pour ceux notés rL. Deux séquences différentes sont amplifiées en parallèle de façon différente. Ce biais méthodologique semble lui aussi peu probable.

Certains hybrides sont triploïdes. Ce phénomène a été observé (Holsbeek *et al.*, 2009a; Tunner, 1979), notamment en Europe Centrale (Plötner *et al.*, 2008) et de l'Est (Christiansen, 2005; Christiansen *et al.*, 2005). Les différences d'intensité révéleraient la composition haploïde ou diploïde en génome parental des hybrides triploïdes. Ceux notés Rl seraient triploïdes de génotype RRL (le R étant plus intense que le L sur les gels), et ceux notés rL seraient de génotype RLL. Et enfin, ces différences d'intensité témoigneraient de la présence d'introgession génétique. La séquence ITS2 est présente en de nombreuses copies, et est portée par plusieurs chromosomes chez un individu. Ainsi, les grenouilles notées Rl seraient des hybrides diploïdes de génotype (RL), mais dont le génome L contiendrait des introgressions venant du génome R. Les grenouilles notées rL auraient un génome R contenant des introgressions du génome L. Günther et Hähnel (1976) ont déjà observé ce type de phénomène sur d'autres séquences de l'ADN, en notant un fort taux d'introgession des allèles de la LDH-B du génome L vers le génome R (Tunner, 1979).

3.1.2.5. Conclusion

Grâce à la nouvelle méthode, j'ai pu contribuer à la mise à jour de la répartition des 3 taxa du complexe *P. esculentus* dans le Nord de la France. On constate des peuplements différents en fonction des départements étudiés et en fonction des sites. Il serait intéressant de poursuivre l'analyse afin d'observer les différents facteurs pouvant expliquer ses différences. Les résultats semblent confirmer l'existence d'une hybridogénèse imparfaite chez certains hybrides, puisque certains sites ne contiennent que des hybrides. De plus, les différences d'intensité de bandes d'ADN digérées que nous avons observé pourraient être la preuve de cas de triploïdie et/ou d'introgessions génétiques. Au vu de ces différences de bandes, il semble crucial de procéder à du clonage afin d'observer le polymorphisme intra-individuel des séquences ITS2, et de comprendre à quoi ces différences sont dues.

Il serait intéressant de poursuivre les analyses de cette séquence afin de mettre au point une méthode d'identification du complexe hybridogénétique présent dans le Sud de la France. En effet, une grande partie de ce territoire contenant des grenouilles vertes des taxa *P. perezi* et *P. kl. grafi*, nous estimons risqué de tenter une identification à l'aide de notre méthode PCR-RFLP sur ITS2 des grenouilles vertes situées en dessous des Pays-de-la-Loire. Grâce à cette avancée, nous pourrions alors réaliser un inventaire du peuplement en grenouilles vertes de la France entière.

3.2. Identification des grenouilles vertes du complexe *P. esculentus* grâce aux marqueurs microsatellites.

3.2.1. Introduction

Les microsatellites sont des séquences d'ADN situés dans des régions non codantes (introns et zones inter-géniques), largement distribuées dans le génome des Eukaryotes. Ces courtes régions d'ADN présentent un motif di-, tri- ou tétra-nucléotides, répété en tandem plusieurs fois. Elles montrent un niveau important de polymorphisme de longueur de fragment, résultant du gain ou de la perte d'unités répétées, du à leur taux de mutation élevé de 10^{-2} à 5.10^{-6} par locus et par génération (Goldstein, Schlötterer, 2000).

Les microsatellites sont des marqueurs moléculaires codominants unilocus qui identifient des allèles homologues permettant de distinguer des homozygotes et des hétérozygotes, et donc d'estimer les fréquences alléliques. Ils sont généralement considérés comme neutres.

Les séquences microsatellites constituent un outil pertinent largement employé pour estimer la diversité génétique (Garner *et al.*, 2003), pour étudier la structure des populations (Giordano *et al.*, 2007), le mode de dispersion (Newman, Squire, 2001), la taille efficace des populations (Rowe, Beebee, 2004), mesurer le flux de gènes interspécifique (Smith, Voss, 2009) réaliser des études phylogéographiques (Snell *et al.*, 2005), ou encore pour des identifications taxonomiques (Holsbeek *et al.*, 2009a; Longato, Bonfante, 1997). Outre leur grande variabilité, les microsatellites sont présents en grand nombre dans le génome, et peuvent être utilisés avec de très petites quantités d'ADN, nécessitant des prélèvements peu invasifs comme des cellules buccales ou des frottis tégumentaires. Ainsi, ces marqueurs sont couramment utilisés en génétique de la conservation des amphibiens (Jehle, Arntzen, 2002).

Afin d'identifier de manière robuste les échantillons de grenouilles vertes collectées durant la thèse, nous avons réalisé une analyse multilocus en utilisant d'autres marqueurs moléculaires, complémentaires de l'identification grâce à la méthode RFLP-ITS2. Le nombre de marqueurs moléculaires développés chez les grenouilles vertes et disponibles sur GeneBank est relativement faible. Les microsatellites sont les plus abondants (Christiansen, 2005; Garner *et al.*, 2000; Hotz *et al.*, 2000; Primmer *et al.*, 2002; Zeisset, Beebee, 2000), utilisés lors d'une précédente étude comme outils d'identification d'individus *P. ridibundus*, *P. lessonae*, et

d'hybrides *P. kl. esculentus* (Holsbeek *et al.*, 2009a). Nous avons eu recours à 6 marqueurs microsatellites, les plus utilisés, afin de réaliser cette affiliation.

3.2.2. Matériels et méthodes

3.2.2.1. Echantillonnage

975 échantillons buccaux de grenouilles vertes ont été collectés pour cette identification : 59 individus témoins prélevés dans le Rhône et identifiés au préalable par 4 marqueurs allozymiques, et 916 prélevés durant les deux années consécutives de terrain (lieu et méthode de captures énoncés en chapitre 2). Parmi eux, 513 échantillons viennent des Ardennes, 350 du Maine-et-Loire, 32 de l'île d'Yeu en Vendée, 21 des Côtes d'Armor. Tous ont été identifiés grâce à la méthode PCR-RFLP sur ITS2 décrite précédemment (appelée aussi « identification par ITS2 »).

3.2.2.2. Extraction et amplification des microsatellites

L'ADN des échantillons buccaux conservés dans de l'éthanol 70% fut extrait en utilisant la méthode de résine échangeuse d'ions Chelex 5% (Walsh *et al.*, 1991). Six loci microsatellites nucléaires ont été analysés (Tableau 3.4) : Res 5, Res 15, Res 17 (Zeisset, Beebee, 2000), RICA 1b5, RICA 5 (Garner *et al.*, 2000), et Rrid 059A (Hotz *et al.*, 2000). Les 6 PCR ont été réalisées avec des amorces portant une queue M13, dans un volume total de 10 μ l, contenant 10 ng d'ADN, 0.4 μ M de chaque amorce, 0.1 mM de chaque dNTP, 2 mM de MgCl₂, et 0.2 unité *Taq* DNA polymérase (Promega). Les PCR ont été réalisées dans un thermocycleur tétrade PT200, et le protocole est le suivant : une dénaturation initiale à 94°C durant 4 minutes, suivie de 10 cycles constitués d'une phase de dénaturation à 94 °C durant 30 s, d'une phase d'hybridation à T_m °C durant 45 s à 61 ou 66°C selon le microsatellite (Tableau 3.4), et d'une phase d'extension à 72 °C durant 1 minute, prolongé par 30 cycles constitués d'une phase de dénaturation à 94 °C durant 30 s, d'une phase d'hybridation à 53 °C durant 45 s, et d'une phase d'extension à 72 °C durant 1 minute, pour terminer par une élongation finale à 72°C durant 10 minutes. Les produits de PCR sont ensuite séparés dans un séquenceur 16 capillaires ABI Prism 3130 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems), en utilisant un marqueur de taille genescan 500-LIZ size standard.

Tableau 3.4 : Liste des marqueurs microsatellites utilisés : nom (locus), motif, séquence des amorces, numéro d'accèsion sur GenBank, température d'hybridation (T_m), taille des fragments, et auteurs ayant développé ou utilisé ces microsatellites. Les codes bibliographiques sont donnés dans le tableau 3.8.

Locus	Motif	Séquence des amorces (5'-3')		N° Accession	T _m (°C)	Nb max d'allèles par locus	Taille mini et maxi (pb)	Code biblio
		Forward	Reverse					
Res5	(GT) ₁₅	F: ATA CTG CCA ATA AGC TGG CAA TGT TTA GC	R: GGC CGA CTT CAA AGG GGT GCT C	AF195839	66	13	118-174	2,4,7
Res15	(GT) ₂₀	F: TTT TTA TTG CTA ACT TGC CTG CTG TG	R: CAG CCC CTC TGG TAC ACC T	AF195842	66	19	224-278	2,3,4
Res17	(TG) ₁₂	F: CTG TGC TGG CTG GGT TAT TGT A	R: CAT CGG GTC TGT CTA TCT ATC CAC	AF195844	61	13	182-266	2,3,4,7
RICA1b5	(CA) ₁₇	F: CCC AGT GAC AGT GAG TAC CG	R: CCC AAC TGG AGG ACC AAA AG	AF286388	61	21	112-172	1,5,7
RICA 5	(CA) ₁₇	F: CCC AGT GAC AGT GAG TAC CG	R: CCC AAC TGG AGG ACC AAA AG	AF286385	61	4	250	1,7
Rrid059A	(AC) ₁₇	F: TGT ACC CGT CAT CGC TAG AG	R: CCC CAT ACA TAT TGT TGG TTC C	FJ024048	61	24	98-174	6

3.2.2.3. Analyse des données génétiques

Le génotype de chaque individu (nombre d'allèles et leur taille) est déterminé grâce au logiciel GENEMAPPER version 3.7 software (Applied Biosystems).

La diversité génétique des deux espèces parentales (identifiée au préalable par d'autres marqueurs) est estimée grâce aux fréquences alléliques, en observant l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e) et la richesse allélique. Les individus *P. kl. esculentus* sont exclus des analyses suivantes, car leur diversité génétique et leur différenciation reflètent leur « état d'hybride ». Les paramètres F_{is}^* et F_{st}^* , ainsi que l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HW) ont été testés grâce aux estimateurs de Weir & Cockerham (Weir, Cockerham, 1984) calculé par le logiciel GENETIX version 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996). La significativité des F_{is} a été testée en utilisant la procédure de permutation par population de GENETIX (10000 permutations). La présence d'éventuels déséquilibres de liaison a été testée grâce au logiciel GENEPOP version 3.4 (Raymond, Rousset, 1995) après application de la correction de Bonferroni pour les tests multiples. Une analyse factorielle de correspondance (AFC) a été réalisée sur les génotypes grâce à GENETIX version 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004), afin de visualiser le pouvoir discriminant des loci. Le nombre le plus probable de groupe (K) au sein du complexe *P. esculentus* et l'assignement de chaque individu à un groupe ont été déterminés en utilisant un modèle basé sur des méthodes Bayésiennes implémentées dans le logiciel STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Nous avons testé des variations de K

allant de 1 à 12 groupes, en utilisant des modèles avec « admixture » (permettant au modèle de considérer que le génotype d'un individu pouvait résulter d'un mélange de plusieurs groupes) ou sans (ne permettant le mélange entre les groupes, ici, les 2 espèces parentales et les hybrides). Chaque modèle a été réalisé en utilisant 10 000 itérations pour 100 000 burn-in, répété 10 fois pour chaque valeur de K. Pour éviter de surestimer le nombre de K, la méthode d'Evanno a été utilisée (Evanno *et al.*, 2005). Nous utilisons un seuil de 90%, comme le logiciel NewHybrids couramment utilisé, pour l'assignement des individus à l'une des deux espèces parentales (Duputié *et al.*, 2007).

3.2.3. Résultats

3.2.3.1. Diversité génétique

Parmi les 6 marqueurs microsatellite testés, seul 5 ont donné des résultats interprétables. Pour la suite des analyses, les résultats alléliques ont été classés en fonction de l'identification taxonomique réalisée grâce à la méthode RFLP sur ITS2. La richesse allélique varie de 7 à 21 allèles selon les loci, les hybrides possédant souvent le plus grand nombre d'allèles (Tableau 3.5). Durant la phase de lecture, on constate que tous les microsatellites ont amplifié chez les 3 taxa. Il n'y a donc aucun locus microsatellite diagnostic, c'est-à-dire spécifique d'un des 3 groupes (surtout des 2 espèces parentales, l'hybride étant la « combinaison génétique » des deux premières). De plus, lorsqu'on observe les fréquences alléliques par microsatellite, très peu d'allèles s'avèrent être spécifiques d'une des deux espèces (Figure 3.11), par exemple porté par *P. lessonae* et les hybrides, mais pas ou très peu par *P. ridibundus*. Les allèles spécifiques de *P. lessonae* sont l'allèle 246 du locus res 17, l'allèle 146 du locus RICA 1b5, et les allèles 172 et 174 du locus res 5. On compte 4 allèles spécifique de *P. ridibundus*, les allèles 150 et 166 du locus Rrid059A, l'allèle 184 du locus res 17, et l'allèle 160 du locus RICA 1b5.

Tableau 3.5 : Richesse allélique obtenue pour chaque microsatellite classée par taxon.

Microsatellites	Taxa		
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. lessonae</i>
Rrid059A	17	21	14
res 17	11	8	10
res 15	18	17	15
RICA 1b5	12	19	11
res 5	7	11	9

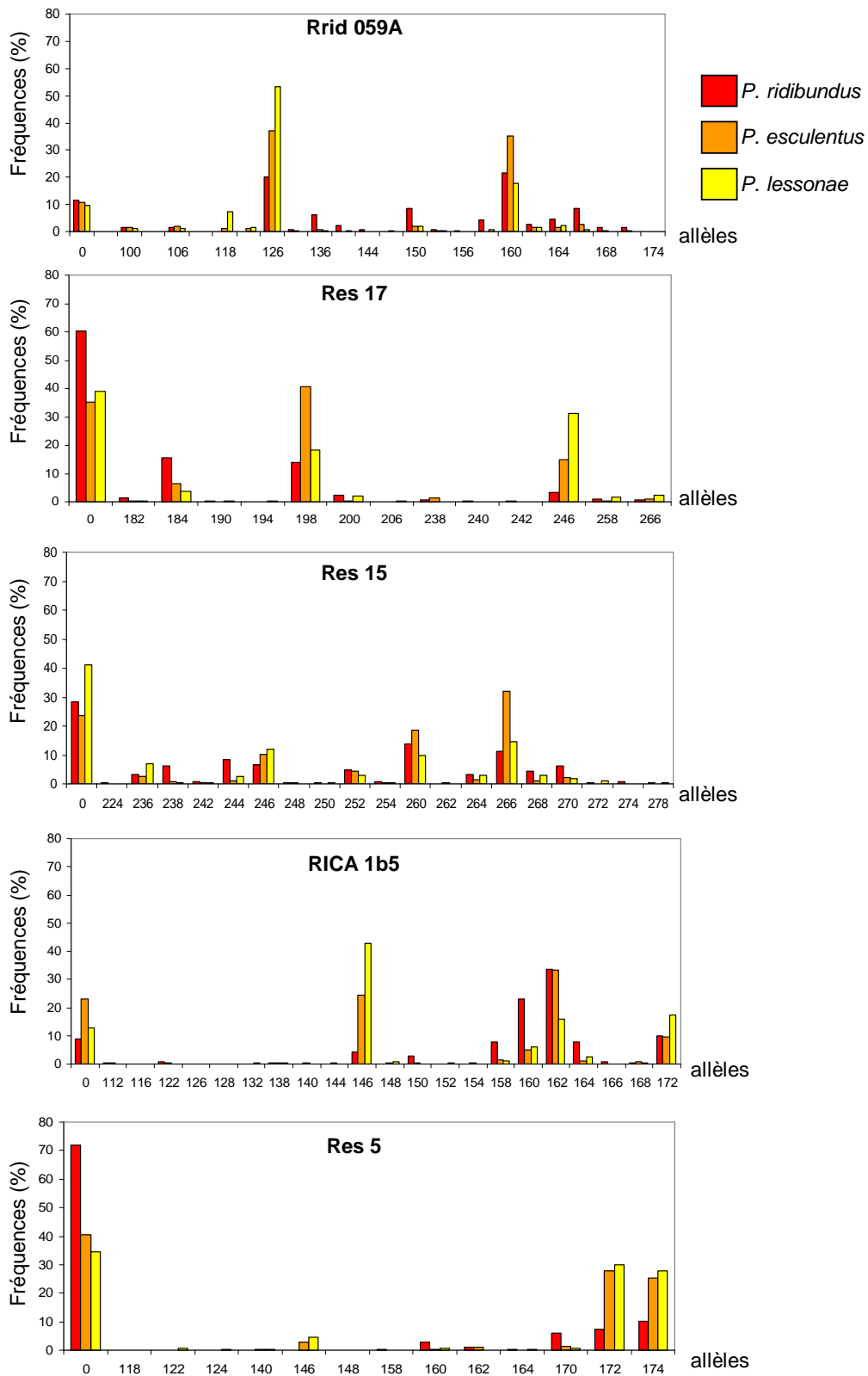


Figure 3.11 : Fréquences alléliques pour chaque microsatellite par taxon identifiés par ITS2.

Tableau 3.6 : Variabilité génétique des 5 microsatellites pour les deux espèces parentales du complexe *P. esculentus*. N : nombre d'échantillons portant des allèles; He : hétérozygotie attendue ; Ho : hétérozygotie observée ; Fis : coefficient de consanguinité; Fst : coefficient de parenté ; P : p-value de la significativité de l'écart à l'équilibre de HW ; RA : richesse allélique.

Locus	Species	
	<i>P. lessonae</i>	<i>P. ridibundus</i>
Rrid059A		
N	183	194
He	0.856	0.6027
Ho	0.5082	0.5361
Fis	0.409	0.113
Fst	0.04831	0.05368
P	0.12465	0.40862
RA	14	17
res 17		
N	82	129
He	0.7088	0.6454
Ho	0.3902	0.3101
Fis	0.454	0.522
Fst	0.13364	0.13492
P	0.53415	0.45432
RA	10	11
res 15		
N	148	126
He	0.8888	0.8421
Ho	0.5135	0.6667
Fis	0.425	0.212
Fst	0.05341	0.03096
P	0.21257	0.42501
RA	15	18
RICA 1b5		
N	190	186
He	0.7786	0.6786
Ho	0.5842	0.5591
Fis	0.252	0.179
Fst	0.07848	0.06248
P	0.17942	0.25215
RA	11	12
res 5		
N	58	140
He	0.7405	0.6111
Ho	0.3103	0.2571
Fis	0.587	0.582
Fst	0.06252	-0.00316
P	0.5906	0.58662
RA	9	7

Les valeurs d'hétérozygoties observées et attendues non biaisées (Nei, 1972) sont présentées dans le tableau 3.6 pour les 2 espèces parentales, ainsi que les Fis et Fst. On constate qu'aucun locus ne présente d'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg ($P > 0.05$), et ce pour les 2 groupes (Tableau 3.6). Tous les locus excepté 4 associations (parmi les 10) présentaient un déséquilibre de liaison significatif ($P < 0,05$) dans le groupe des *P. ridibundus*, et tous dans les *P. lessonae*.

3.2.3.2. Différenciation Mendélienne

Dans un premier temps, nous avons analysé via le logiciel GENETIX uniquement les échantillons témoins, préalablement identifiés par ITS2 et par 4 marqueurs allozymiques. L'analyse factorielle des correspondances (AFC) menée avec les 5 locus microsatellites polymorphes nous permet de distinguer clairement 3 groupes différents, avec une inertie de 69,60% (Figure 3.12). Ensuite, l'ensemble des 975 échantillons ont été analysés, et l'AFC nous révèle des nuages de points mélangés, avec une inertie de 62,96% (Figure 3.13). On distingue les individus classés *P. lessonae* par ITS2 plutôt vers la gauche du graphique, et les *P. ridibundus* vers la droite, les hybrides ont une position centrale et se mélangent aux deux autres groupe. Mais compte tenu de tous ces chevauchements, il est donc impossible de différencier clairement les 3 taxa. Lorsque nous classons les individus en 5 catégories selon l'identification par ITS2 (RR, Rl, RL, rL, et LL), on observe un léger gradient chez les hybrides avec une inertie de 49,92% (Figure 3.14). En effet, les hybrides classés RL ont une position relativement intermédiaire, tandis que ceux classés rL sont plus proches des *P. lessonae*. Néanmoins, ceci n'est qu'une tendance, car les groupes ne sont pas distinguables.

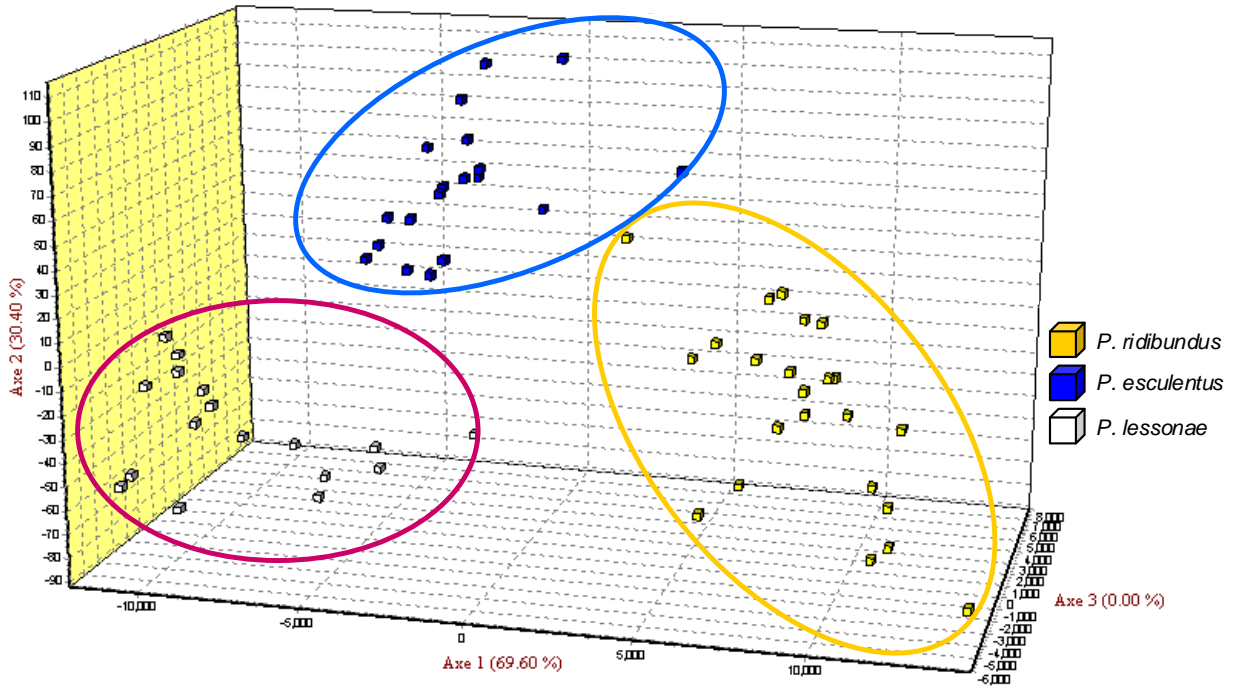


Figure 3.12 : AFC obtenue à partir des échantillons témoins

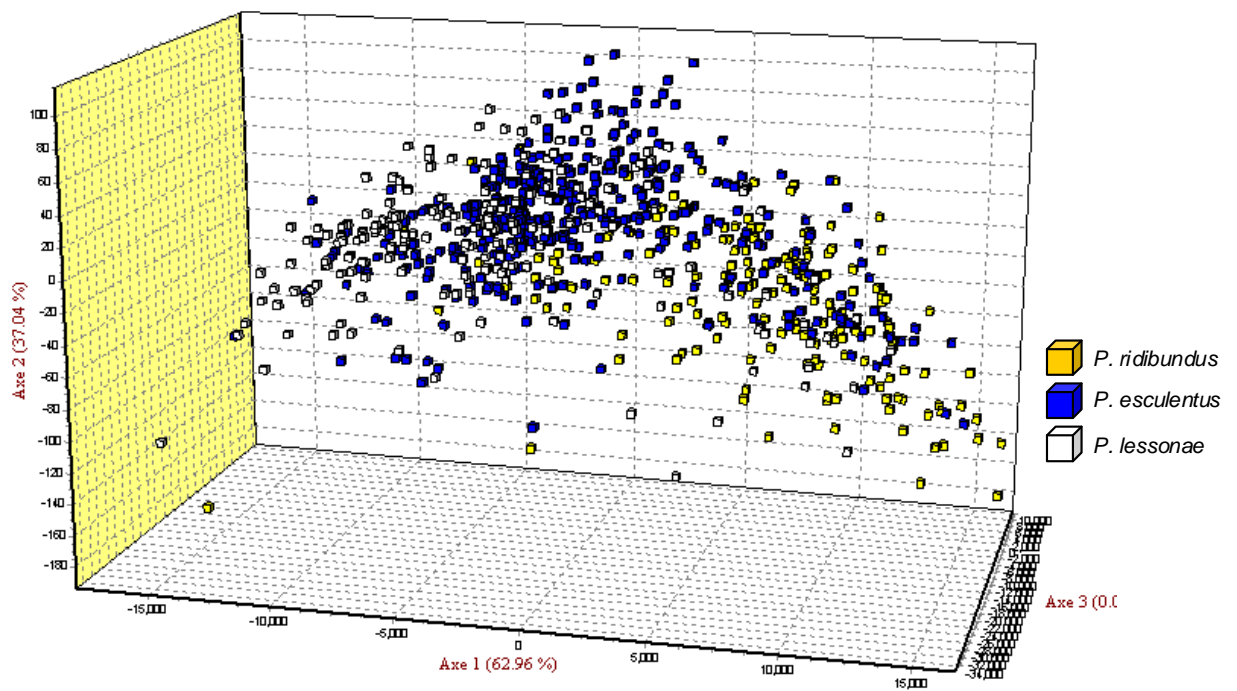


Figure 3.13 : AFC obtenue à partir de tous les échantillons

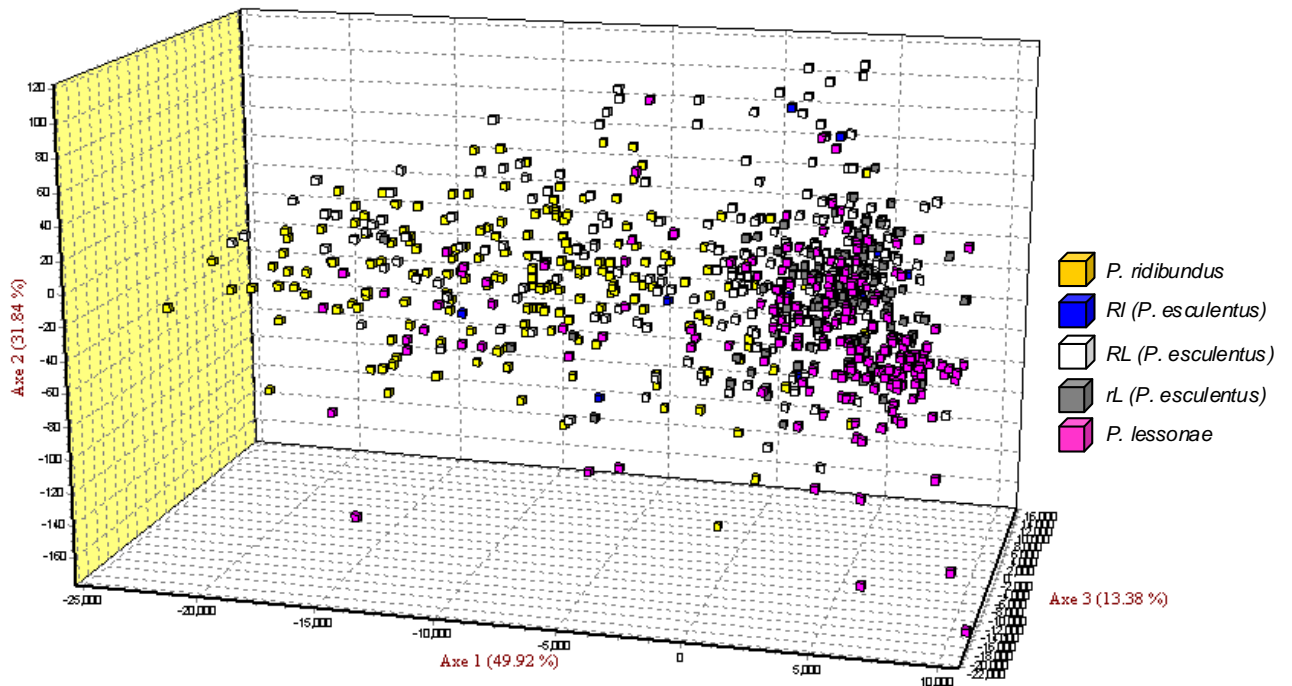


Figure 3.14: AFC obtenue à partir de l'ensemble des échantillons classés selon 5 modalités

3.2.3.3. Différenciation Bayésienne

Structure génétique de l'échantillonnage

Lors de l'analyse des 59 témoins dans un premier temps, puis de tous les échantillons, le nombre de cluster (groupe) le plus approprié calculé selon la méthode bayésienne et estimé selon la méthode d'Evanno a été de 1. En effet, les analyses avec le logiciel STRUCTURE, réalisées avec un *a priori* (en tenant compte de l'identification par ITS2), et sans *a priori*, n'ont révélé aucune structure génétique, et les simulations ont toutes conduit à $K=1$ (Figure 3.15a). En effet, selon la méthode d'Evanno et al. (2005), la valeur de K correspond au pic sur le graphique de ΔK en fonction de K , à une échelle de 100. Or, ici, même à une échelle plus petite (30), aucune valeur de K n'est discriminante. Les mêmes analyses ont été menées en utilisant seulement les deux microsatellites ayant le mieux amplifié, Rrid059A et RICA1b5, et nous avons obtenu le même résultat, $K=1$ (Figure 3.15b). Nous avons aussi analysé séparément les échantillons prélevés dans les Ardennes et ceux venant du Maine-et-Loire, puis uniquement les échantillons appartenant aux deux espèces parentales, et enfin, nous avons sélectionné un échantillonnage homogène de 200 individus par taxa afin de vérifier que nos résultats ne soient pas dus à des raisons statistiques, et nous n'observons toujours aucune

structure. Ces résultats signifient que selon la méthode bayésienne, il est impossible de différencier génétiquement les 2 espèces parentales et les hybrides grâce aux microsatellites choisis.

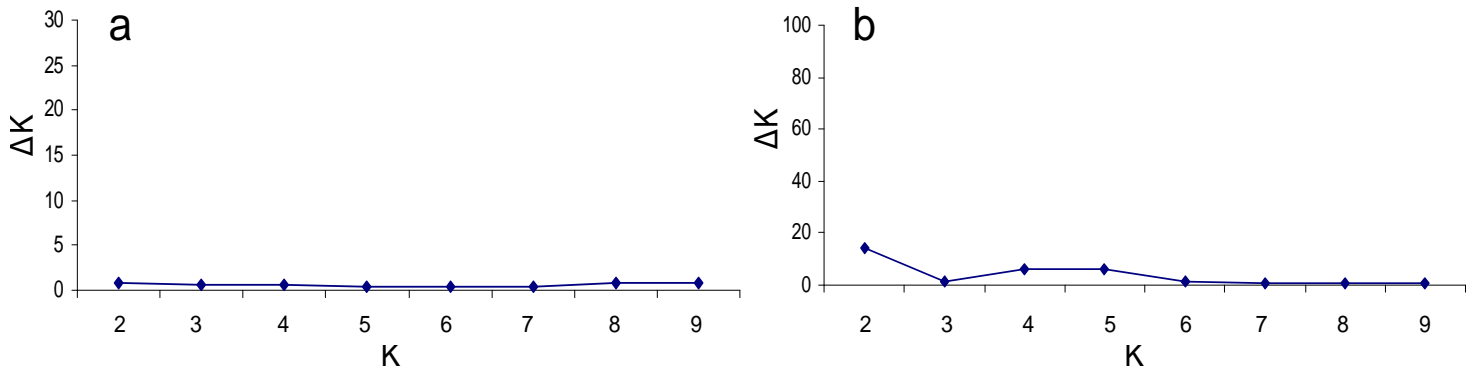


Figure 3.15 : Résultats de la méthode d'assignation par clustering selon la méthode d'Evanno et al. 2005). a : résultat de l'analyse des échantillons témoins, b) résultat de l'analyse de tous les échantillons.

Affiliation lorsque $K=2$

Bien que selon la méthode d'Evanno pour l'estimation de K , notre échantillonnage n'est constitué que d'un seul groupe, nous avons observé le pourcentage d'affiliation lorsque $K=2$, car c'est le résultat auquel nous nous attendions. En effet, ce résultat observé par Holsbeek et al. (2009) signifie que l'échantillonnage serait composé de 2 groupes, de 2 types d'ADN différents, l'un correspondant à l'espèce parentale *P. lessonae*, et l'autre à *P. ridibundus*. On retrouverait alors 3 catégories, les *P. lessonae* (regroupant les individus portant au moins 90% d'ADN *P. lessonae*), les *P. ridibundus* (regroupant ceux portant au moins 90% d'ADN *P. ridibundus*), et les hybrides (ceux portant les deux type d'ADN).

Parmi les témoins, l'affiliation aux deux espèces parentales a été réalisée avec succès par le logiciel STRUCTURE (Figure 3.16), avec un pourcentage de correspondance entre l'identification par ITS2 et celle selon les microsatellites de 100% pour les *P. ridibundus* (Tableau 3.7), et de 90% pour les *P. lessonae*. En revanche, la correspondance est très mauvaise pour les *P. esculentus*, car le logiciel a beaucoup de mal à les classer en tant qu'hybrides (22%), et les identifie plutôt majoritairement en tant que *P. lessonae* (45%).

Parmi tous les échantillons, on observe un pourcentage de correspondance de 72% pour les *P. ridibundus* et de 81% pour les *P. lessonae* (Figure 3.17 et Tableau 3.7). La correspondance pour les hybrides n'est que de 12% (Tableau 3.7), ces derniers étant identifiés par les microsatellites comme des *P. lessonae* à 73,9%. Lorsque nous analysons les échantillons

identifiés par ITS2 classés selon 5 modalités (dont 3 hybrides différents), on constate que parmi les 12 individus hybrides classés RI, seul 16% ont été identifiés pas les microsattellites comme *P. ridibundus*, et 75% comme *P. lessonae*. Parmi les 162 individus rL, 4% ont été identifiés comme *P. ridibundus*, et 90% identifiés comme *P. lessonae*.

Tableau 3.7 : Comparaison entre l'identification par ITS2 et celle grâce aux microsattellites lorsque K=2. Le pourcentage de correspondance est la comparaison uniquement entre l'identification selon les microsattellites et celle « à priori » déterminée selon ITS2

	Identification par ITS2	Effectif	Identification Microsattellites	Effectif	Pourcentage de correspondance
	Témoins	RR	17	RR	17
RL		22	RR	7	22.73
			RL	5	
LL	20	LL	10	90.00	
		RR	1		
		RL	1		
Echantillons	RR	207	LL	18	72.95
			RR	151	
			RL	19	
	RL	553	LL	37	12.30
			RR	76	
			RL	68	
LL	206	LL	409	81.55	
		RR	27		
		RL	11		
Echantillons (5 modalités)	RR	207	LL	168	72.95
			RR	151	
			RL	19	
	RI	12	LL	37	8.33
			RR	2	
			RL	1	
	RL	379	LL	9	15.30
			RR	67	
			RL	58	
	rL	162	LL	254	5.56
RR			7		
RL			9		
LL	206	LL	146	81.55	
		RR	27		
		RL	11		
			LL	168	

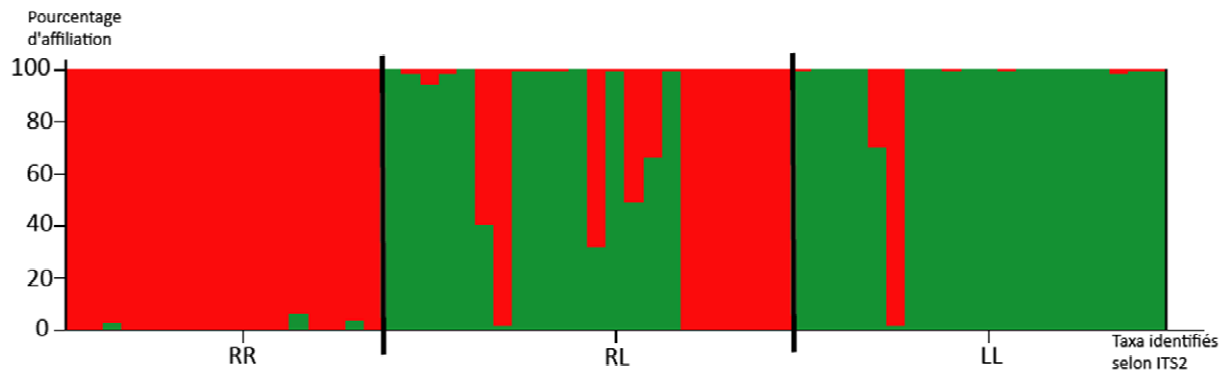


Figure 3.16 : Structuration des échantillons témoins implémenté par STRUCTURE 2.2 où $K=2$. Les individus sont classés selon leur identification génétique sur l'axe des abscisses (RR : *P. ridibundus*, RL : *P. esculentus*, LL : *P. lessonae*). Chaque individu est une ligne verticale, de couleur différente en fonction du groupe (ici de l'espèce parentale). La couleur verte est caractéristique de l'ADN de l'espèce *P. lessonae*, la rouge de l'espèce *P. ridibundus*, et les individus représentés par une ligne de 2 couleurs à la fois sont des hybrides *P. kl. esculentus*.

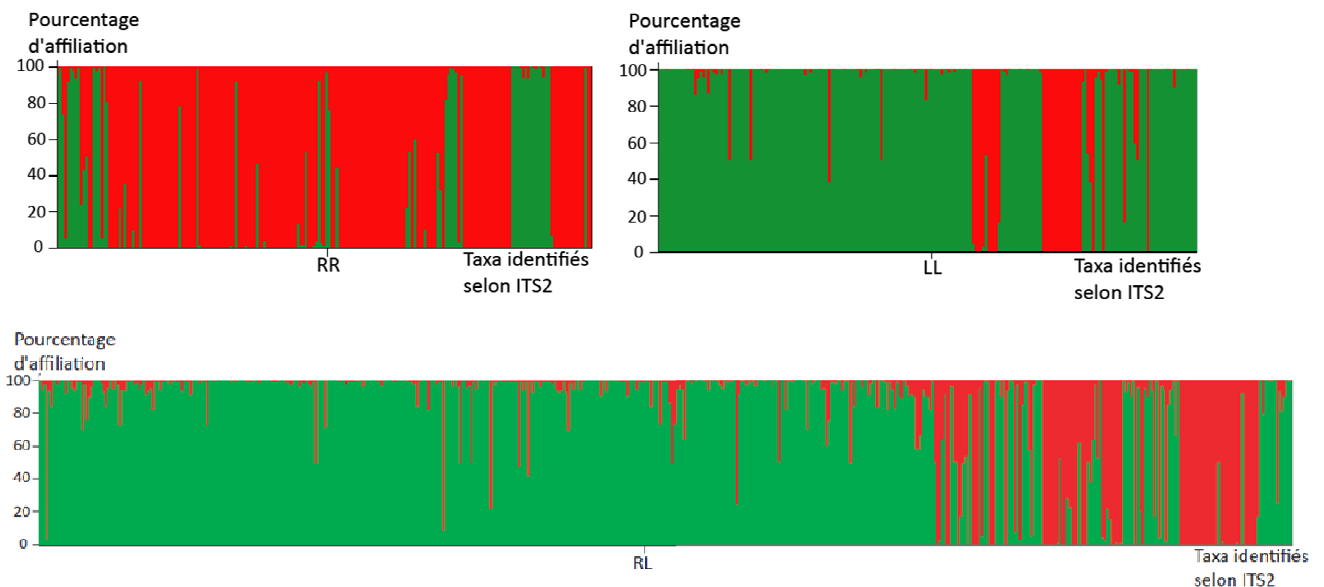


Figure 3.17 : Structuration des 975 échantillons implémenté par STRUCTURE 2.2 où $K=2$.

3.2.4. Discussion

L'identification taxonomique à l'aide de marqueurs moléculaires est la méthode la plus efficace et robuste, à condition d'utiliser un nombre suffisant de marqueurs diagnostics (Boecklen, Howard, 1997). De nombreuses études ont développé des outils d'identification taxonomique en utilisant divers marqueurs génétiques tels que les allozymes (Hotz, 1983),

les marqueurs mitochondriaux (Wagner *et al.*, 2006), les microsatellites (Johanet *et al.*, 2009) et le séquençage. En outre, dans un contexte de déclin mondial des amphibiens (Cushman, 2006; Houlihan *et al.*, 2000; Stuart *et al.*, 2004), il est important de développer et d'utiliser de nouvelles méthodes le moins invasive possible, ne nécessitant par exemple qu'un simple prélèvement salivaire. C'est dans ce cadre que j'ai testé les marqueurs microsatellites comme outils d'affiliation taxonomique chez les grenouilles vertes du complexe *P. esculentus*. Ces marqueurs étant localisés dans le noyau, permettent la détection d'informations comme l'hybridation et l'introgession génétique, connues comme étant fréquentes chez ces grenouilles vertes. Des microsatellites ont été développés pour les grenouilles vertes (Garner *et al.*, 2000; Hotz *et al.*, 2000; Zeisset, Beebee, 2000), et une étude a utilisé les plus polymorphes pour des identifications taxonomiques (Holbeek *et al.* 2009). Un autre avantage des marqueurs nucléaires polymorphes est qu'ils sont particulièrement sensibles à la détection d'espèces ayant divergé récemment, et à celle de lignées spécifiques au sein d'une espèce. Or, le succès évolutif des hybrides *P. kl. esculentus* s'expliquerait par la présence de différentes lignées hybrides (théorie du GPG-FNV) dont les exigences écologiques varieraient (Pagano *et al.*, 2008; Vrijenhoek, 1984). L'utilisation de cette méthode d'identification avait pour but à la fois de distinguer les 2 espèces parentales et les hybrides, mais aussi de détecter d'éventuelles lignées différentes au sein des hybrides.

Malheureusement, au vu des résultats, nous ne sommes pas en mesure d'aboutir à des identifications taxonomiques. Les analyses ne sont basées que sur 5 marqueurs microsatellites, ce qui peut être insuffisant pour une discrimination efficace. Toutefois, d'autres auteurs aboutissent à une identification taxonomique avec moins de marqueurs (Holsbeek *et al.* 2009). Or, mes résultats montrent qu'aucun marqueur n'est diagnostic, c'est-à-dire spécifique d'une des deux espèces parentales. Ceci semble contraire aux informations disponible sur GenBank, mais n'est pas surprenant, car 1) les publications décrivant des allèles spécifiques portaient sur de petits échantillons (Tableau 3.8), 2) ces publications portaient sur des échantillons provenant essentiellement d'Europe centrale et 3) une seule étude populationnelle avec des échantillons importants, contemporaine de mes travaux a mis en évidence de manière similaire que les allèles dits spécifiques ne le sont pas tant que cela Holsbeek *et al.* (2009). En revanche, cette même étude avait noté la présence de plusieurs allèles spécifiques au sein de chaque marqueur, rendant possible l'identification taxonomique, ce qui n'est pas notre cas.

Lors de l'analyse des témoins selon la méthode mendelienne (GENETIX), nous distinguons clairement 3 groupes, contrairement à l'analyse selon la méthode bayésienne, ce qui n'est en revanche pas le cas lors de l'analyse de tous les échantillons, où aucune des deux méthodes ne détecte de groupe différent. Ces différences de résultats observées entre les 2 méthodes sont dues à des modes de calculs statistiques divergents. La méthode Mendelienne est une approche fréquentielle (classique) qui compare les données réelles à des données théoriques, afin d'estimer le maximum de vraisemblance. La méthode Bayésienne est une approche rigoureuse car elle combine différentes sources d'information afin d'élaborer une solution analytique complexe, basée sur une modélisation des connaissances à priori. C'est donc une approche qui tient compte du passé en plus du maximum de vraisemblance (Breton *et al.*, 2008).

Suite à l'analyse selon la méthode bayésienne, nous nous attendions à observer le même type de résultats que l'étude menée par Holsbeek *et al.* (2009), avec deux « groupes d'ADN » différents (K=2), l'un appartenant à l'espèce parentale *P. lessonae*, et l'autre à l'espèce *P. ridibundus*. Ainsi, notre échantillonnage aurait été composé de 3 catégories, les 2 espèces parentales, et les hybrides portant les deux types d'ADN (Figure 3.18 d'après Holsbeek *et al.* 2009). Or, selon la méthode de sélection de K d'Evanno, le nombre de groupe est 1, et non 2. Ensuite, lorsque par curiosité on observe les résultats du modèle pour lequel il y a 2 groupes d'ADN, on s'aperçoit que les deux espèces parentales sont relativement bien distinguées, mais que le problème majeur est l'affiliation des hybrides, qui sont la plupart du temps classés par erreur parmi les *P. lessonae*. Lors de l'analyse des résultats en classant a priori les échantillons selon 5 catégories (RR, Rl, RL, rL, et LL, cf chapitre ITS2 p...), les hybrides de la catégorie Rl sont majoritairement identifiés *P. lessonae*, alors qu'on s'attendrait plutôt à ce qu'ils soient plus proches de l'espèce parentale *P. ridibundus*. Ceux de la catégorie rL en revanche sont bien classés en grand nombre en tant que *P. lessonae*. Néanmoins, le faible nombre d'individus classés Rl ne nous permet pas de conclure quant à une tendance quelconque. En outre, puisque statistiquement le logiciel STRUCTURE ne considère pas que ce modèle où K=2 est le plus vraisemblable, nous devons nous contenter de l'absence de toute structure génétique parmi nos 975 échantillons.

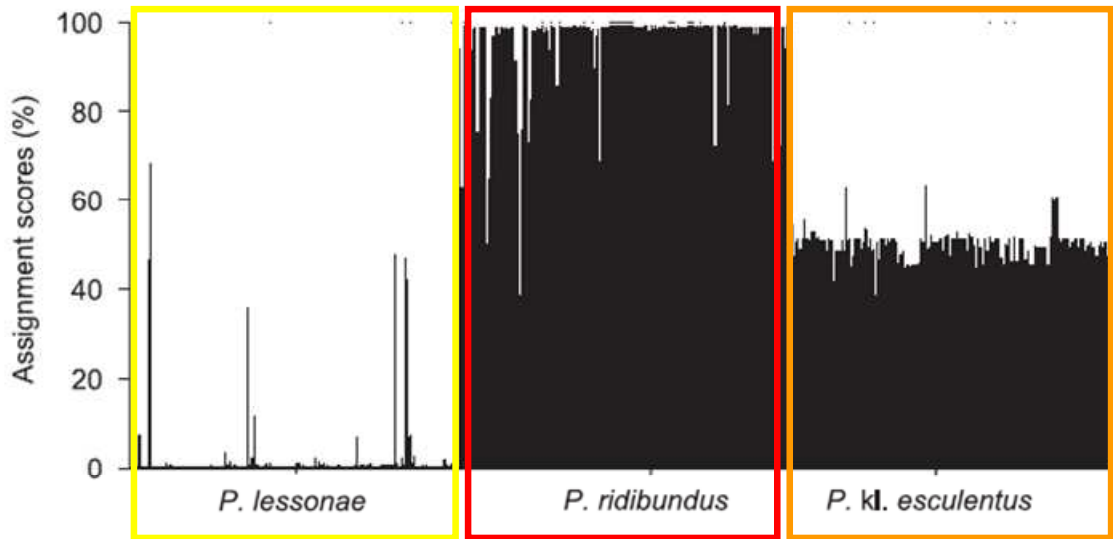


Figure 3.18 : Structuration des échantillons belges implémentée par STRUCTURE 2.2 issue de la publication de Holsbeek et al. (2009) où $K=2$. Les individus sont classés selon leur identification morphologique sur l'axe des abscisses. Chaque individu est une ligne verticale, de couleur différente en fonction du groupe (ici de l'espèce parentale). La couleur blanche est caractéristique de l'ADN de l'espèce *P. lessonae*, la noire de l'espèce *P. ridibundus*, et les individus représentés par une ligne de 2 couleurs à la fois sont des hybrides *P. kl. esculentus*.

L'échec de l'identification taxonomique de notre échantillonnage peut être du à des problèmes méthodologiques, tels que de mauvaises amplifications, lectures de pics, etc... Néanmoins, les résultats obtenus pour les témoins lors de la différenciation mendélienne nous laissent penser que d'autres causes semblent plus probables.

Tout d'abord, les logiciels GENETIX et STRUCTURE ne sont pas adaptés aux cas d'hybridation. Une étude comparative de différents logiciels (NewHybrids, Baps, STRUCTURE et GeneClass) a montré que STRUCTURE est le meilleur logiciel existant pour le moment pour l'analyse de données génétiques de complexes hybrides, néanmoins, il n'a pas été conçu pour, ce qui pourrait expliquer la difficulté à trouver une structure génétique au sein de notre échantillonnage. De plus, nous sommes dans le cas d'hybridation particulière, celle d'un complexe hybridogénétique, ce qui complique les calculs.

De plus, il est important de noter la présence de nombreuses grenouilles vertes d'origine allochtone en France, notamment dans notre zone d'étude. Notre échantillonnage compte très probablement des individus originaires des Balkans, d'Anatolie et d'Égypte (Arano *et al.*, 1995; Neveu, 2004; Pagano *et al.*, 2001a; Pagano *et al.*, 2003; Vorburger, Reyer, 2003). Ceux-ci ne pouvant être détectés clairement par les marqueurs moléculaires sont confondus avec les *P. ridibundus*, et font donc partie du « groupe *ridibundus* » (*ridibundus*-like water frog species) (Ohst, 2008). Ainsi, ces grenouilles d'origine exotique possèdent un patrimoine

génétique légèrement différent de celui des *P. ridibundus* natives. En les intégrant de fait au groupe *ridibundus sensu* Ohst cela contribue probablement à une sur-estimation de la variabilité génétique des *ridibundus sensu stricto* et à l'éparpillement observé sur la carte factorielle de l'AFC. Or, les marqueurs microsatellites mis au point par les différentes équipes ont toujours été développés à partir d'échantillons de grenouilles vertes en provenant des mêmes collections (celle de Graf & Pelaz, de Garner), et de pays plus à l'Est (Tableau 3.8), zones dans lesquelles le statut et la taxonomie des *P. ridibundus* sont bien plus clairs (Plötner, 2005). Nous pouvons donc supposer que les marqueurs microsatellites choisis, développés pour les grenouilles vertes natives du complexe *P. esculentus*, ne seraient pas adaptés au cas des grenouilles vertes « françaises », mélange de grenouilles natives et exotiques.

Enfin, dans un contexte d'introduction récente de grenouilles exotiques du groupe *ridibundus sensu largo* (les naturalistes wallons ont en effet observé la forte progression des grenouilles rieuses, vendues dans les étangs depuis une poignée d'années ; Chritiane Percsy, com pers., Holsbeek 2010), Holsbeek a mis en évidence une introgression importante. Or, la présence de ces grenouilles allochtones en France a été répertoriée depuis de nombreuses années (Ljubisavljevic *et al.*, 2003; Neveu, 2004), et les introductions sont probablement nombreuses et répétées depuis au moins 50 ans. L'explication la plus probable à ces problèmes d'identification en France est que l'introgression est généralisée parmi les grenouilles natives et exotiques et brouille le signal génétique dans des proportions plus importantes que là où les introductions sont les plus récentes. Ceci expliquerait pourquoi l'étude d'Holsbeek *et al.* (2009) menée sur des échantillons belges venant d'une petite zone géographique a permis une identification taxonomique claire contrairement à nos analyses sur des échantillons venant de toute la moitié Nord de la France.

Le cas des hybrides est tout aussi particulier. Puisque des grenouilles du groupe *ridibundus* sont originaires de différents pays, on retrouve des hybrides portant différents « type » de génome R, rendant plus difficile l'identification moléculaire. De plus, plusieurs études ont observés des cas d'hybridogénèse imparfaite, et dite « permissive » chez ces hybrides, permettant des échanges et transferts de fragments d'ADN d'un génome parental à l'autre (Mezhzherin, Morozov-Leonov, 1997; Ohst, 2008; Pagano, Schmeller, 1999). Ces introgressions génétiques peuvent alors brouiller les pistes. L'hybridogénèse imparfaite peut aussi conduire à la production de gamètes diploïdes (Berger *et al.*, 1986), aboutissant à des descendants triploïdes (Plötner *et al.*, 2008; Tunner, 1979; Vorburger, 2001b). Or, le logiciel GeneMapper ne permet pas la détection les individus triploïdes, surtout lorsqu'ils sont

homozygotes pour le génome porté en double. Par exemple, un individu RRL peut porter le même allèle sur le génome R, et un autre sur le génome L. Ainsi, lors de la phase de lecture, seuls 2 pics seront visibles, un pour l'allèle porté par les deux R, et l'autre pour l'allèle porté par L. Bien que ces individus soient identifiés comme hybrides, ils sont classés comme diploïdes par erreur, ce qui est une perte d'information.

Tableau 3.8: Origine des échantillons utilisés par les différentes équipes ayant développés et utilisés les microsatellites chez les grenouilles vertes Européennes.

Auteurs	Code biblio	Année	Taxa testés	N	Origine des échantillons
Garner et al.	1	2000	<i>P. lessonae</i> <i>P. esculentus</i>	25	Royaume Uni
Zeisset et al.	2	2000	<i>P. esculentus</i>	-	Collection de Graf & Polls-Pelaz (Est)
Primmer	3	2002		-	Collection de Garner (RU)
Zeisset et al.	4	2003	<i>P. ridibundus</i>	40 36	Royaume Uni Hongrie
Christiansen et al.	5	2005	<i>P. lessonae</i> <i>P. lessonae</i> <i>P. esculentus</i>	191	Estonie Pologne Danemark
Hotz et al.	6	2001	<i>P. ridibundus</i> <i>P. lessonae</i> <i>P. esculentus</i>	-	Pologne
Holsbeek et al.	7	2009	<i>P. ridibundus</i> <i>P. lessonae</i> <i>P. esculentus</i> <i>P. bedriagae</i>	510	Belgique

3.2.5. Conclusion

Contrairement à ce qu'on aurait pu imaginer à la lecture de la bibliographie, l'identification taxonomique grâce aux marqueurs microsatellites se révèle extrêmement compliquée, à tout le moins dans un contexte d'introductions multiples qui semble déboucher sur des processus d'introggression non moins importants. Non seulement aucune des deux espèces parentales n'a pu être détectée de manière robuste, mais surtout l'identification des hybrides est clairement inefficace et ne permet donc pas l'identification des différentes lignées hybrides. Cette étude révèle à quel point le cas des grenouilles vertes en France est complexe, y compris au niveau moléculaire. Ce groupe est composé de plusieurs espèces différentes se reproduisant toutes entre elles, et donnant des hybridogènes possédant un

patrimoine génétique composé d'une mosaïque d'ADN de plusieurs espèces. Par conséquent, les marqueurs microsatellites que nous avons utilisés, bien que les plus testés et les plus polymorphes, ne sont pas adaptés à l'identification taxonomique des grenouilles vertes localisées en France.

Conclusion

La systématique des grenouilles vertes du genre *Pelophylax* reste assez difficile à clarifier. A l'ère de la génétique, face aux difficultés d'identification taxonomique via les critères bioacoustiques et morphologiques, les chercheurs se sont tout naturellement tourné vers la recherche de marqueurs moléculaires spécifiques de chacune des espèces. Plusieurs types de marqueurs ont alors été développés, puis testés sur des échantillons venant de l'Europe entière. Au fil des analyses, on s'aperçoit que la situation taxonomique est relativement complexe, notamment chez ce qu'on appelle désormais le « groupe *ridibundus* », composé finalement de plusieurs conspécifiques. Par conséquent, la situation est tout aussi ambiguë chez les hybrides, puisque ayant des ancêtres du « groupe *ridibundus* » pouvant être d'espèces différentes. Il n'y aurait peut être donc pas un seul hybride au sein du complexe *P. esculentus*, mais plusieurs, portant des génomes R de différentes espèces du groupe *ridibundus*. En outre, le mode de reproduction hybridogénétique n'est peut être pas le mode de reproduction systématique de toutes les lignées hybrides.

Grâce à toutes ces analyses moléculaires, on découvre de nouvelles situations faisant évoluer régulièrement la systématique de ce genre taxonomique, et nous amenant à nous questionner sur le concept « d'espèce » chez ces grenouilles vertes.

Chapitre 4

Sexuality vs clonality: preliminary results of larval performance of *P. perezii*, *P. kl. grafi* and *P. ridibundus* (Ranidae, Pelophylax).

Les hybrides unisexués combinent à la fois vigueur et accumulation d'allèles délétères. Alors que, parmi les grenouilles vertes, le complexe *P. esculentus* fait l'objet de nombreux articles scientifiques, le complexe *P. grafi* n'est que peu étudié. Ayant un mode de reproduction analogue au premier complexe, on peut se demander si les hybrides *P. kl. grafi* présentent les mêmes caractéristiques. Dans un second temps, mon attention s'est portée sur l'effet des génomes portant un lourd fardeau génétique sur la fitness des grenouilles. Ainsi, un individu ayant un de ces génomes transmis clonalement a-t-il les mêmes performances que ceux possédant deux génomes issus de reproduction sexuelle ? Nous avons donc réalisé un élevage expérimental afin de comparer les performances larvaires de différents croisements. Ce chapitre a fait l'objet d'une soumission à *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*.

Sexuality vs clonality: preliminary results of larval performance of *P. perezii*, *P. kl. grafi* and *P. ridibundus* (Ranidae, Pelophylax).

Cécile Patrelle^{1,2,3*}, Stéphane Sourice¹, and Alain Pagano¹

¹ LEESA, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France ;

² 2C2A-CERFE, 5 rue de la Héronnière, F-08240 Boulton-aux-Bois, France;

³ UMR PaVé, INRA, 42 rue Georges Morel, Beaucouzé, France.

E-mail addresses of authors:

* Corresponding authors : Cécile Patrelle : cecile.patrelle@gmail.fr; 2C2A-CERFE, 5 rue de la Héronnière, F-08240 Boulton-aux-Bois, France, Tel: +33 2 41 73 54 37, fax : +33 2 41 73 53 52;

Alain Pagano: alain.pagano@univ-angers.fr; LEESA, GECCO, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France, Tel: +33 2 41 73 50 82; fax : +33 2 41 73 53 52

Stéphane Sourice : stephane.sourice@univ-angers.fr ; LEESA, GECCO, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France, Tel : +33 2 41 73 54 10, fax : +33 2 41 73 53 52

Running title : Sexuality vs Clonality in water frogs

ABSTRACT

Asexual hybrids may combine heterosis and accumulation of deleterious mutations. This contrasting advantages and disadvantages question the fate of these lineages. As waterfrogs constitute hybridogenetic complexes where hemiclinal hybrids occur, we aim to compare the performances of distinct tadpole lineages (hybrid or non hybrid but bearing a clonal genome). In a first step, we compared the fitness-related larval life-history traits (survival and growth rates, time to metamorphosis and mass at metamorphosis) evidencing an intermediate performance of hybridogenetic tadpoles *P. kl. grafi* in comparison with the parental species.

In a second step, we compared the performances of *P. ridibundus* tadpoles with different genomes: either containing 100% sexual genomes or 50%. No strong differences were observed among lineages suggesting few effect of mutation accumulation except for the RRg lineage that exhibited a bad performance, may be due to a more ancient clonal history. Our data suggest that *P. ridibundus* tadpoles are more competitive than other southern water frog, and represent a risk for the diversity of indigenous water frog assemblages in France and Spain.

Key words: Hybrid fitness, clonal genome, larval performance, hybridogens, *P. grafi* complex, *P. ridibundus*.

4.1. Introduction

Hybridization is receiving renewed attention as hybrid zones are known to be places where important evolutionary events occur (Anholt *et al.*, 2005; Barton, Hewitt, 1985). Defined as interbreeding between differentiated lineages or taxa, interspecific hybridization events occur in almost all sexually reproducing groups of organisms (Mallet, 2005), and are regular and probably important in nature (Seehausen, 2004). Long-term consequences of hybridization depends on the genetic basis of hybrid fitness, include fusion of previously distinct lineages, extinction of one or both lineages, evolution of reproductive isolation via reinforcement, and production of novel, highly fit hybrid phenotypes (Lippman, Zamir, 2007). This hybrid vigour is due to the heterosis effect (because of higher heterozygotie rate), which confers advantages to increased genetic diversity (Moore, 1977; Tunner, Nopp, 1979), and can permit hybrid lineages to colonize new niches or allow speciation through parallel selection pressures and divergent natural selection (Fitzpatrick, Bradley Shaffer, 2007; Gross, Rieseberg, 2005; Parris *et al.*, 1999; Rhode, Cruzan, 2005; Rieseberg *et al.*, 2003; Robbins *et al.*, 2010). Thus, natural hybridization event is an admixture which can create new phenotypes allowing a great phenotypic plasticity and facilitates adaptive evolution in modified or degraded habitats (Johansen-Morris, Latta, 2008; Rieseberg *et al.*, 2003). In a context of Amphibians worldwide decline, du to habitat loss and fragmentation, climate change, emerging diseases, environmental contaminants, introduction of alien species (Beebee, Griffiths, 2005; Blaustein *et al.*, 1994; Cushman, 2006; Ficetola, De Bernardi, 2004; Houlihan *et al.*, 2000; Stuart *et al.*, 2004), the ability of one genotype to express alternative phenotypes to match with current environment is crucial to persist.

Among hybridization events, unisexual hybrids constitute a peculiar case. These hybrid lineages are resulting from crosses between differentiated bisexual species, and stabilising through a clonal (parthenogenesis, gynogenesis) or hemiclonal (hybridogenesis) reproductive mode (Vrijenhoek, 1993). They are generally thought to be evolutionary ‘dead-ends’ (Maynard Smith, 1978; Simon *et al.*, 2003), but the persistence of stable unisexual lineages in numerous independent taxa, sometimes ancient, contradicts this generality (Judson, Normack, 1996). As an example, stable unisexual hybridogenetic/bisexual complexes have been observed in fishes (Poeciilidae and Cyprinidae), insect (Phasmatoda and Chironomidae, and amphibians (Ranidae) (Berger, 1973; Collares-Pereira *et al.*, 1999; Schultz, 1969; Tinti *et al.*, 1995). In these hybridogenetic complexes, gametogenesis is characterized by distortion prior to meiosis leading to genome exclusion of one parental species in the hybrid germ line, and by the production of clonal gametes which only contain the genome from the other parental species without recombination (Schultz 1969). The hybridogen generally reproduce, as a sexual parasite, with the parental species from which the genome is discarded, for maintaining at each generation its lineage (Beukeboom, Vrijenhoek, 1998; Graf, Polls Pelaz, 1989; Holsbeek *et al.*, 2008). Mating between hybrids produce non-hybrid offspring possessing two hemiclonal genomes, and often die at an early larval stage, because they express recessive deleterious mutations (Binkert *et al.*, 1982; Guex *et al.*, 2002; Semlitsch, Reyer, 1992).

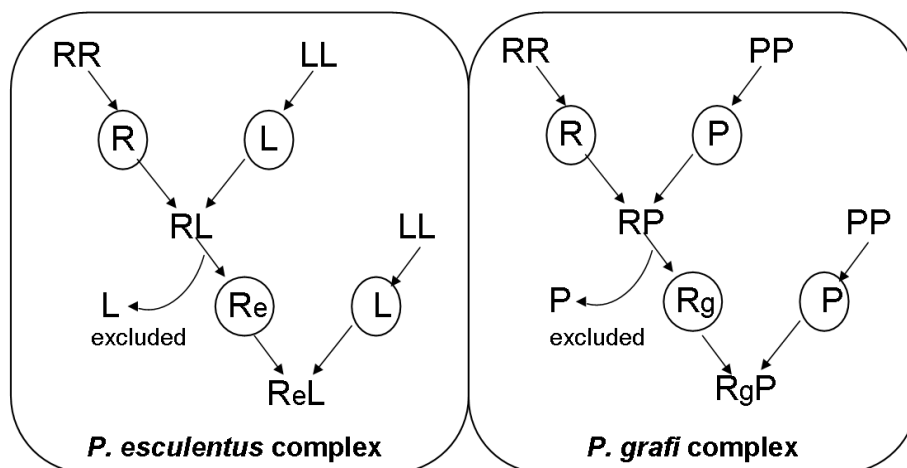


Figure 1: *P. esculentus* and *P. grafi* hybridization complexes. Germ cells are encircled. L: genome of *P. lessonae*; R: genome of *P. ridibundus*; P: genome of *P. perezi*; Re: genome *ridibundus* transmitted by a hybridogen *P. kl. esculentus*; Rg: genome *ridibundus* transmitted by a hybridogen *P. kl. grafi*.

European water frogs (Amphibia: Ranidae) are characterized by several hybridogenetic complexes (Graf, Polls Pelaz, 1989). The most widespread and abundant complex occurs in Central and Eastern Europe, and involve the parental species *P. ridibundus* (genome RR) Pallas, 1771, *P. lessonae* (genome LL) Camerano, 1882, and the hybridogen *P. kl. esculentus* (genome RL) Linnaeus, 1758. These hybrids are characterized by a hybridogenetic reproduction mode (Schultz, 1969): the genome of *P. lessonae* is eliminated from the germline prior to meiosis, and the genome of the other parental species, *P. ridibundus*, is clonally transmitted through gametes to the next hybrid generation (in this paper we will name it Re i.e. clonal *ridibundus* genome beared and transmitted by *esculentus* hybridogens). Indeed, the hybridogens usually coexist with *P. lessonae*, the sexual parental host species, on which depends the restoration of hybrid lineages (named L-E system, Figure 1) (Uzzell, Berger, 1975). Another hybridogenetic complex occurs in Southern France and Northern Spain (Daf *et al.*, 2006; Graf *et al.*, 1977; Graf, Polls Pelaz, 1989; Pagano *et al.*, 2001c). In the P-G system, analogous to the L-E system, *P.kl. grafi* (genome RP) is the hybrid between *P. perezi* Seoane, 1885 (genome PP), and *P. ridibundus* (Figure 1). Hybridogenetic lineages produce only haploid gametes with *ridibundus* genome (named Rg i.e. clonal *ridibundus* genome beared and transmitted by *grafi* hybridogens), and restore at each generation through matings with *P. perezi* (Graf, Polls Pelaz, 1989). Astonishingly a lot of studies were made on the L-E system and *P. kl. esculentus*, but few on the P-G system (Patrelle, 2010), and its hybridogenetic features (hybrid persisting lineages, good fitness of hybridogens). To our knowledge, *P. kl. grafi* was never compared to its parental species *P. perezi* and *P. ridibundus* regarding fitness related traits. Thus, it seems to be interesting to focus on this poorly studied P-G system to check if *P. kl. grafi* are exhibiting a better fitness in regard to parental species such as evidenced in the other hybridogen *P. kl. esculentus* (heterosis effect, Hotz *et al.* 1999). Because of their clonality, the *ridibundus* genome beared and transmitted by the hybridogens *P. kl. esculentus* and *P. kl. grafi* may have an accumulation of deleterious mutations due to their long history of clonal inheritance, through Muller's Ratchet (Archetti, 2005; Graf J.-D., P., 1979; Guex *et al.*, 2002; Vorburger C., 2001a). Therefore, matings between hybridogens (of the same taxa) generally produce unviable *P. ridibundus* offspring, especially when hybrid lineages are old (Binkert *et al.*, 1982; Semlitsch, Reyer, 1992), which reflects homozygosity for recessive deleterious alleles at particular loci (Guex *et al.*, 2002). However, it is not systematic and hybrid crosses could produce viable *P. ridibundus* offspring, because their clonal genomes are unlikely to share recessive deleterious alleles at the same set of loci

(Vorburger, 2001b). Such events can naturally happen because, in natural populations, diverse assemblages of waterfrog taxa may occur (Daf *et al.*, 2006; Holsbeek, Jooris, 2009; Pagano *et al.*, 2001a; Pagano *et al.*, 1997). Hybridogens can constitute “pure” populations (Christiansen *et al.*, 2005; Graf, Polls Pelaz, 1989; Günther *et al.*, 1979) where such matings between hybridogens occur frequently. Surprisingly, the fitness of these *P. ridibundus* neoformed was poorly observed, and it could be interesting to investigate their performances.

Thus, we compare larval life-history traits related to fitness among water frog tadpoles from different taxa or bearing different clones. We did it with a laboratory experiment in which tadpoles were reared under controlled environmental conditions, in order to. First, we test the hypothesis of spontaneous heterosis in *P.kl. grafi*, comparing larval performances in progeny of three crosses: the two parental species *P. perezi* and *P. ridibundus*, and hybrids *P. kl. grafi*. If hybrid tadpoles show a better fitness than those of parental species, the heterosis effect will be confirmed. If it is not the case, hybrids could present intermediate characteristics or be inferior parental species, and the hypothesis will be rejected. Second, we try to evaluate deleterious mutation load among *P. ridibundus* tadpoles getting different parental origins: i) a RR lineage “100% sexual” as both genomes originated from *P. ridibundus* parents, ii) a “50% clonal” lineage RRg with the hemiclone (Rg) transmitted by *P. kl. grafi*, iii) a “50% clonal” lineage RRe with the hemiclone (Re) transmitted by *P. kl. esculentus*. If severely handicapped by the deleterious mutations in clonal genomes, we should expect that some of these mutation will be expressed in the 50% clonal *ridibundus* offspring (either at the heterozygote level or at the homozygote one) and thus affect negatively the performances of the tadpoles.

4.2. Materials and Methods

FIELD AND EXPERIMENTAL PROCEDURE

Adults *Pelophylax perezi* and *P. kl. grafi* were collected in spring 2006 in two natural ponds near Ejea de los Cavalleros, Aragon Region, Spain, *P. ridibundus* and *P. kl. esculentus* in wetlands near Angers, France. Before experimental crosses, taxon of each sampled frog was determined from a toe using allozymes (LDH-B lactate dehydrogenase, PGM) (Hotz, 1983; Lodé, Pagano, 2000; Uzzell, Berger, 1975) and the RFLP method based on ITS2 only for northern frogs from Angers (Patrelle *et al.*, 2010). Five artificial fertilization were realized

follow standard procedures (Berger *et al.*, 1994; Semlitsch, 1993) (Table 1). All crosses were made on 20th of May, and eggs were incubated in the laboratory in dechlorinated and oxygenated tap water at 20 ± 1 °C. When tadpoles hatched and reached stage 25 (Gosner 1960; free-swimming), nine days after crosses, tadpoles were reared in tanks. This moment is considered as the beginning of the experiment for all the analysis (T0). Tadpoles were randomized and kept in large tanks filled with 40 L of aerated tap water, and carried out at room temperature. For each cross, tadpoles were placed in 4 tanks at a density of 0.175 individuals/ L (7 individuals/ tanks). The 140 tadpoles disposed in 20 tanks were feed with a mix of rabbit and fish food *ad libitum*, until the beginning of metamorphosis (developmental stage 42, Gosner 1960). The water quality (nitrate and nitrite levels, pH, and conductivity) was observed twice a week during all the experiment to maintain tadpoles in the same conditions. Tanks were also daily inspected for the removal of dead larvae.

Table 1: Crosses made with different taxa. Progeny with (RRe) and (RRg) genotypes are *P. ridibundus* with one *ridibundus* genome of sexual origin (one parental species *P. ridibundus*) and one from clonal origin (other parent: hybrid *P. kl. esculentus* or *P. kl. grafi*). Those with (RgP) are hybrids with a *ridibundus* genome from a hybrid *P. kl. grafi* and a perezi genome from *P. perezi*.

Code of crosses	Female type	Male type	Progeny	Clonality (%)
1	<i>P.perezi</i> (PP)	<i>P.perezi</i> (PP)	<i>P.perezi</i> (PP)	0
2	<i>P.perezi</i> (PP)	<i>P. kl. grafi</i> (RP)	<i>P. kl.grafi</i> (RgP)	50
3	<i>P. ridibundus</i> (RR)	<i>P. ridibundus</i> (RR)	<i>P. ridibundus</i> (RR)	0
4	<i>P. ridibundus</i> (RR)	<i>P. grafi</i> (RP)	<i>P. ridibundus</i> (RRg)	50
5	<i>P. ridibundus</i> (RR)	<i>P. kl.esculentus</i> (RL)	<i>P. ridibundus</i> (RRe)	50

MEASURES OF PERFORMANCE

Proportion of survivors reaching metamorphosis, time to metamorphosis, body mass at metamorphosis, and growth rate were used as surrogates of fitness to measure the effects of genotype (Hotz, Semlitsch, 2000; Hotz *et al.*, 1999). Metamorphosis was defined as emergence of at least one forelimb (stage 42; Gosner 1960). At metamorphosis, metamorphs were removed and weighted to the nearest 0.1 mg. The duration of larval period (time to metamorphosis) was calculated as the total days from the start of the experiment to metamorphosis (Hotz, Semlitsch, 2000; Hotz *et al.*, 1999), and proportion of survivors metamorphosing was calculated as the number of metamorphs divided by the total number of

tadpoles at T0. Growth rate for each metamorph was calculated as body mass divided by number of day to get to metamorphosis.

STATISTICAL ANALYSES

Individual values with no transformation were used as units for analysis. Four dependent variables were recorded for each individual; time to metamorphosis, mass at metamorphosis, survival and growth rate. As distribution of residuals is not normal (Kolmogorov-Smirnov test), non-parametric tests were used. To test hybrid heterosis or clonal *ridibundus* effects, we compared dependent variables of the crosses using the Kruskal Wallis test, and when significant differences were observed (indicated as $p < 0.05$), Mann-Whitney pairwise comparison (Bonferroni corrected) was used. For the proportion of survivors, the chi-square method of Pearson was performed. All statistical analysis were performed using R software.

4.3. Results

P. GRAFI COMPLEX FITNESS (PP, RgP, RR)

The overall survival rate for all experiments was 89.89%. Between the three crosses representing the *P. grafi* complex, there was no significant difference of survival rate (82.14% for tadpoles with (PP) and (RR) genotypes, and 92.86% for tadpoles with (RgP) genotype; χ^2 de Pearson test, $\chi^2 = 1.3576$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0.507$).

No significant difference were observed for time to metamorphosis among *P. grafi* complex crosses (Table 2, Figure 2).

We observed significant differences in mass at metamorphosis according to the three taxa of the complex (Table 2, Figure 2). Tadpoles with RR genotype were significantly bigger than those with RgP genotype (Mann-Whitney test, $U = 224$, $p = 0.018$) and PP genotypes ($U = 89$, $p = 2.14 \times 10^{-6}$). The latter one were the smallest, with a significant difference with tadpoles with RgP genotype ($U = 242$, $p = 0.043$).

Growth rate was also affected by taxa effect (Table 2, Figure 2), and as mass results, RR tadpole's genotype exhibited the greater rate. These tadpoles grow significantly faster than those with RgP genotype (Mann-Whitney test, $U = 225$, $p = 0.031$) and PP genotype ($U = 96$, $p = 3.85 \times 10^{-6}$). Tadpoles with PP genotype got the smallest rate, with a significant difference with RgP genotype's tadpoles ($U = 230$, $p = 0.024$).

Table 2: Results of Kruskal-Wallis test for *P. grafi* complex taxa effect of the three crosses tadpoles for mass at metamorphosis (Mass), time to metamorphosis (Time), and growth rate (Growth).

Variables	Tadpole genotypes	Mean	SD	χ^2	df	P
Mass (g)	PP	1.128	0.163	25.652	2	2.69×10^{-6}
	RgP	1.313	0.291			
	RR	1.489	0.249			
Time (days)	PP	60.643	3.369	2.352	2	0.308
	RgP	59.429	2.441			
	RR	60.607	4.049			
Growth (g/days)	PP	0.019	0.003	24.91	2	3.89×10^{-6}
	RgP	0.022	0.005			
	RR	0.025	0.004			

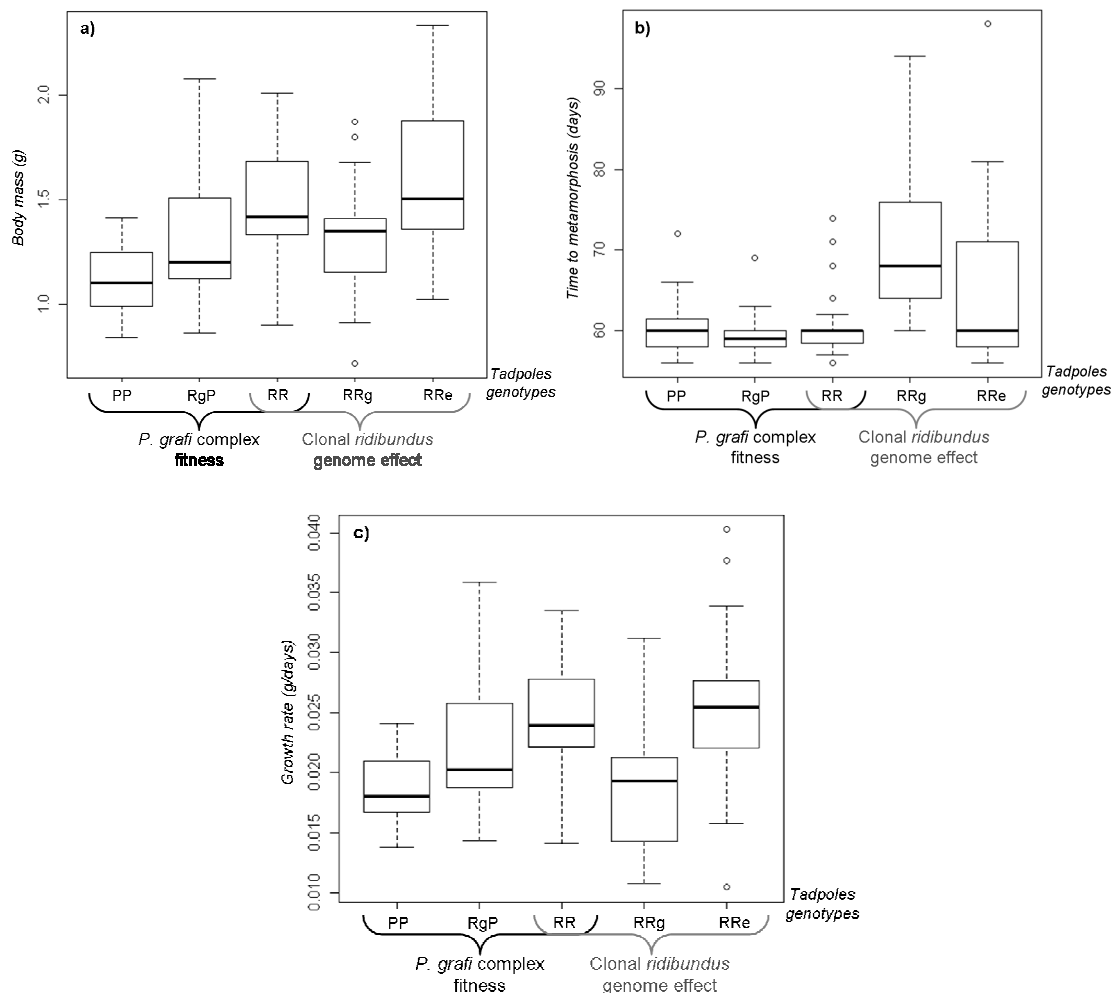


Figure 2: Body mass at metamorphosis (a), time to metamorphosis (b), and growth rate (c) for the five different crosses. Boxes define the interquartile range (IQR), horizontal lines represent the median, and whiskers indicate the maximum and minimum values within 1.5 times the IQR. Open circles denote outliers within 1.5 and 3 times the IQR.

CLONAL *RIDIBUNDUS* GENOME EFFECT (RR, RRg, RRe)

No significant difference of survival rate among the three crosses *P. ridibundus*. (82.14% for tadpoles with (RR), 100% for (RRg) genotypes, and 92.31% for (RRe) genotype; chi² de Pearson test, $\chi^2 = 1.324$, df = 2, p-value = 0.516).

Time to metamorphosis among *P. ridibundus* progeny were not significantly different (Table 3, Figure 2).

Mass at metamorphosis were significantly affected by clonal *ridibundus* genome effect (Table 3, Figure 2). Tadpoles with RRe genotypes were significantly bigger than those with RRg genotype (Mann-Whitney test, U= 165, p=0.013). There were no significant differences between tadpoles with RR and RRe genotypes (U= 303, p>0.9), nor between those with RR and RRg genotypes (U= 228, p=0.091).

Growth rate was also affected by clonal *ridibundus* genome effect (Table 3, Figure 2). Tadpoles with RRg genotype grew slowly than those with RR genotype (Mann-Whitney test, U= 126, p=0.000) and RRe genotype (U= 131, p=0.001). There was no significant differences between growth rate of tadpoles with RR genotype and those with RRe genotype (U= 326, p>0.9).

Table 3: Results of Kruskal-Wallis test for clonal *ridibundus* genome effect of the three crosses tadpoles for mass at metamorphosis (Mass), time to metamorphosis (Time), and growth rate (Growth).

Variables	Tadpole genotypes	Mean	SD	χ^2	df	P
Mass (g)	RR	1.489	0.249	8.996	2	0.011
	RRg	1.311	0.272			
	Rre	1.585	0.343			
Time (days)	RR	60.607	4.049	0.322	2	0.851
	RRg	71.040	9.370			
	Rre	64.280	10.098			
Growth (g/days)	RR	0.025	0.004	18.88	2	7.95x10 ⁻⁵
	RRg	0.019	0.005			
	Rre	0.025	0.007			

4.4. Discussion

LARVAL PERFORMANCES AND RELATION TO FITNESS

Larval life-history traits measured are thought to greatly influence individual fitness in anurans (Hotz *et al.*, 1999). Survival to metamorphosis influences fitness through its effect on juvenile recruitment and the potential for population growth (Berven, 1990). High body mass at metamorphosis may involve higher proportion of juvenile survivors (Scott, 1994), better physiological and locomotors performance in the terrestrial environment (Newman, Dunham, 1994), and may lead to earlier first reproduction or larger size at first reproduction (Scott, 1994). Early metamorphosis enables tadpoles to metamorphose quickly at a small size to avoid drying of temporary ponds (Newman, 1988; Newman, 1989; Smith, 1983) or aquatic predators (Newman, 1988; Newman, 1989; Smith, 1987; Travis *et al.*, 1985; Van Buskirk, 2002; Van Buskirk, Arioli, 2005), and may also lead to earlier sexual maturity (Smith, 1987). Thus, there is a trade off between larval period and body mass, the fitter are tadpoles that can get a shorter larval period with a greater body size (i.e. a better growth rate). In other words, in a context of a similar larval period, the fitter exhibit a greater body mass or a better growth rate. In our study, regarding the little variation in time to metamorphosis, body mass and growth rate variations among taxa should be the best predictors of fitness. Based on this evidence, it has been assumed that the larval life-history traits measured as surrogates of fitness are in fact highly relevant components of individual fitness (Guex *et al.*, 2002; Hotz *et al.*, 1999).

In our study, high tadpoles survival indicates that experimental conditions remained within the range of tolerance of the tadpoles whatever the taxa or their geographical origin (Western or Southern Europe).

P. GRAFI COMPLEX FITNESS (PP, RgP, RR)

Even if spontaneous heterosis in hybrid clonal waterfrogs is strongly supposed by Hotz *et al.* (1999) for the *esculentus* hybridogen, surprisingly, the hybrid superiority of *P. kl. grafi* has never been tested. Our study is the first one, to our knowledge, comparing, in the P-G system the performances of the hybridogen *P. kl. grafi* with that of parental species. Our results showed differential reaction norms for mass at metamorphosis and growth rate among taxa of the hybridogenetic complex, but time to metamorphosis did not varied. Hybridogens, *P. kl. grafi* (RgP), which came from a natural hybridogenetic lineage (*P. ridibundus* x *P. kl. grafi*),

exhibit intermediate body mass and growth rate, inferior to *P. ridibundus* but superior to *P. perezi*. *P. ridibundus* (RR) tadpoles had faster growth rate and greater body mass in respect to *P. perezi* (PP) ones. It evidenced that the hybridogen didn't get a superior fitness, but an intermediate one, in comparison with both parental species. The *grafi* hybridogen exhibits an intermediate performance but better than that of its sympatric parental species *P. perezi*.

Regarding water frogs, many studies observed the performance of hybridogen tadpoles of the "L-E complex" in comparison with the sexual host or the two parental species. In some cases, the superior performance of hybrid in comparison with the two parental species was observed for *P.kl. esculentus* from natural hemiclinal lineages (Berger, Rybacki, 1997; Berger, Uzzell, 1980; Gutmann *et al.*, 1994; Hotz *et al.*, 1999; Semlitsch, Reyer, 1992; Tietje, Reyer, 2004; Tunner, Nopp, 1979), while in other cases, hybridogens exhibited intermediate performance, and no heterosis effect was observed (Plenet *et al.*, 2000a; Plenet *et al.*, 2005; Plenet *et al.*, 1998; Plenet *et al.*, 2000b). Our results are more congruent with the hypothesis asserting that hybrids have intermediate characteristics and performances regarding parental species (Plenet *et al.*, 2000a), and might be best suited for intermediate niches in which the parental species are inferior competitors (intermediate niche hypothesis; (Moore, 1984; Vrijenhoek, 1998).

As others authors studying *P. esculentus* complex (Pagano *et al.*, 2001b; Semlitsch *et al.*, 1997), we suspect differential habitat preferences between *P. kl. grafi* and *P. perezi* tadpoles to be crucial for their coexistence. Our experimental results supported the habitat segregation hypothesis (Plenet *et al.*, 2005), model predicting that the coexistence of the unisexual hybrid and its sexual host is possible only in heterogeneous environment, because each taxon exhibit highest performances in different microhabitats (Vrijenhoek, 1978; Vrijenhoek, 1994). This habitat segregation hypothesis was observed in several hybridogenetic complexes (Poeciliopsis complex, Vrijenhoek, 1978,1994; water frog complex, Berger 1973).

CLONAL *RIDIBUNDUS* GENOME EFFECT (RR, RRg, RRe)

Among the three *P. ridibundus* tadpoles with different origins, we observed a good survival rate, but larval performances were affected. RRg tadpoles grew slowly in respect to the two other lineages, and were smaller than RRe tadpoles, which were the better performer. Thus, it evidenced that RRg lineage exhibits a bad performance (fitness) in respect to other lineages. One possible explanation is accumulation of deleterious mutations by Muller's Ratchet that impact even at the heterozygous state. Moreover, the origin of Rg clonal genome beared by *P. kl. grafi* is unknown. It should originate from a primary hybridization of *R. perezi* with i) a

sexual R genome brought by a *P. ridibundus* or ii) a clonal R genome coming from an other hybridogen, *P. kl. esculentus*. In the second hypothesis, it should be a very old clonal genome that could have fixed many deleterious mutations. As *P. ridibundus* are rare in the distribution range of the P-G system, suggesting that, even if occurring *P. kl. grafi* * *P. kl. grafi* mating do not succeed in natural conditions it keeps few place fort occasional recombination i.e. “covert sex” (Vorburger, 2001a) that is to say few possibilities to reduce mutational load.

By contrast, the other clonal *ridibundus* genome transmitted by *P. kl. esculentus* (RRe) didn't evidence any disadvantage in comparison to 100% sexual *ridibundus* offspring: they show the same body mass, but better growth rate than (RR) tadpoles. It suggests 1) that the deleterious mutation accumulated by Muller's Ratchet are, in this lineage, not impacting at the heterozygous state (Guex *et al.*, 2002); and/or 2) it is possible for Re to limit or reduce mutation accumulation (Vorburger, 2001b) thanks to the abundance of *P. ridibundus* with diverse origin.

Among taxa, *P. ridibundus* tadpoles (RR and RRe) were the better performers, and can be considered as the fitter.

IMPACT ON WATER FROG POPULATION DYNAMIC IN A CONTEXT OF INVASIVE SPECIES

Theses results seem to be very important for water frog evolutionary fate. Indeed, live imports of *P. ridibundus* (mainly from Balkan, Egypt, and Turkey) with independent evolutionary histories are common in France, Belgium, Switzerland (Holsbeek *et al.*, 2009; Ohst, 2008; Schmeller *et al.*, 2007). Implantation of this specimens was successful, but seems to be limited to a particular habitat type, characterized by high-oxygen content (Plenet *et al.*, 2000a; Plenet *et al.*, 1998; Plenet *et al.*, 2000b) and low-salinity freshwater (Schmeller *et al.*, 2007). Several studies making surveys on water frogs evidenced invasiveness of *P. ridibundus* in some ponds. The higher growth rate matches abundant data of *P. ridibundus*, in various parts of their geographical range (Patrelle, 2010; Schmeller *et al.*, 2007). Such species is characterized also by higher longevity compared to indigenou species *P. kl. grafi*, *P. perezi*, *P. kl. esculentus* or *P. lessonae*. As a consequence, *P. ridibundus* extend his range to the Western part of France, and is considered as an invasive species (Pagano *et al.*, 2003; Zeisset, Beebe, 2003), and its invasiveness is confirmed by larval performances, including our data. Moreover, as evidenced with our results, *P. ridibundus* are able to reproduce with *P. kl. grafi* and *P. kl. esculentus* hybridogens, and get viable offspring of their own species. As frog import is mainly constitute of *ridibundus* group species (Ohst, 2008), it implies that the

frequency of these crosses in populations will increase with that of live import frogs, and all these specificities could represent a risk for the diversity of indigenous water frog assemblages (Pagano *et al.*, 2003) mainly if introducing *P. ridibundus* in Spain where it is naturally absent and may menaces the less fit *P. perezi*. It seems true regarding several life history traits of this species.

4.5. Conclusion

Comparing hybridogen features in both P-G and L-E systems should allow evidencing the general characteristics and differences within the hybridogenetic complexes, thus highlighting that asexuality is not only penalized by deleterious mutations but may exhibit advantages. It is an issue to understand the success of *P. ridibundus*, but also of hybridogens that are fit, while amphibians are mainly affected by decline.

RESUME

Les hybrides asexués peuvent combiner heterosis et accumulation de mutations délétères. Ces avantages et inconvénients sont essentiels et nous interrogent sur le sort de ces lignées hybrides. Comme les grenouilles vertes constituent des complexes hybridogénétiques où on retrouve des hybrides hémiclonaux, nous cherchons à comparer les performances des différentes lignées de têtards (d'hybrides ou non mais portant un génome clonal). Une première étape consista à comparer la fitness liée aux traits d'histoire de vie des têtards (taux de survie et de croissance, durée de développement et masse à la métamorphose), montrant que les têtards hybrides *P. kl. grafi* présentent une performance intermédiaire en comparaison à celles des deux espèces parentales. La seconde étape fut de comparer les performances larvaires des têtards *P. ridibundus* portant des génomes différents : certains avec 100% de génome sexuel, et d'autres avec 50%. Aucune différence significative n'a été observée entre les lignées, reflétant un faible effet de l'accumulation de mutations délétères, excepté pour les clones RRg qui montrent de mauvaises performances, probablement dues à un génome clonal plus ancien. Nos résultats suggèrent que les têtards *P. ridibundus* sont plus compétitifs que les grenouilles vertes du sud, et représentent un risque pour la diversité des grenouilles vertes indigènes en France et en Espagne.

ACKNOWLEDGEMENTS

We tanks Hardouinneau Vivianne for her help during the experiment, and Pays Olivier for his statistical advices. We are grateful to Sandrine Plénet and Dirk Schmeller for constructive and critical comments on the manuscript.

Les résultats obtenus lors de cet élevage expérimental sont intéressants car originaux, mais ils montrent une limite majeur : le faible nombre de réplicats et de croisements, ce qui fragilise notre expérience. Le design initial comptait plusieurs réplicats par type de croisement, ceci afin d'éliminer les biais dus aux éventuels effets stochastiques. Mais malheureusement, lors du transport des individus d'Espagne à l'Université d'Angers, nous avons du faire face à un fort taux de mortalité, nous contraignant à réduire le nombre de croisements. Il serait particulièrement intéressant de poursuivre les recherches sur ce complexe peu connu, en étudiant les performances larvaires d'un plus grand nombre de réplicats, et en réalisant des croisements réciproques afin d'éviter d'éventuels effets liés à l'incompatibilité cytoplasmique.

Chapitre 5

Utilisation de l'Habitat

5.1. Introduction

La niche écologique est définie par Grinnell (1917) comme étant l'ensemble des conditions environnementales au sein de laquelle chaque espèce peut survivre et maintenir ses populations (Grinnell, 1917). Ce concept est ensuite redéfini par Hutchinson (1957) comme un hypervolume où chaque dimension de l'espace représente une ressource ou une condition (température, pollution, etc) de l'environnement, en relation avec l'aire de distribution de l'espèce (Hutchinson, 1957). Selon le principe d'exclusion par compétition, deux espèces ne peuvent occuper la même niche écologique dans le même environnement et dans la même période (Martinez-Gordillo *et al.*, 2010): des espèces différentes peuvent occuper des niches fonctionnellement identiques mais séparées géographiquement ou dans le temps, ou encore deux espèces peuvent occuper un même territoire, mais dans des niches écologiques différentes. Deux espèces peuvent aussi occuper des niches écologiques chevauchantes dans l'espace et/ou dans le temps. Ce recouvrement permet aux deux espèces de cohabiter dans la mesure où il n'est pas trop important.

Ce concept théorique de niche écologique est fondamental à l'étude des zones hybrides. Celles-ci sont définies comme étant des groupes génétiquement distincts d'individus qui se rencontrent, se reproduisent ensemble, donnant naissance à une descendance générée par les 2 groupes parentaux (Harrisson, 1990). Les zones hybrides sont connues comme étant des zones où des évènements évolutifs importants se produisent (spéciation, introgression), et représentent à ce titre un outil privilégié pour étudier les processus de divergence entre lignées, et les mécanismes limitant les échanges génétiques pouvant aboutir à la spéciation, ou au contraire la rencontre d'entités plus ou moins différenciées.

Les modèles prédictifs de l'évolution de la zone hybride et des taxa qui la composent sont différents, et toujours en lien avec la détermination de la fitness hybride (Arnold, Hodges, 1995). Ainsi, le modèle de renforcement (Dobzhansky, 1940) prédit que dans le cas d'une hybridation entre 2 espèces, des processus renforcent les barrières d'isolement reproducteur. Le modèle de « zone de tension » suggère que la faible fitness des hybrides peut conduire à un renforcement de spéciation locale des parents (Barton, Hewitt, 1985) et prédit une distribution clinale des espèces parentales partageant des niches écologiques semblables. Howard et Harrisson (tous deux en 1986) ont ensuite montré que les zones hybrides pouvaient être

caractérisées par des distributions en mosaïque quand les espèces parentales occupent des habitats différents, et utilisent des ressources différentes (Harrisson, 1986; Howard, 1986). Ces zones d'hybridation en mosaïque offrent alors l'opportunité de nombreux évènements d'hybridation par multiplication des zones de contact entre espèces parentales, induisant les origines d'hybridation multiples et indépendantes (Harrisson, 1990).

Contrairement à ces modèles, selon lesquels les hybrides seraient mal-adaptés, les botanistes Anderson (1949) et Stebbins (1959), suivit par le zoologiste Moore (1977) proposent le modèle de la supériorité hybride, selon lequel les hybrides peuvent présenter une fitness supérieure aux espèces parentales dans certains habitats, notamment les écotones, les habitats nouveaux, perturbés, ou inoccupés par les espèces parentales (Moore, 1984). Ainsi, une partition de niche écologique peut être observée : les hybrides peuvent occuper la niche intermédiaire aux espèces parentales (Moore 1977) , ou bien, les différentes lignées hybrides peuvent être localement adaptées (modèle du « Frozen Niche Variation ») (Vrijenhoek, 1979; Vrijenhoek, 1994). Dans ce dernier modèle, les lignées hybrides clonales peuvent coexister avec les espèces parentales dans un environnement. Les lignées clonales sont spécialistes, et ont une bonne fitness dans leur habitat, tandis qu'elle est inférieure à celle des espèces parentales dans d'autres conditions d'habitat. Un autre modèle, celui du « General-purpose-genotype » (noté GPG), a été proposé, n'impliquant pas de partition de niche. Selon ce modèle, les lignées clonales sont écologiquement très tolérantes aux variations des conditions environnementales (Baker H., 1965; Schultz, 1971; Schultz, 1977). Ces lignées sont donc généralistes, exploitent divers habitats aux caractéristiques écologiques différentes, et montrent une faible variation de leur fitness en fonction de l'environnement (Lynch, 1984).

Du fait de la présence de nombreuses lignées hybrides stables, les grenouilles vertes européennes sont un bon modèle pour étudier ce genre de problématique. L'hybride *Pelophylax klepton esculentus* Linnaeus (1758) (génotype RL) est le plus répandu en Europe (Berger, 1988; Graf, Polls Pelaz, 1989; Pagano *et al.*, 2001a). Il est issu du croisement entre deux espèces parentales *P. ridibundus* Pallas (1771) (génotype RR), et *P. lessonae* Camerano (1882) (génotype LL), tout trois constituant le complexe *Pelophylax esculentus*. Les hybrides de ce complexe ont un mode de reproduction particulier appelé l'hybridogénèse. Lors de la gamétogénèse, l'hybride élimine systématiquement le génome de l'espèce parentale avec laquelle il est en sympatrie, généralement le génome *lessonae*, lors d'une phase pré-méiotique. Le génome restant subit ensuite une duplication avant d'entrer en méiose

(Vinogradov, Chubinishvili, 1999b). Cet hybride ne produit alors que des gamètes contenant le génome d'une des deux espèces parentes. Il perpétue sa lignée par back-cross avec l'espèce parentale dont le génome a été éliminé, afin de rétablir à chaque génération le génome perdu lors de la gamétogénèse (Graf J.-D., P., 1979; Uzzell *et al.*, 1980). Il n'y a donc pas (a priori) de recombinaison lors de la formation des gamètes, et la reproduction est de type hémiclonale (Hotz, 1983; Uzzell *et al.*, 1980). L'hybridogénèse impliquant les grenouilles vertes repose sur plusieurs caractéristiques: les hybrides sont viables, fertiles, et des deux sexes (Graf, Polls Pelaz, 1989). En outre, l'hybride a souvent une fitness supérieure à celle des espèces parentales. Cet heterosis (ou vigueur hybride) a été observé de nombreuses fois (Semlitch Hotz & Guex 1997, Hotz et al. 1999, Weeks et al. 1992, Vrijenhoek 1994). Dans d'autres expériences, l'hybride a montré des performances intermédiaires aux espèces parentales, suggérant plutôt une partition de niche écologique (Plenet *et al.*, 2000b). Les deux modèles GPG et FNV combinés, qui prédisent tous les deux une bonne adaptation des clones, expliquerait le maintien de ces nombreuses lignées clonales (Hotz *et al.*, 1999; Semlitsch *et al.*, 1997; Vrijenhoek, 1998).

Considérées comme ubiquistes, les grenouilles vertes de ce complexe n'ont pourtant pas la même utilisation de l'habitat : les grenouilles rieuses occupent préférentiellement des milieux à forte influence fluviale, à eau renouvelée, fortement oxygénée, et de grande taille, tandis que les grenouilles de lessona occupent plutôt des habitats plus petits, isolés, parfois même temporaires, caractérisés par une eau stagnante et faiblement oxygénée, et un substrat vaseux (Berger, 1973; Morand, Joly, 1995; Pagano *et al.*, 2001b; Plenet *et al.*, 2000b). Néanmoins, les facteurs limitant la présence des différents taxa du complexe *P. esculentus* (ou la structurant) sont relativement mal connus pour plusieurs raisons :

- soit l'écologie des grenouilles vertes a été étudiée expérimentalement, chaque variable ayant été étudiée séparément ce qui représente une simplification de l'écosystème dans son ensemble et des interactions potentielles entre variables environnementales. Cette démarche expérimentale est nécessaire et indispensable mais serait utilement complétée par une démarche d'écologie de terrain complémentaire ;
- soit parce que les approches d'écologie de terrain ont été typologiques et ayant peu souvent une approche d'analyse quantitative des variables environnementales ce qui ne permet pas une finesse et une robustesse d'analyse sur les partitions de niche écologiques ;

- soit parce que les rares études d'écologie à analyse quantitative ont un faible nombre de sites étudiés méritant d'autres analyses comparables à fin de validation ou d'infirmité des résultats préalablement étudiés.

Mieux connaître l'utilisation de l'habitat et les niches écologiques est intéressant pour l'écologie évolutive d'une manière générale et indispensable pour modéliser (prédire) les risques d'extinction et/ou de persistance des taxa du complexe d'hybridation (Hellriegel, Reyer, 2000).

Dans le contexte actuel de déclin de la biodiversité à l'échelle mondiale, le groupe des amphibiens est particulièrement touché. Bien que les grenouilles vertes européennes soient très abondantes en Europe, ce n'est pas le cas de tous les taxa. En effet, la grenouille *P. lessonae*, espèce native en France, est classée comme vulnérable selon l'UICN (UICN, 2008), et est la grenouille verte la plus protégée en France (Ministère de l'Ecologie, du Développement et de l'Aménagement durables, 2007). Elle est tributaire de milieux tels que les marais, tourbières, mares prairiales, eaux stagnantes peu profondes, qui ont fortement régressé ces dernières décennies. De plus, les nombreuses et fréquentes introductions de *P. ridibundus* sur le territoire français pour des raisons culinaires ont considérablement modifié les probabilités d'hybridation avec les *P. lessonae* (Neveu, 2004; Schmeller *et al.*, 2007). Ce déséquilibre taxonomique constitue à long terme une menace majeure pour cette dernière.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre est l'étude de l'utilisation de l'habitat aquatique chez les grenouilles vertes du complexe *P. esculentus*, afin d'affiner nos connaissances sur les exigences écologiques des différents taxa. Cette approche se veut à la fois descriptive, explicative voire prédictive, et est une étape clé pour proposer des mesures de gestion conservatoire adaptées. Pour ce faire, les relations entre la composition du peuplement, la morphologie des individus, et les caractéristiques des sites seront observées, afin de déterminer les facteurs influençant la répartition spécifique et la partition de niche écologique chez ces grenouilles vertes. Parmi ces caractéristiques, les paramètres abiotiques et plus particulièrement physico-chimiques seront observés, car ils jouent un rôle non négligeable dans la répartition, la croissance et l'évolution des populations tant animales que végétales (Dajoz, 2006). Les résultats de cette étude nous permettront de mieux comprendre la répartition des différentes grenouilles vertes, et d'évaluer indirectement les menaces potentielles portant sur ces taxa comme sur les sites aquatiques qu'ils occupent.

5.2. Matériels and méthodes

5.2.1. Contexte de l'étude

Le complexe *P. esculentus* a été étudié au sein de deux départements situés dans la moitié Nord de la France, les Ardennes et le Maine-et-Loire. Les secteurs observés sont localisés dans des habitats différents, et dans des zones écologiques ayant une influence fluviale différente allant de la rivière au bras mort connecté (la boire), jusqu'à la mare prairiale en haut de coteau. Chacun des 26 sites suivis (14 dans l'Argonne ardennaise et 12 dans l'Anjou) a fait l'objet d'une caractérisation de l'habitat à l'aide d'une fiche « Habitat et Paysage » élaborée spécifiquement pour le cas des grenouilles vertes. Celle-ci a été réalisée en compilant plusieurs études réalisées dans le cadre de suivi de zones humides (fiche du Pôle Relais « Mares et Mouillères », « Fiche régionale d'inventaire des mares » diffusée en 2007 par le Conservatoire Fédératif des Espaces Naturels de Basse-Normandie), ainsi que sur les travaux de différents laboratoires (Ficetola, De Bernardi, 2004; Oertli *et al.*, 2005; Scribner *et al.*, 2001), afin de standardiser la prise de données (**Annexe 1**). Cette première analyse nous permet de classer nos sites selon le code Corine Land Cover (CLC). Une étude topographique de chaque site a été réalisée sous un logiciel cartographique (ArcGis 9.3) afin d'obtenir les coordonnées, l'altitude, la distance de chaque site à la rivière la plus proche (Tableau 5.1).

Tableau 5.1 : paramètres relevés pour l'analyse de l'habitat aquatique des grenouilles vertes.

Paramètre	Code	Unité
Conductivité	cond	µS/cm
Concentration en ion H ⁺	pH	
Taux de nitrates	nitrates	mg/L
Alcalinité	TAC	mg/L
Turbidité	turbi	NTU
Dureté totale	dtot	mg/L
Dureté calcique	dcal	mg/L
Dureté magnésique	dmagn	mg/L
Distance à la rivière la plus proche	dist	mètres
Altitude du site	altit	mètres

5.2.2. Les paramètres physico-chimiques

Un suivi de quelques paramètres physico-chimiques a été réalisé sur chaque site étudié, grâce à une campagne d'échantillonnage d'eau réalisée une fois par mois durant 3 mois consécutifs dans l'Argonne ardennaise (avril, mai et juin), et durant 2 mois dans l'Anjou (mai et juin). Chaque campagne a consisté à prélever tôt le matin (entre 7 et 9h, moment où les paramètres sont encore relativement stables) et en un minimum de temps (2h) de l'eau dans chaque site suivi, en changeant tous les mois l'ordre de prélèvement, afin de comparer les données entre les sites. Ainsi, pour chaque site, 1,5 litre d'eau a été prélevé dans une bouteille à l'aide d'une perche de 1,5 mètre (la moitié avec de l'eau de surface, l'autre à plus de 50 cm de profondeur), l'eau remplissant totalement la bouteille. Celle-ci a été placée au froid et à l'abri de la lumière jusqu'aux analyses, ceci afin d'éviter l'altération des éléments à mesurer. Huit paramètres physico-chimiques ont été observés au laboratoire (Tableau 5.1): 5 variables ont été mesurées avec un photomètre (Palintest 7500): Nitrates, Turbidité, dureté totale, dureté calcique et dureté magnésique. De plus, la concentration en ions H⁺ (pH) et la conductivité (Careaga fuentes U. ,2001) qui indique la capacité des ions à transmettre le courant ont été mesurées par un conductimètre (Hanna combo HI 98129 – HI 98130, SD_{pH}=0,01, et SD_{conduct.}= 1 µS). Enfin, l'alcalinité (le titre alcalimétrique complet, TAC), mesurant la somme des alcalins libres, des carbonates et des bicarbonates, a été obtenus par une méthode de titration (dosages).

5.2.3. Les grenouilles vertes

Les individus ont été capturés momentanément dans 14 sites dans l'Argonne ardennaise en 2007, et 12 dans l'Anjou en 2008 (chapitre 2). Stockés dans des sacs en toile humidifiés par l'eau du site afin qu'ils soient moins stressés, ils ont été transportés jusqu'au laboratoire le temps des analyses. Chaque individu a été anesthésié à l'aide de MS222 (m-aminobenzoic acid ethyl ester methansulfonate) à une concentration de 1g/L (Cakir, Strauch, 2005), afin d'effectuer les observations et les prélèvements nécessaires aux analyses génétiques (chapitre 2 et 3) (Broquet *et al.*, 2007; Hotz, 1983; Pidancier *et al.*, 2003; Uzzell, Berger, 1975).

Après sexage des individus, 3 mesures ont été effectuées : une pesée (balance de précision de 0,01g), puis à l'aide d'un pied à coulisse, la longueur du museau jusqu'au cloaque (Snout vent

length : SVL), et la longueur du tibia, toutes deux mesurées deux fois puis moyennées. Les individus mesurant moins de 40 mm en SVL ont été considéré comme des juvéniles (Holenweg Peter *et al.*, 2001).

5.2.4. Les analyses statistiques

La distribution des données ne suivant pas la loi Normale, et les conditions de validité des tests de normalité des résidus et d'homoscédasticité n'étant pas remplis, des analyses non-paramétriques ont été effectuées. Pour chaque étape, une analyse globale, puis à l'échelle des 2 zones d'études ont été menées. Dans un premier temps, une analyse des correspondances principales a été menée afin d'observer les paramètres les plus représentatifs des sites. Ensuite, pour tester l'effet de l'habitat (typologie définie selon le CLC) sur les caractéristiques des sites, une comparaison entre les 10 variables explicatives a été menée en utilisant la procédure de Wilcoxon Mann Whitney, avec un test de Wilcoxon rank-sum (Crawley M., 2007). Puis, dans un second temps, l'effet de l'habitat sur la composition du peuplement en grenouilles vertes (identifiées dans le chapitre 3) a été testé, grâce au test du χ^2 . Par la même occasion, les éventuelles corrélations entre les paramètres de l'habitat, ainsi qu'entre les abondances des 3 taxa de grenouilles vertes ont été testées grâce au test de corrélation de Spearman. Enfin, pour tester l'effet de l'habitat sur la morphologie des grenouilles vertes, une comparaison des 3 variables explicatives (poids, SVL, tibia) a été réalisée par taxon, en utilisant la procédure de Wilcoxon Mann Whitney.

5.3. Résultats

5.3.1. Analyse des caractéristiques de l'habitat

Selon la typologie CLC, nos 26 sites étudiés dans les 2 zones d'études appartiennent à deux classes : forêt et prairie. Ainsi, nous avons étudié 8 sites forestiers (3 dans l'Argonne ardennaise et 5 dans l'Anjou) et 18 sites prairiaux (11 dans l'Argonne ardennaise et 7 dans l'Anjou).

Le cercle des corrélations de l'ACP (Figure 5.1) permet de définir une composante principale 1 (Dim1) qui représente plutôt les variables physico-chimiques au sens restreint

(duretés totale et calcique, conductivité, l'alcalinité) alors que l'axe 2 est plutôt représentatif des caractéristiques physiques (hydrologiques) et paysagères du site aquatique (altitude, distance à la rivière). Les variations de pH et des nitrates s'expliquent mieux toutefois selon cet axe 2.

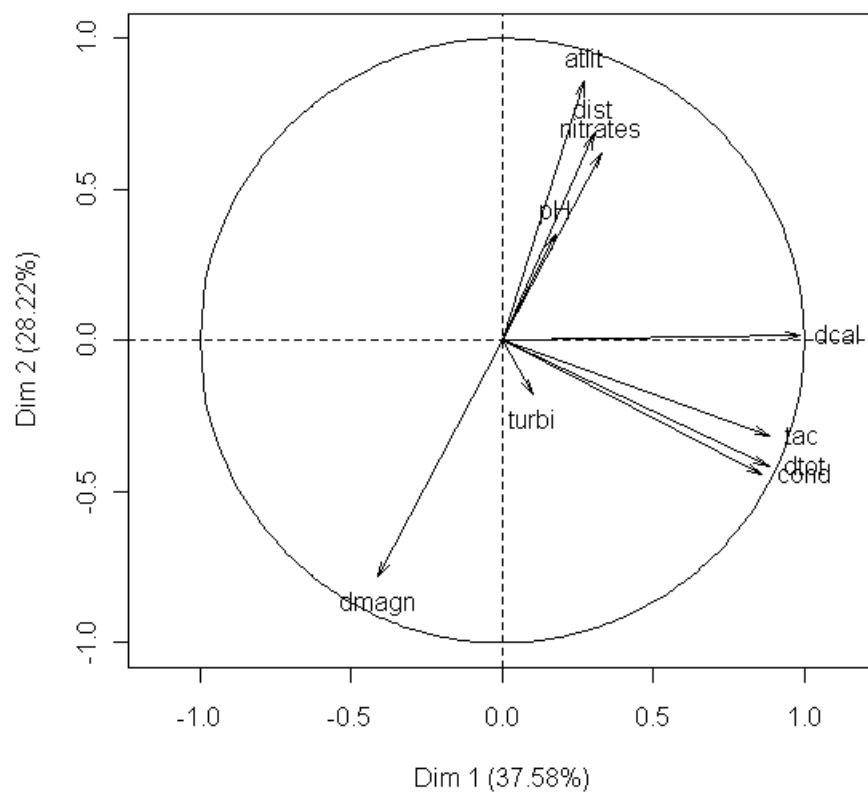


Figure 5.1 : Cercle de corrélations de l'analyse en composantes principales (ACP) des paramètres abiotiques de nos sites d'étude.

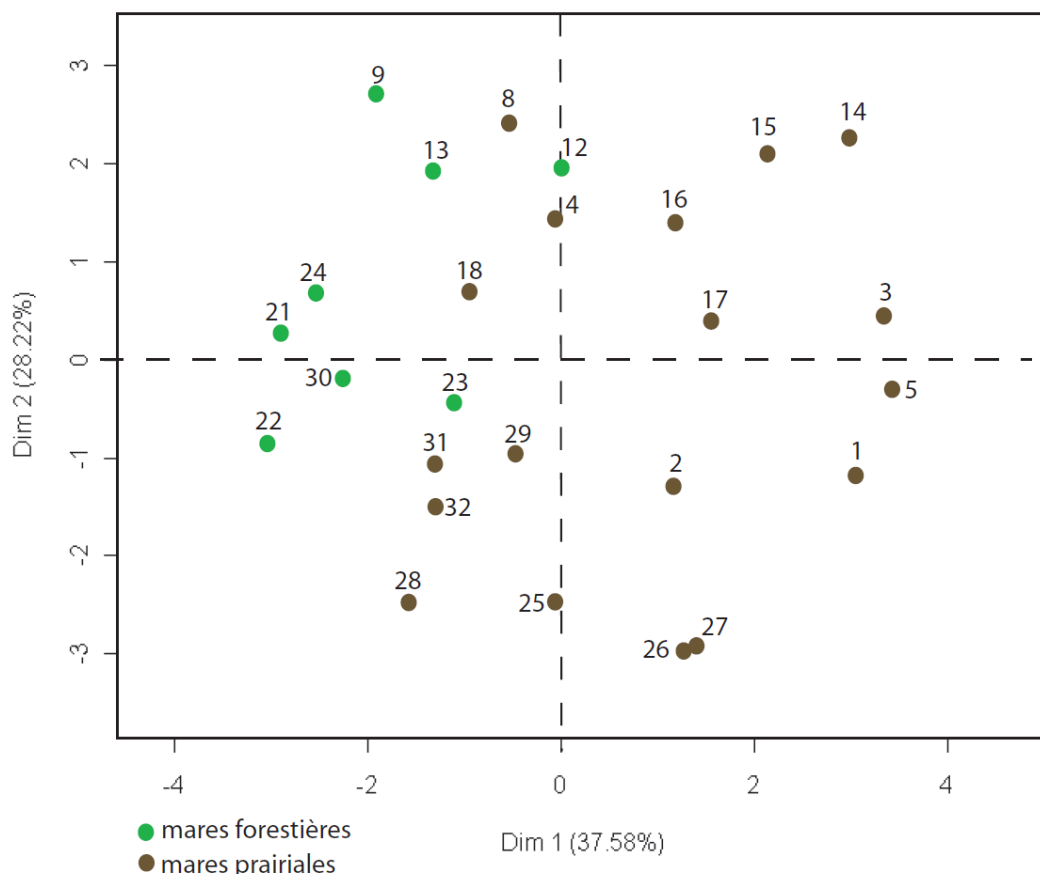


Figure 5.2 : Projection des sites étudiés sur la carte factorielle de l'ACP.

La carte factorielle montre une certaine dispersion des sites ce qui confirme la diversité écologique des sites au regard des variables environnementales étudiées (Figure 5.2). En revanche, on remarque que les sites forestiers sont rassemblés dans la même zone sur la carte factorielle ce qui suggère une certaine homogénéité des sites de ce type d'habitat, tandis que les sites prairiaux sont à l'opposé et assez éparés. L'ACP confirme donc que les sites forestiers et prairiaux sont relativement distincts.

En ce qui concerne les paramètres de l'habitat plusieurs variables sont significativement corrélées (Figure 5.1).

Tableau 5.2 : Matrice de corrélation pour les paramètres de l'habitat (test de Spearman). Les cases jaunes indiquent les corrélations significatives. S : la statistique, Rho : le coefficient de Spearman, p-val : la p-value.

	pH	nitrates	TAC	dtot	dcal	dmagn	turbi	dist	altit	
S	2854.988	2854.988	334.014	216.611	564.789	3044.000	3061.140	3548.000	3296.254	
Rho	0.024	0.024	0.886	0.926	0.807	-0.041	-0.047	-0.213	-0.127	cond
p-val	0.908	0.908	0.000	0.000	0.000	0.844	0.821	0.295	0.537	
		1959.670	3242.523	3210.195	2746.378	3866.161	2272.719	2360.904	2450.094	
		0.330	-0.109	-0.098	0.061	-0.322	0.223	0.193	0.162	pH
		0.100	0.598	0.636	0.767	0.109	0.274	0.345	0.428	
			2527.091	2473.191	1573.075	4943.345	2227.665	1599.773	895.265	
			0.136	0.154	0.462	-0.690	0.238	0.453	0.694	nitrates
			0.508	0.451	0.017	0.000	0.241	0.020	0.000	
				322.130	395.507	3497.649	3445.942	3463.491	3122.548	
				0.890	0.865	-0.196	-0.178	-0.184	-0.068	TAC
				0.000	0.000	0.338	0.384	0.368	0.743	
					458.470	3043.061	2735.208	3342.214	3070.674	
					0.843	-0.040	0.065	-0.143	-0.050	dtot
					0.000	0.845	0.753	0.487	0.809	
						4425.770	2673.613	2618.843	1978.868	
						-0.513	0.086	0.105	0.323	dcal
						0.007	0.676	0.611	0.107	
							3380.467	4352.000	5098.487	
							-0.156	-0.488	-0.743	dmagn
							0.448	0.012	0.000	
								2799.872	2122.128	
								0.043	0.274	turbi
								0.836	0.175	
									736.503	
									0.748	dist
									0.000	

5.3.2. Caractéristiques des différents types d'habitat

L'effet du type d'habitat sur les caractéristiques des sites est avéré pour certains paramètres tels la conductivité, le pH, l'alcalinité, les duretés totale et calcique, ainsi que la distance à la rivière la plus proche et l'altitude (Tableau 5.3) :

- A une échelle globale, on constate que la conductivité, l'alcalinité, les duretés totale et calcique dans les sites prairiaux sont significativement supérieures à celles des sites forestiers (Tableau 5.3 et Figure 5.3).
- A l'échelle de chaque zone étudiée, on remarque que dans l'Argonne ardennaise, les sites prairiaux sont caractérisés par une conductivité et des duretés totale et calcique supérieurs aux sites forestiers.
- Et enfin, dans l'Anjou, la conductivité, l'alcalinité, les duretés totale et calcique sont significativement supérieures en prairie qu'en forêt, tandis que la distance à la rivière la plus proche et l'altitude des sites forestiers sont plus importantes que celles des sites prairiaux (Tableau 5.3).

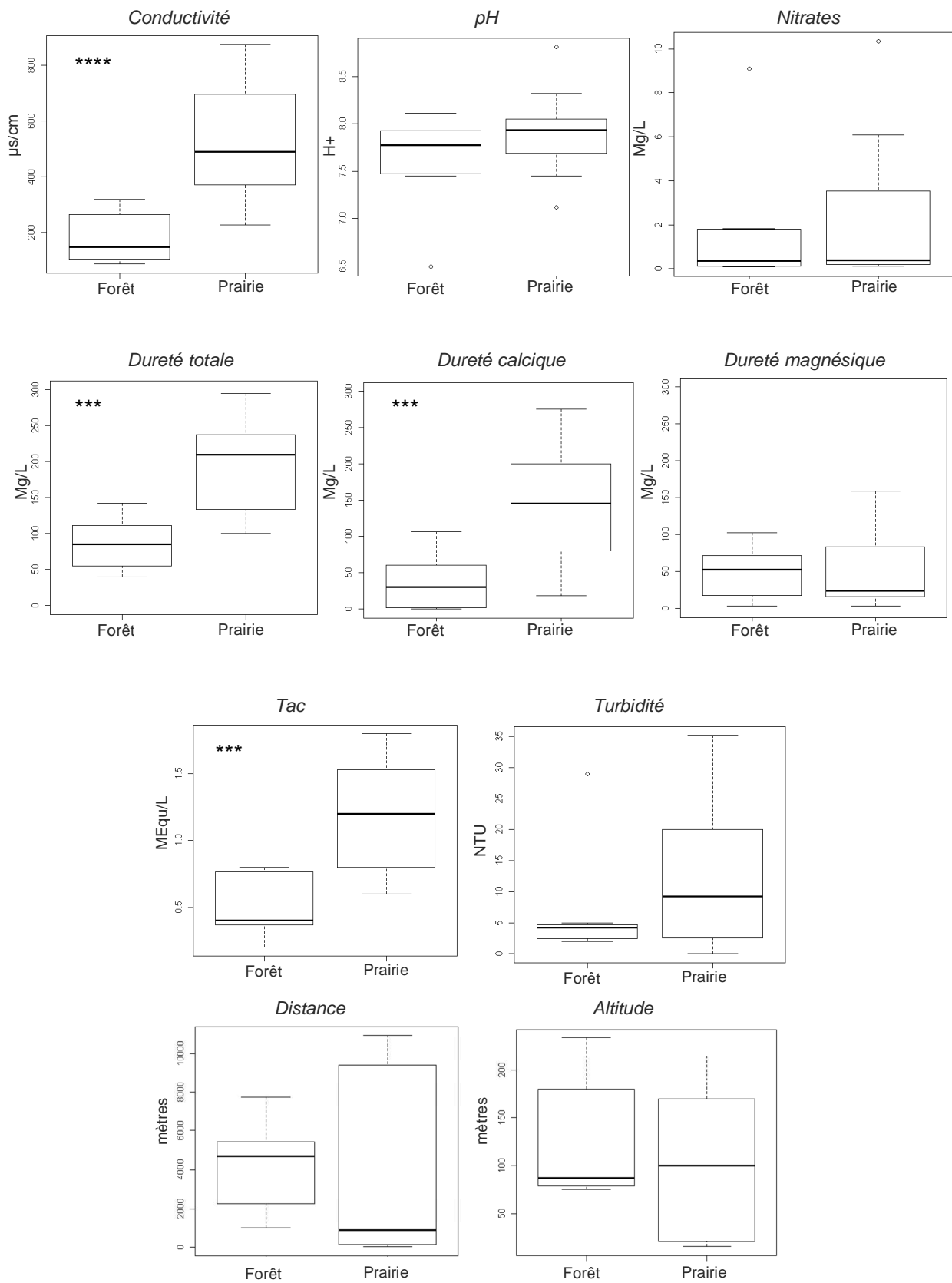


Figure 5.3 : Boites à moustaches des comparaisons des paramètres entre les habitats prairiaux et forestiers (* = p-value<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001, and **** = p<0.0001).

Tableau 5.3 : Résultats des comparaisons des différents paramètres en fonction des deux types d'habitat forestier et prairiaux (tests de Wilcoxon Mann et Whitney). Les chiffres en gras sont significatifs.

Paramètres	Globale		Argonne		Anjou	
	W	P-value	W	P-value	W	P-value
Conductivité	6	0.000	2	0.022	0	0.003
pH	51.5	0.266	4	0.060	18	1.000
Nitrates	56	0.389	18	0.885	14	0.626
TAC	13.5	0.001	5.5	0.100	2	0.013
Dureté totale	9	0.001	2	0.029	2	0.010
Dureté calcique	12.5	0.001	2	0.029	3.5	0.028
Dureté magnésique	78	0.765	12	0.555	11	0.343
Turbidité	57	0.420	8	0.225	23	0.413
Distance à la rivière	93	0.261	15	0.885	34	0.005
Altitude	80	0.677	24	0.275	35	0.006

5.3.3. Le peuplement en grenouilles vertes

Les 759 grenouilles vertes en provenance des 2 zones d'études ont été identifiées grâce à la méthode RFLP sur ITS2 (chapitre 3) (Tableau 5.4 et Figure 5.4), dont 406 en provenance de l'Argonne ardennaise et 353 de l'Anjou. On constate que pour la grande majorité des sites, le peuplement est composé de deux taxa de grenouilles vertes : *P. lessonae* et son hybride *P. esculentus*, formant le système « L-E », ou bien *P. ridibundus* et l'hybride, constituant le système « R-E ». Lorsque la troisième espèce est présente, elle est souvent minoritaire (sites 3, 5, 12, 15, 28 et 32), à l'exception des sites 17, 21, 22, 24 et 30. Les sites 1, 2, 13 et 21 ne comptent que des hybrides, constituant un système « E-pur ». Il y a significativement plus de *P. ridibundus* dans le Maine-et Loire ($X^2 = 214.39$, $df = 1$, $p\text{-value} < 2.2e-16$), moins d'hybride ($X^2 = 105.4584$, $df = 1$, $p\text{-value} < 2.2e-16$) et moins de *P. lessonae* ($X^2 = 6.9307$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.008$) que dans l'Argonne ardennaise.

Tableau 5.4 : Effectifs (Eff) et fréquences (Fréq) des taxa identifiés par ITS2 classés par sites d'études.

N°	Sites d'étude			<i>P. ridibundus</i>		<i>P. kl. esculentus</i>		<i>P. lessonae</i>		Effectif Total
	X	Y	Milieu	Eff	Fréq	Eff	Fréq	Eff	Fréq	
tout				174	22.92	437	57.58	148	19.50	759
ard	Argonne			8	1.97	304	74.88	94	23.15	406
mel	Anjou			166	47.03	133	37.68	54	15.30	353
1	774950	2488040	prairie	0	0.00	17	100.00	0	0.00	17
2	774665	2487905	prairie	0	0.00	6	100.00	0	0.00	6
3	782880	2495640	prairie	1	3.85	21	80.77	4	15.38	26
4	775390	2503350	prairie	0	0.00	24	77.42	7	22.58	31
5	781221	2495779	prairie	1	3.33	13	43.33	16	53.33	30
8	788525	2495710	prairie	0	0.00	33	78.57	9	21.43	42
9	780468	2493318	forêt	0	0.00	24	66.67	12	33.33	36
12	776583	2490238	forêt	1	3.45	24	82.76	4	13.79	29
13	782140	2491150	forêt	0	0.00	12	100.00	0	0.00	12
14	788375	2495750	prairie	0	0.00	35	94.59	2	5.41	37
15	789455	2501135	prairie	2	6.45	14	45.16	15	48.39	31
16	785480	2496670	prairie	1	2.33	31	72.09	11	25.58	43
17	771665	2495325	prairie	2	11.76	13	76.47	2	11.76	17
18	777803	2502853	prairie	0	0.00	37	75.51	12	24.49	49
21	401816	2266914	forêt	7	16.28	28	60.47	10	23.26	43
22	404522	2259151	forêt	1	20.00	2	40.00	2	40.00	5
23	404637	2259095	forêt	0	0.00	6	60.00	4	40.00	10
24	391588	2257602	forêt	3	10.34	14	48.28	12	41.38	29
25	389396	2288209	prairie	20	95.24	1	4.76	0	0.00	21
26	393177	2287876	prairie	27	83.78	6	16.22	0	0.00	37
27	376994	2270534	prairie	38	79.17	10	20.83	0	0.00	48
28	395163	2272553	prairie	23	55.81	3	2.33	16	41.86	43
29	381643	2270764	prairie	24	50.00	20	50.00	0	0.00	40
30	402258	2267265	forêt	4	12.50	19	53.13	9	34.38	32
31	394326	2294960	prairie	0	0.00	15	100.00	0	0.00	16
32	395150	2295611	prairie	19	65.52	9	31.03	1	3.45	29

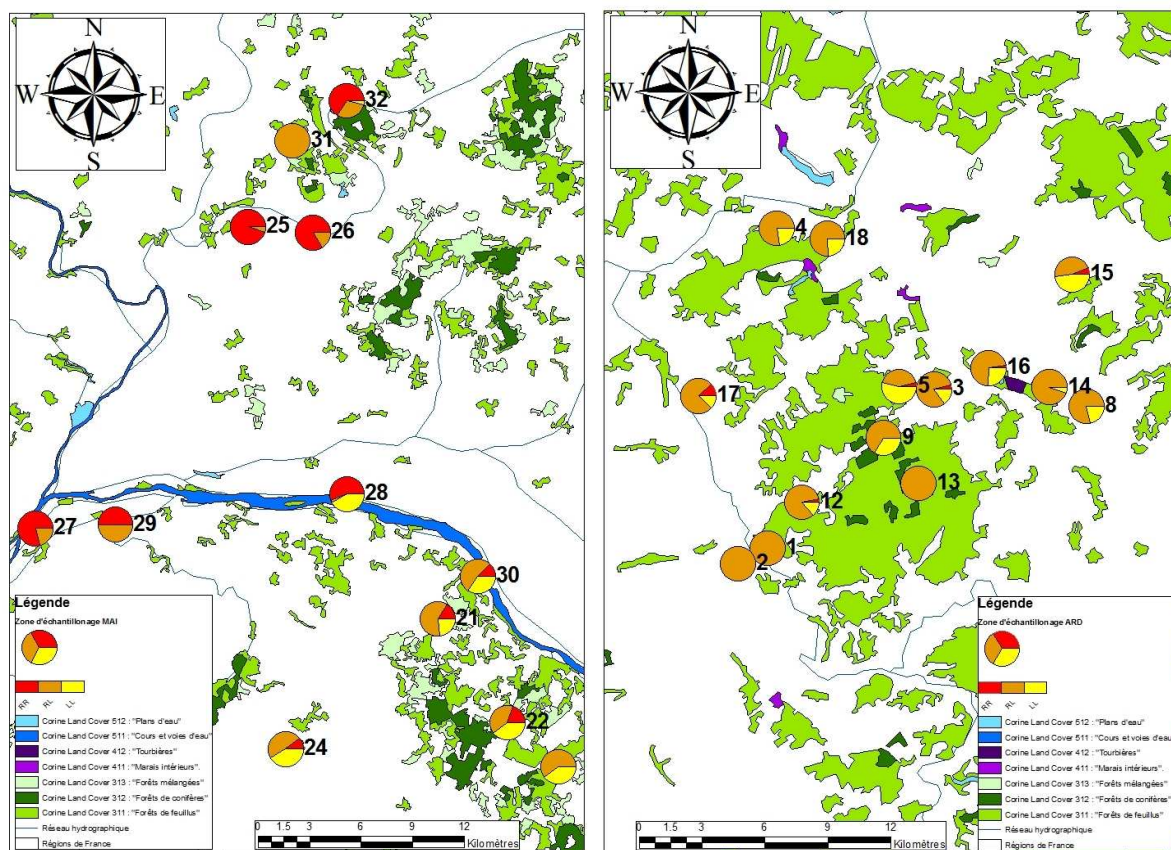


Figure 5.4 : Répartition des 3 taxa de grenouilles vertes dans les 2 zones d'étude. A gauche, l'Anjou, à droite l'Argonne ardennaise.

5.3.4. Relation entre le peuplement et l'habitat

La comparaison des peuplements en grenouilles vertes entre les sites prairiaux et forestiers montre des différences significatives à l'échelle globale (Figure 5.6). En effet, il y a significativement plus de *P. ridibundus* ($X^2 = 32.279$, $df = 1$, $p\text{-value} = 1.335e-08$), moins d'hybrides ($X^2 = 5.881$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.015$), et moins de *P. lessonae* ($X^2 = 8.4$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.004$) en prairie qu'en forêt. A l'échelle de l'Anjou, on observe les mêmes différences (pour les *P. ridibundus*, $X^2 = 86.520$, $df = 1$, $p\text{-value} < 2.2e-16$, pour les *P. esculentus*, $X^2 = 28.109$, $df = 1$, $p\text{-value} = 1.146e-07$, et pour les *P. lessonae*, $X^2 = 31.408$, $df = 1$, $p\text{-value} = 2.090e-08$). En revanche, pour l'Argonne ardennaise, il n'y a plus de différences significatives (pour les *P. ridibundus*, $X^2 = 2e-04$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.987$, pour les *P. esculentus*, $X^2 = 0.29$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.590$, et pour les *P. lessonae*, $X^2 = 0.159$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.690$)

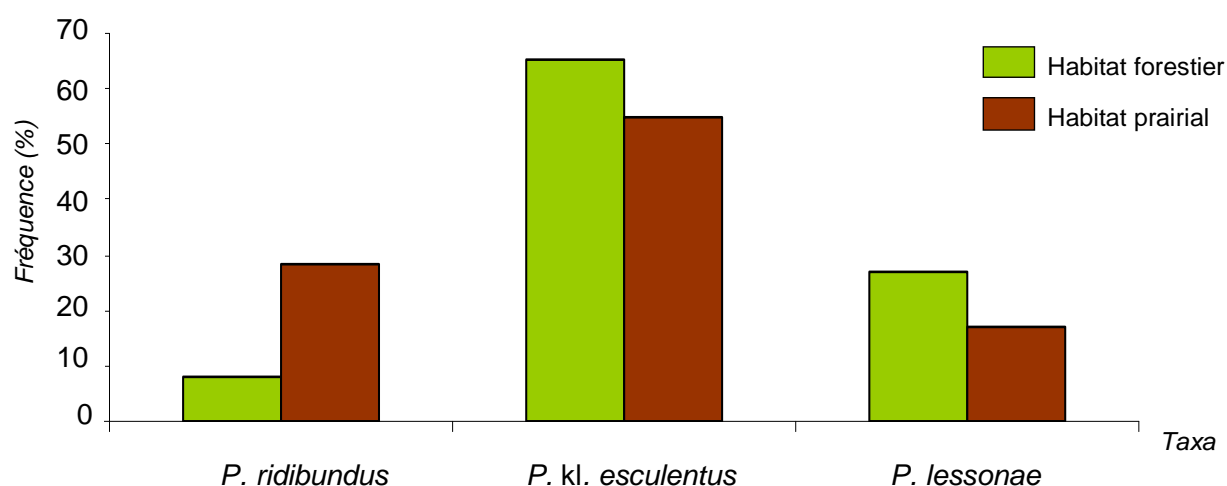


Figure 5.5 : Abondances relatives en grenouilles vertes des 3 taxa en fonction des deux types d'habitats aquatiques à l'échelle globale.

Les tests de corrélations effectués afin d'observer les éventuelles relations entre les différentes abondances ont révélé, à l'échelle globale, une corrélation négative entre l'abondance des grenouilles rieuses et celle des hybrides (Tableau 5.5). Ainsi, plus il y a de rieuses dans un site, et moins on retrouve d'hybrides. En revanche, à une échelle plus fine, il n'y a pas de corrélation entre l'abondance des 3 taxa, aussi bien dans l'Argonne ardennaise que dans l'Anjou.

Tableau 5.5 : Matrice de corrélation entre les variables « abondances en grenouilles vertes » et les 10 variables de l'habitat à l'échelle globale. Les cases jaunes correspondent aux corrélations significatives.

RR	RL	LL	cond	pH	nitrate	TAC	dtot	dcal	dmagn	turbi	dist	altit	
s	4082.317	3091.608	2231.591	3269.697	4430.399	2463.001	2423.029	3290.493	1440.009	4097.558	4015.233	4907.377	RR
rho	-0.396	-0.057	0.237	-0.118	-0.515	0.158	0.172	-0.125	0.508	-0.401	-0.373	-0.678	
p-val	0.045	0.782	0.244	0.566	0.007	0.441	0.402	0.543	0.008	0.042	0.061	0.000	
		1903.524	3523.023	1748.286	1669.638	3358.745	3822.996	2537.138	4928.428	2731.972	1720.940	1617.871	RL
		0.349	-0.204	0.402	0.429	-0.148	-0.307	0.133	-0.685	0.066	0.412	0.447	
		0.080	0.316	0.042	0.029	0.470	0.127	0.518	0.000	0.749	0.037	0.022	
			3794.693	1783.014	2420.390	4323.998	3662.838	3405.358	3508.864	2010.629	1179.510	1778.357	LL
			-0.297	0.390	0.173	-0.478	-0.252	-0.164	-0.200	0.313	0.597	0.392	
			0.140	0.049	0.399	0.013	0.214	0.423	0.328	0.120	0.001	0.048	

Tableau 5.6 : Matrice de corrélation entre les variables « abondances en grenouilles vertes » et les 10 variables de l'habitat centrée sur les amphibiens, à l'échelle de l'Argonne ardennaise (a), puis de l'Anjou (b). Les cases jaunes correspondent aux corrélations significatives.

RR	RL	LL	cond	pH	nitrates	TAC	dtot	dcal	dmagn	turbi	dist	altit	
s	580.481	308.846	299.857	299.857	434.764	285.243	296.309	265.922	603.398	461.745	306.602	468.521	RR
rho	-0.276	0.321	0.341	0.341	0.044	0.373	0.349	0.416	-0.326	-0.015	0.326	-0.030	
p-val	0.340	0.263	0.233	0.233	0.880	0.189	0.222	0.140	0.255	0.960	0.255	0.920	
a		298.435	601.809	380.590	258.920	612.909	631.163	587.374	581.698	502.260	297.130	483.217	RL
		0.344	-0.323	0.164	0.431	-0.347	-0.387	-0.291	-0.278	-0.104	0.347	-0.062	
		0.228	0.261	0.576	0.124	0.224	0.171	0.313	0.335	0.724	0.224	0.833	
		492.288	470.117	499.342	645.218	508.976	493.842	459.031	433.837	206.078	271.179	LL	
		-0.082	-0.033	-0.097	-0.418	-0.119	-0.085	-0.009	0.047	0.547	0.404		
		0.781	0.910	0.740	0.137	0.686	0.772	0.976	0.875	0.043	0.152		

RR	RL	LL	cond	pH	nitrates	TAC	dtot	dcal	dmagn	turbi	dist	altit	
s	298.544	384.679	71.625	310.042	243.351	101.761	99.674	108.569	202.855	458.312	450.288	519.726	RR
rho	-0.044	71.280	0.750	-0.084	0.149	0.644	0.651	0.620	0.291	-0.602	-0.574	-0.817	
p-val	0.892	0.272	0.005	0.795	0.644	0.024	0.022	0.031	0.359	0.038	0.051	0.001	
b		264.187	344.102	150.763	435.523	331.296	451.289	320.682	529.426	329.962	343.100	298.566	RL
		0.076	-0.203	0.473	-0.523	-0.158	-0.578	-0.121	-0.851	-0.154	-0.200	-0.044	
		0.814	0.527	0.121	0.081	0.623	0.049	0.707	0.000	0.633	0.534	0.892	
		476.792	126.315	286.000	507.261	443.611	507.639	296.369	130.132	122.168	131.998	LL	
		-0.667	0.558	0.000	-0.774	-0.551	-0.775	-0.036	0.545	0.573	0.538		
		0.018	0.059	1.000	0.003	0.063	0.003	0.911	0.067	0.052	0.071		

Lorsqu'on observe les éventuelles relations à l'échelle globale entre les abondances en grenouilles vertes et les paramètres de leurs habitats, on remarque des corrélations :

- une corrélation positive entre l'abondance de rieuse et la quantité d'ion magnésium, et une négative avec le taux de nitrates, la turbidité, et l'altitude (Tableau 5.5). On peut noter que la corrélation négative avec la distance à la rivière est proche de la significativité ($p=0.061$).
- une corrélation négative entre l'abondance en hybride et la dureté magnésique, et positive avec le pH, le taux de nitrates, la distance à la rivière et l'altitude.
- une corrélation négative entre l'abondance en grenouille de lessona et la dureté magnésique, et positive avec le pH, le taux de nitrates, la distance et l'altitude.

A l'échelle de l'Argonne ardennaise, seule une corrélation positive apparaît entre l'abondance en *P. lessonae* et la distance à la rivière. En revanche, pour l'Anjou, de nombreux paramètres sont corrélés (Tableau 5.6):

- l'abondance de rieuse est corrélée positivement à la conductivité, au TAC, et aux duretés totale et calcique, tandis qu'elle est négativement corrélée à la turbidité, et

l'altitude. La corrélation négative avec la distance à la rivière est très proche de la significativité ($p=0.051$).

- L'abondance des hybrides est corrélée négativement aux duretés totale et magnésique
- Et celle des lessona est corrélée négativement à la conductivité, au TAC, et aux duretés totale et calcique, mais positivement au pH, est proche de la significativité pour la distance ($p=0.052$).

5.3.5. Effet de l'habitat sur la morphologie des grenouilles vertes

On constate qu'il y a un effet de l'habitat sur la morphologie des grenouilles vertes. En effet, il y a de nombreuses différences significatives entre les grenouilles d'un même taxon selon qu'elles viennent de sites forestiers ou prairiaux (Tableau 5.7). A l'échelle globale, les grenouilles rieuses ainsi que les hybrides sont plus grosses, plus grandes, et possèdent de plus longues pattes en prairie que celles issues de forêt (Figure 5.6). Il en va de même pour les grenouilles de l'Anjou. En revanche, dans l'Argonne ardennaise, le nombre de grenouille rieuse d'étant de que 8, aucune différence n'est observé, tandis que les grenouilles hybrides sont plus grosses, plus grandes et ont de plus grandes pattes en prairie qu'en forêt, idem pour les lessona (à l'exception de SVL).

Tableau 5.7 : Résultats des tests de comparaison des 3 variables morphologiques entre les grenouilles forestières et prairiales.

Echelles	Groupes	Poids		SVL		Tibia	
		W	P	W	P	W	P
<i>Globale</i>	<i>tout</i>	61631	0.000	64222	0.000	60702	0.000
	<i>RR</i>	698.5	0.001	842	0.012	560	0.000
	<i>RL</i>	25563.5	0.000	26018.5	0.001	25840	0.001
	<i>LL</i>	3484.5	0.419	3732	0.952	3624	0.699
<i>Argonne</i>	<i>tout</i>	21156	0.000	21673.5	0.000	20898.5	0.000
	<i>RR</i>	7	1.000	7	1.000	7	1.000
	<i>RL</i>	11669	0.000	11779	0.000	11317	0.000
	<i>LL</i>	1247	0.032	1330	0.091	1280.5	0.050
<i>Anjou</i>	<i>tout</i>	9614	0.000	10356	0.000	8750.5	0.000
	<i>RR</i>	576.5	0.002	694	0.014	451	0.000
	<i>RL</i>	1665.5	0.015	1677	0.017	1575.5	0.004
	<i>LL</i>	277	0.495	295	0.723	250	0.236

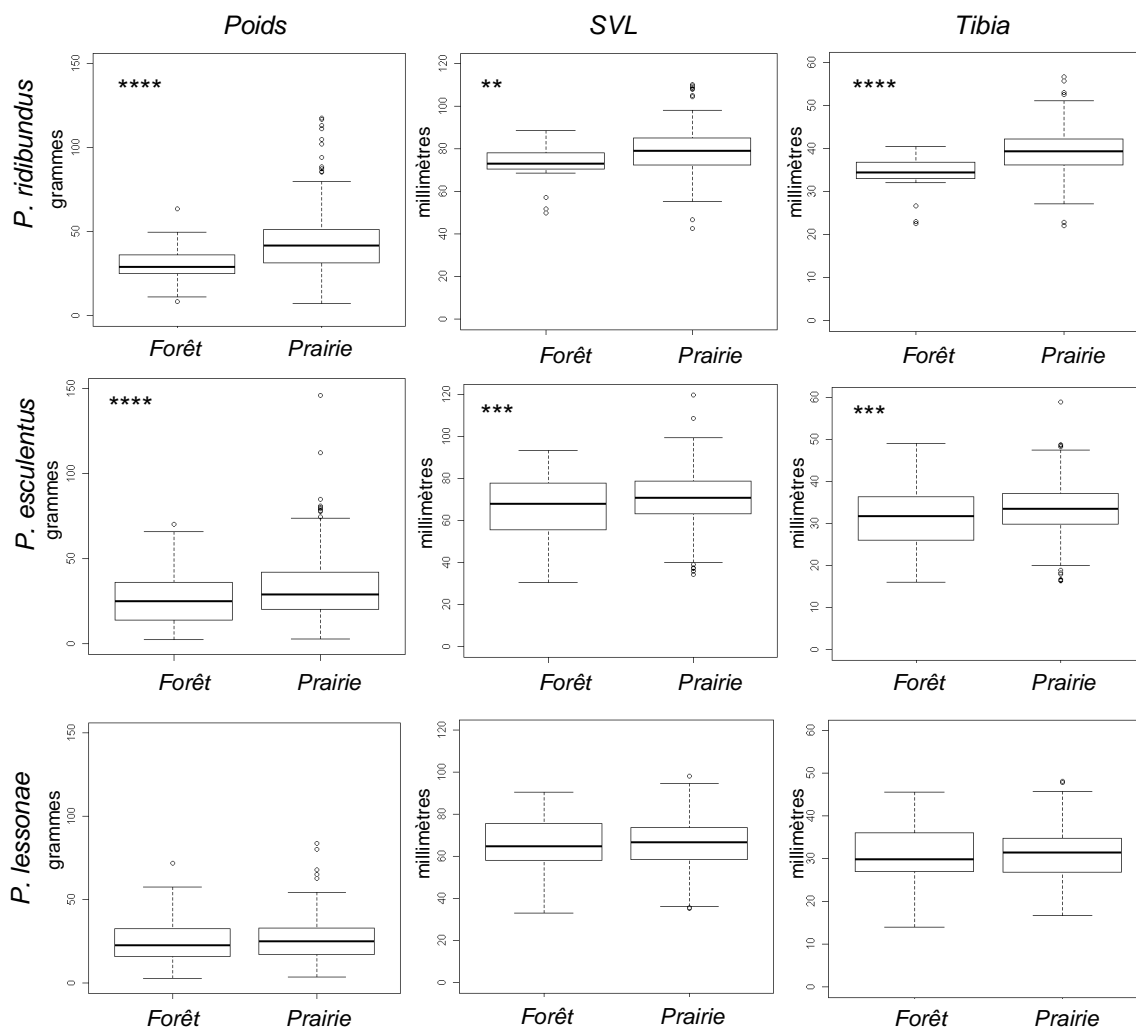


Figure 5.6 : Résultats des comparaisons des paramètres morphologiques taxon par taxon en fonction des deux types d'habitats à l'échelle globale (* = p -value < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001, and **** = p < 0.0001).

5.4. Discussion

Connaitre au mieux les exigences écologiques des différents taxa de grenouilles vertes est une étape essentielle à la compréhension des mécanismes d'hybridogénèse, de la partition de niche écologique, ainsi qu'à l'élaboration de plans de gestion adaptés. Pour ce faire, nous avons étudié plusieurs peuplements en milieu naturel, afin d'observer l'utilisation de l'habitat aquatique par les grenouilles vertes.

5.4.1. Le type d'habitat aquatique

Nos campagnes d'échantillonnages se sont effectuées dans 2 types d'habitats différents. Certaines mares sont dans un contexte paysager de type forestier (de feuillus, de conifères, ou le plus souvent mélangées), tandis que d'autres sont de type prairial (pâturées, de fauche). De plus, en comparant les paramètres (grâce aux informations relevées sur la fiche habitat, et surtout aux 10 paramètres étudiés) en fonction de la typologie, nous avons pu en partie comprendre en quoi ces deux habitats sont différents. Ainsi, les mares prairiales sont caractérisées par une alcalinité, une conductivité, une dureté totale et calcique supérieures aux mares forestières, ce qui révèle une quantité supérieure en ions. Ceci pourrait être important pour la croissance des amphibiens, principalement celle des têtards puisqu'ils se développent en phase aquatique, car ces relevés indiquent indirectement un milieu riche en élément minéraux et en ressources. En outre, une forte conductivité indique une forte concentration en ion, résultant souvent d'une évaporation de l'eau du milieu. Puisque les mares prairiales sont plus exposées aux variations circadiennes (soleil, vent, pluie), elles sont plus sujettes aux risques d'assèchement que les mares forestières (Peltzer *et al.*, 2006). Les mares forestières quant à elles ont une distance à la rivière et une altitude supérieures à celles des prairiales. Ces caractéristiques sont des paramètres « paysagers », et indiquent seulement que les mares forestières sont situées en haut de coteaux. Suite à la mise en évidence de deux types d'habitats significativement différents, nous avons pu observer l'effet de l'habitat sur les grenouilles vertes.

5.4.2. Analyse des peuplements

L'identification taxonomique des individus a révélé une composition significativement différente entre les 2 zones d'études. L'Argonne ne compte que 8 grenouilles rieuses sur les 406 individus étudiés dans ce chapitre, son peuplement étant composé essentiellement d'hybrides et de lessona (système L-E, très commun en Europe). De plus, les quelques rieuses sont toujours localisées dans des sites où sont déjà présentes les 2 autres taxa, formant un système « R-E-L », ce qui nous amène à plusieurs hypothèses quant à l'origine de ces rieuses. Ces dernières peuvent être issues d'introductions directes ou bien provenir d'un front de colonisation de grenouilles exotiques qui sont invasives (Pagano *et al.*, 2003; Schmitter *et al.*, 2007), front de colonisation qui serait encore relativement récent dans cette zone, venant du

Sud Est ou bien encore de Belgique. En effet, la présence de ces grenouilles allochtones en France a été répertoriée depuis de nombreuses années dans plusieurs zones du pays (Ljubisavljevic *et al.*, 2003; Neveu, 2004), tandis qu'en Belgique, elles ont été introduites plus récemment, vendues afin de coloniser les étangs, (Holsbeek 2010), et depuis, les naturalistes wallons ont observé la forte progression des grenouilles du « groupe *ridibundus* » (Chritiane Percsy, com pers). L'Argonne en serait alors au début de la phase de colonisation par des grenouilles rieuses d'origine exotique. La seconde explication serait que ces quelques individus sont des rieuses néo-formées, issues de la reproduction entre des hybrides, viables car possédant des génomes rieuses suffisamment différents et ne portant des mutations délétères qu'à l'état hétérozygote. Dans le cas de l'Argonne ardennaise, la faible proportion relative des grenouilles rieuses rend plus probable l'hypothèse d'individus néo-formés, mais seul le suivi dans le temps (plus une éventuelle étude génétique) permettra de trancher entre ces hypothèses.

Le peuplement de grenouilles vertes de l'Anjou est en revanche composé d'une majorité de rieuses, puis d'hybrides et de lessona. Les sites contiennent essentiellement des systèmes « R-E », mais 4 d'entre eux comptent les 3 taxa en sympatrie à des proportions relativement équilibrées, constituant un système « R-E-L ». Comme les cartes de répartition « anciennes » (e.g. Graf & Polls Pelaz 1989) ne mentionnaient pas la présence de la grenouille rieuse dans l'ouest de la France, l'explication la plus probable pour la présence relativement importante de la grenouille rieuse est qu'elle a été introduite et qu'elle colonise de nombreux milieux se comportant en taxon invasif. On ne peut toutefois exclure que, comme pour les sites ardennais, certaines rieuses soient des néo-formées issues de croisement entre hybrides.

Quelques sites ne contiennent que des hybrides, aussi bien dans l'Argonne ardennaise que dans l'Anjou. Or, les hybrides ont un mode de reproduction hybridogénétique, et sont en général présents en sympatrie avec l'une des deux espèces parentales afin d'avoir l'opportunité de reconstituer les lignées hybrides à la génération suivante (Christiansen *et al.*, 2005; Pagano *et al.*, 2001a). Donc dans ces mares, ces populations « pures » d'hybrides semblent « s'auto-entretenir ». Ce genre de cas a déjà été décrit, appelé système « E pur », par Uzzell et Berger (1975). Il a été montré que les individus *P. esculentus* de ces populations pures « contournaient » l'absence de l'espèce parentale en ne faisant pas une hybridogénèse parfaite : ils produisent une mosaïque de gamètes haploïdes et diploïdes L, LL, RL et RR, générant à la génération suivante des hybrides diploïdes et triploïdes. Si ce système E pur a été originellement imaginé comme localisé à une partie restreinte de l'Europe (Holsbeek

2009), il semble qu'il soit plus répandu qu'initialement pensé. Les populations 100% hybrides recensées pourraient appartenir à ces systèmes E pur même s'il faudrait le vérifier expérimentalement (croisement entre hybrides par exemple).

5.4.3. Partition de niches

Lors de la comparaison du peuplement des deux zones d'études, la différence la plus marquée concerne l'abondance en grenouilles rieuses, qui pourrait s'expliquer par le contexte écologique (sensu largo). La zone d'étude ardennaise est très différente de celle de l'Anjou : majoritairement composée de forêts, avec un réseau hydrographique et des zones humides relativement peu denses comparés à celles de l'Anjou. En effet, cette région est traversée par un grand fleuve, la Loire, et compte pas moins de 12 rivières. Or, il a été montré que la grenouille rieuse est majoritairement présente dans les zones à forte influence fluviale, avec des eaux fortement oxygénées, un substrat gravillonneux et un courant important (Berger, 1973; Morand, Joly, 1995; Pagano *et al.*, 2001b; Plenet *et al.*, 2000a). Ainsi, l'Anjou correspondrait parfaitement à son type d'habitat, contrairement à l'Argonne, qu'elle n'aurait pas réussi à coloniser.

Au sein des deux types d'habitats échantillonnés, le peuplement en grenouilles vertes s'est avéré significativement différent, suggérant une partition de niche, les rieuses étant préférentiellement présentes en prairie tandis que les *lessonae* et les hybrides en forêt. Bien que ce genre de ségrégation ait déjà été montré auparavant au regard d'autres variables (Pagano *et al.*, 2001b; Pagano *et al.*, 2001c; Plenet *et al.*, 2000a; Plenet *et al.*, 2000b), c'est la première fois qu'est observée une telle répartition dans deux habitats différents, l'habitat forestier ayant été peu étudié chez les grenouilles vertes. L'abondance des rieuses est liée à 5 paramètres abiotiques, tandis que celles des hybrides et des *lessonae* sont liées quasiment aux mêmes paramètres, et tous avec une corrélation dans le sens opposé à celle de l'abondance des rieuses. De plus, une des corrélations significatives montre que plus il y a de rieuses, et moins il y a d'hybrides, renforçant la congruence de cette ségrégation d'habitat. Ainsi, dans les zones à forte influence fluviale, à faible altitude, où l'eau est renouvelée régulièrement donc peu turbide et contenant peu de nitrates, on retrouve majoritairement l'espèce parentale *P. ridibundus*. Au contraire, dans les zones à faible influence fluviale, éloigné de tout cours d'eau, à plus haute altitude, où l'eau des sites est moins renouvelée contenant plus de nitrates, les hybrides et les *lessonae* sont majoritairement présents. Néanmoins, il est important de noter

que les hybrides sont présents dans tous les sites, tantôt en sympatrie avec les rieuses, tantôt avec les *Lessona*, voir même avec les trois, ce qui révèle sa grande valence écologique.

5.4.4. Effet de l'habitat sur la morphologie

Le type d'habitat semble avoir un effet sur la morphologie des grenouilles. A ce stade de notre étude il convient toutefois d'être extrêmement prudent dans l'analyse. Le seul moyen de tester un effet habitat sur la croissance des grenouilles serait 1) de l'étudier au stade larvaire en mettant des cages flottantes contenant des fratries de têtards et en regardant l'effet des 2 types d'habitat sur leur développement et/ou 2) de marquer des grenouilles juvéniles et/ou adultes en début de période aquatique et les re-capturer en fin de période aquatique afin de comparer les poids et tailles. Toutefois, si on fait l'hypothèse d'une certaine fidélité au site (ce qui est relativement admis chez les amphibiens), on peut penser que, *grosso modo*, les grenouilles adultes capturées sur un site sont représentatives des conditions écologiques de ce site et qu'il correspond peu ou prou aux conditions de leur vie larvaire.

Ainsi, lorsque l'on observe que les grenouilles rieuses et les hybrides sont significativement plus grandes, plus grosses, et ont de plus grandes pattes en milieu prairial qu'en milieu forestier, on peut imaginer qu'il s'agit d'un effet de l'habitat. Cette plus grande taille peut révéler des ressources trophiques plus riches (Shiesari, 2006).

Les milieux ouverts type prairie ont une température, une qualité de nourriture différentes des milieux fermés, qui peuvent être bénéfiques pour les populations d'amphibiens, ce qui a été mis en évidence au stade larvaire (Skelly *et al.*, 2002; Werner, Glennemeier, 1999). Néanmoins, la quantité de prédateurs est aussi supérieure en prairie (Hocking, Semlitsch, 2008), ce qui a un impact direct en réduisant le taux de survie, mais aussi indirect. En effet, les têtards réduisent leurs phases de nourrissage (Skelly, Werner, 1990), ce qui réduit leur taux de croissance (Semlitsch, 1990). Ceci est toutefois compensé par une densité qui va en diminuant (à cause des prédateurs), une faible densité favorisant une grande taille à la métamorphose. Cette plasticité et ces modifications de croissance durant la phase larvaire étant irréversibles, elles ont des conséquences durant la vie entière de l'individu (Merakova, Gvozdk, 2009; Smith, 1987a). Cette différence de taille est importante d'un point de vue évolutif, mais aussi en dynamique de population. En effet, des individus plus grands dès les stades précoces auront une meilleure survie (notamment à la première hibernation), de meilleures performances locomotrices, leur permettant de migrer plus loin, de mieux fuir

l'éventuelle dessiccation de leur milieu, ou encore les prédateurs (Newman, Dunham, 1994; Travis *et al.*, 1985). De plus, ils atteignent leur maturité sexuelle plus tôt, et se reproduiront donc plus (Berven, 1983; Scott, 1994; Smith, 1987b). La disponibilité en calcium dans les différents habitats peut aussi avoir un impact sur la morphologie des amphibiens (Lahlou, 1995). Le métabolisme du calcium est régulé par les sacs endolymphatiques, localisés chez les grenouilles vertes au niveau de la tête. Ces derniers stockent le calcium sous forme de carbonate de calcium, qui peut être mobilisé pour le bon développement de l'individu. Or, le milieu agit sur l'équilibre calcique des Anoures. Dans un environnement pauvre en calcium, comme les milieux temporaires, les amphibiens vont consommer leurs réserves constituées dans les sacs endolymphatiques, puis si cela n'est pas suffisant, vont mobiliser les sels calciques de leur squelette, ayant pour conséquence une croissance amoindrie (Lahlou, 1995). On peut donc supposer que la petite taille des amphibiens en milieu temporaire traduirait ce déficit en calcium, ce qui pourrait se vérifier grâce à une étude des classes d'âges pour chaque type d'habitat.

Une autre hypothèse expliquant ces différences de taille serait une sélection des phénotypes plus grands en milieu prairial. Les individus peuvent être soumis à des pressions sélectives différentes en prairie, qui vont alors favoriser un phénotype plutôt qu'un autre (Rose, Lauder, 1996). Ces deux hypothèses pourraient être vérifiées par une analyse faunistique fine de chaque site, ainsi que des expériences de transplantation réciproque afin de vérifier si ces différences morphologiques sont dues à de la plasticité phénotypique ou à une adaptation locale.

Bien qu'ayant un échantillonnage de grenouilles vertes relativement conséquent (plus de 750 individus), nos résultats sont issus de l'observation de 26 sites, dont 8 sites sont localisés en forêt contre 18 en prairies. Cela réduit la puissance de nos analyses statistiques lors de l'étude de l'effet du type d'habitat. Il conviendrait donc d'élargir l'échantillonnage de sites notamment forestiers. L'étude de l'utilisation de l'habitat à différentes échelles nous révèle combien il est important d'avoir un échantillonnage le plus large possible. En effet, le peuplement ardennais ne contenant que 8 grenouilles rieuses, les analyses des abondances relatives ne montrent généralement aucune significativité car le peuplement est déséquilibré au regard des 3 taxa présents, contrairement au peuplement de l'Anjou. Ce dernier étant constitué de manière équilibrée des 3 taxa est la zone la plus informative. L'échelle globale est

généraliste et semble être un assez bon bilan, tandis que l'échelle locale nous permet de tenir compte des spécificités des régions afin d'adapter au mieux un éventuel plan de gestion.

5.5. Conclusion

Lors de cette étude, nous avons pu mettre en évidence une répartition différentielle des grenouilles vertes du complexe *P. esculentus* en fonction du type d'habitat. De plus, nous avons pu affiner les connaissances actuelles sur les exigences écologiques des différents taxa, en mettant en évidence de nouveaux facteurs abiotiques influençant leur abondance tels l'altitude, la distance à la rivière, le taux de nitrates, l'alcalinité, les duretés. Les grenouilles rieuses sont majoritairement présentes dans des milieux à forte influence fluviale, donc dans ou près des rivières. Ces milieux sont connus et suivis tant au niveau qualitatif que quantitatif par des structures telles l'Agence de l'eau, les Syndicats de bassins versant. En revanche, les grenouilles de lessona, considérées comme vulnérables par l'UICN, sont plutôt présentes dans des milieux fermés, éloignés des rivières, et très souvent méconnus. L'habitat des lessona est moins suivi et par conséquent peu protégé, ce qui peut être dommageable pour l'avenir de cette grenouille verte. Il est donc important de poursuivre les inventaires de mares et zones humides susceptibles d'abriter cette espèce, et de tenir compte de cette répartition lors de la mise en place de plan de gestion.

Chapitre 6

Phenotypic plasticity and adaptation ability: Larval performances of *Pelophylax esculentus* (Amphibia, Ranidae) tadpoles from two different habitats

Dans le chapitre précédent, nous avons pu mettre en évidence un effet de l'habitat sur la répartition des différents taxa de grenouilles vertes, ainsi que sur leur morphologie. Cette utilisation différente de l'habitat, suggérant une partition de niche, vient en concordance avec d'autres études ayant observé ce phénomène via différents paramètres de l'habitat, et nous amène à nous interroger au niveau populationnel. En effet, y a-t-il un effet de l'habitat sur des populations différentes appartenant à un même taxon ? Les populations sont elles adaptées localement à leur habitat, ou les grenouilles sont elles capables de plasticité phénotypique lorsqu'on les change d'habitat ? Pour répondre à ces questions, nous avons choisi de procéder à une transplantation réciproque lors d'un élevage expérimental en conditions contrôlées au sein d'une animalerie. Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique à soumettre.

Phenotypic plasticity and adaptation ability: Larval performances of *Pelophylax esculentus* (Amphibia, Ranidae) tadpoles from two different habitats

Cécile Patrelle^{1,2}, Stéphane Sourice¹, Olivier Pays¹, Audrey Chaput-Bardy³, Alain Pagano¹

¹ LEESA, GECCO, Université d'Angers, PRES UNAM, Campus Belle Beille, 2 bd Lavoisier, 49045 Angers France.

² 2C2A-CERFE, 5 rue de la Héronnière, 08240 Boulton-aux-Bois, France.

³ UMR 7179 CNRS-MNHN Equipe EvolTrait, 4 avenue du Petit Château, 91800 Brunoy France

Authors addresses:

*Author for Correspondence: Cécile Patrelle: cecile.patrelle@gmail.fr; 2C2A-CERFE, 5 rue de la Héronnière, F-08240 Boulton-aux-Bois, France, Tel: +33 2 41 73 54 37, fax : +33 2 41 73 53 52;

*Author for Correspondence: Alain Pagano: alain.pagano@univ-angers.fr; LEESA, GECCO, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France Tel: +33 2 41 73 50 82; fax : +33 2 41 73 53 52

Stéphane Sourice : stephane.sourice@univ-angers.fr ; LEESA, GECCO, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France Tel : +33 2 41 73 54 10, fax : +33 2 41 73 53 52

Olivier Pays : olivier.pays@univ-angers.fr ; LEESA, GECCO, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France Tel : +33 2 41 73 52 61, fax : +33 2 41 73 53 52

Audrey Chaput-Bardy : chaput@mnhn.fr ; UMR 7179 CNRS-MNHN Equipe EvolTrait, 4 avenue du Petit Château, 91800 Brunoy France Tel : +33 1 60 47 92 02 ; fax : +33 1 60 46 57 19

Running title: Phenotypic plasticity of *Pelophylax klepton esculentus*

ABSTRACT

Hybrid zones are known to be places where important evolutionary events occur. Thus, we investigated intra-specific variability of water frog hybrids in response to their environmental modifications. We examined through six crosses (forest, meadow, or mixed origins) the potential effect of habitat of origin on larval development of *Pelophylax klepton esculentus* tadpoles. We thus exposed them to 20°C and 26°C rearing conditions, temperatures similar, respectively, to those recorded in a field survey of forest and meadow habitats. Tadpoles raised at 26°C had a better survival and growth rates, a smaller size and quicker metamorphosis than those raised at 20°C. Larval performances varied regarding habitat of origin of tadpoles : forest tadpoles survived better, were smaller and metamorphosed earlier than those from meadow at 20°C. However meadow and mixed tadpoles had a better proportion of survivors at 26°C. *P. kl. esculentus* tadpoles had different larval performances according to their habitat of origin. Because they exhibited a better survival rate, forest tadpoles had a higher phenotypic plasticity than meadow ones. It suggests a local adaptation of meadow tadpoles to their habitat. Therefore, the evolutionary success of these widespread hybrids might be due to the existence of several different lineages.

RESUME

Les zones hybrides sont connus pour être des lieux où des événements évolutifs importants se produisent. Ainsi, nous avons donc étudié la variabilité intra-spécifique potentielle des grenouilles vertes hybrides en réponse à des modifications de leur environnement. Nous avons examiné par le biais de six croisements (forêt, prairie, mixte) l'effet potentiel de l'habitat d'origine sur le développement larvaire des têtards *Pelophylax klepton esculentus*. Nous les avons donc exposés à un élevage à 20°C et 26°C, températures similaires respectivement à celles enregistrées lors d'un suivi de terrain d'habitats forestiers et prairiaux. Les têtards élevés à 26°C ont de meilleurs taux de survie et de croissance, une taille plus petite et une métamorphose plus rapide que ceux élevés à 20°C. Les performances larvaires varièrent en fonction de l'habitat d'origine des têtards: les têtards forestiers ont mieux survécu, étaient plus petits et se sont métamorphosés plus tôt que les prairiaux à 20°C. Cependant têtards prairie et mixtes ont une meilleure proportion de survivants à 26°C. Les têtards *P. kl. esculentus* ont des

performances larvaires différentes en fonction de leur habitat d'origine. Parce qu'ils ont un meilleur taux de survie, les têtards forestiers ont une plus grande plasticité phénotypique que les prairiaux. Ceci pourrait suggérer une adaptation locale des têtards prairiaux à leur habitat. Par conséquent, le succès évolutif de ces hybrides très répandus pourrait être due à l'existence de plusieurs lignées différentes.

6.1. Introduction

Hybridization events, defined as crossing of differentiated lineages or taxa, occur in almost all sexually reproducing groups of organisms (Mallet, 2005), and are regular and probably important in nature (Seehausen, 2004). Mallet et al. (2005) estimated that at least 10% of animal species and maybe 25% of plant species, mostly the youngest species, are known to hybridize in nature. Long-term consequences of intra-specific hybridization depend on the genetic basis of hybrid fitness (Lippman, 2007). Hybrids are commonly less viable, sterile or with low fitness, inferior to those of parental species, but also can exhibit higher fitness (Fitzpatrick, Bradley Shaffer, 2007; Parris *et al.*, 1999; Rieseberg *et al.*, 2003). In this latter case, this hybrid vigour, called Heterosis, is due to a higher heterozygotic rate (Moore, 1977; Tunner, Nopp, 1979), and can permit hybrid lineages to colonize new niches or allow speciation through parallel selection pressures and divergent natural selection (Gross, Rieseberg, 2005; Robbins *et al.*, 2010). Thus, initial hybridization event is an admixture which can create new phenotypes potentially favouring a great phenotypic plasticity, and an important evolutionary success observed in certain hybrid lineages.

Phenotypic plasticity has been defined as the ability of an organism to react to an environmental input with a change of form, state, movement, or rate of activity (West-Eberhard, 2003). Plasticity is intra-individual variation (Williams, 1992), with the dual influence of environment and genes. This plastic response can be active or passive, and is often adaptive, influencing fitness (Marshall *et al.*, 1986; Scheiner, 1993; Sultan, 2001) but it is not always the case (fitness-neutral definition of plasticity) (Schlichting, Pigliucci, 1998). Phenotypic plasticity encompasses various behavioural, physiological, morphological and life history modifications (Pigliucci, 2001; West-Eberhard, 2003). Reaction norms of genotypes, the theoretical tool widely used to measure plasticity, have been described as the basis for the evolution of phenotypic plasticity (Gotthard, Nylin, 1995). Plasticity can induce reversible

responses, diel or seasonal changes, also called “flexibility”, and irreversible responses (Stearns, 1989), such as modification during the early stage of ontogeny as for example a smaller size in adult amphibians and insects due to an earlier metamorphosis (Smith, 1987). The interesting is whether such plasticity facilitates adaptive evolution in modified or degraded habitats (Johansen-Morris, Latta, 2008; Rieseberg *et al.*, 2003). Phenotypic plasticity is particularly important in organisms with a complex life cycle such as amphibians. In Western Europe, amphibians generally exhibit a classical biphasic life cycle, with an aquatic reproductive period in spring and a terrestrial phase of varying durations between species. The larvae are confined to ponds until metamorphosis, which subjects them to changing aquatic conditions (Hocking, Semlitsch, 2008). After metamorphosing, juveniles disperse and come back to aquatic sites for undergoing reproduction, exhibiting, for several amphibian species, a very strong site fidelity (Blaustein *et al.*, 1994). Thus, herpetologists consider aquatic sites as representative of the population level (Barault, 2003). This high pond fidelity suggests that populations may exhibit local adaptation to their pond mainly when migration rates are low across populations. On the other hand, many species exhibit patchy distribution across the landscape matrix, connected through migration, and exploit very variable environments (Seppa, Laurila, 1999; Sinsch, 1992; Sjogren, 1991; Vos, Chardon, 1998). Therefore, high phenotypic plasticity in these species rather than local specialization is expected (Sultan, Spencer, 2002). Thus, it is essential to compare life history traits among populations originating from different habitats to dissociate local adaptation from phenotypic plasticity.

Because they are sensitive to environmental changes, amphibians are strongly concerned by worldwide decline (Blaustein *et al.*, 1994; Cushman, 2006; Houlihan *et al.*, 2000; Schmeller *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2004). Biotic factors can act as cues to regulate larval development, such as aquatic predation pressure, food availability, intra and interspecific larval densities (Anholt *et al.*, 2005; Laurila, Kujasalo, 1999; Tejedo, Reques, 1994), and aquatic abiotic parameters such as temperature variation, water volume and pond dessication risks, pH, ultraviolet radiation, oxygen availability, dissolved carbonic acid and conductivity (Cummins, 1989; Newman, 1988; Pahkala *et al.*, 2002; Plenet *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000).

To observe hybrids evolutionary success, we focus on European water frogs (Amphibia: Ranidae), a group characterized by the frequent and abundant natural occurrence of hybridization events (Graf, Polls Pelaz, 1989, Pagano *et al.* 2001). The most widespread hybridization complex, very common in Central and Eastern Europe, involved *Pelophylax*

Pseudis klepton esculentus (Graf, Polls Pelaz, 1989), hybrid resulting from mating between the lake frog *P. ridibundus* Pallas 1771 and the pool frog *P. lessonae* Camerano 1882. This natural hybrid is fertile and exhibits a hybridogenetic reproductive mode characterized by exclusion of *lessonae* genome in the hybrid germ line and by the production of clonal gametes which only contain the *ridibundus* genome (Graf, Polls Pelaz, 1989). They coexist with *P. lessonae* on which depends the restoration of hybrid lineages (Uzzell, Berger, 1975). Moreover, hybrids use many different habitats characterised by variation in biotic and abiotic factors (Pagano *et al.*, 2001). *P. kl. esculentus* evolutionary success was explained by its good fitness in a large range of habitat, including ecotones and intermediate habitats of parental species, better fitness than one or both parental species. Several studies evidenced a spontaneous heterosis effect (Berger, Uzzell, 1980; Gutmann *et al.*, 1994; Hotz *et al.*, 1999). As hybrid fitness is a central point regarding evolutionary ecology of an hybrid zone, it has been studied in water frog mainly at the inter-taxa level, comparing the hybrid to parental species. However, it is known that the different hybrid lineages can vary in genotype but also regarding ecological performance levels (Hotz *et al.* 1999; Pagano *et al.*, 2008; Semlitsch *et al.*, 1997). Surprisingly, such intra-taxa variability has been poorly studied. Several lineages were experimentally compared from their life history traits, but they belonged to two populations sharing similar ecological conditions. To our knowledge, hybrids were never compared when belonging to very distinct habitats. A goal should be to study intra-hybrid variation in order to determine whether the population level may influence variation in life history traits, and also hybrid fitness, to get a better view of the complexity evolutionary processes occurring in water frog hybrid zone.

In this context, the aim of our study was to observe such intra-hybrid variations in life history traits of *P. kl. esculentus* tadpoles originating from two different habitats (considered also as different populations). As it has been observed bigger size of hybrids from meadow in respect to those from forest, and a very contrasting temperature water between these two types of pond (Patrelle, 2010), we choose to compared six crosses, i) tadpoles getting parents from meadows, ii) tadpoles having parents from forest, iii) a mixed cross with one parent from each habitat type. We thus submitted them to a reciprocal transplant experiment with temperature as a factor, and observed reaction norms measuring several traits (survival, time to metamorphosis, size at metamorphosis and growth rate). A first hypothesis was that the two populations may differ in their life history traits according to temperature, and second hypothesis, the magnitude and intensity of responses from the two populations may differ,

demonstrating in such case variation of their acclimation ability. Thus, if tadpoles originating from two different habitat types (or populations) present different acclimation abilities, they will be affected differently by treatment (temperature), and their responses will be varied. If tadpoles share the same acclimation abilities whatever their habitat, we may observe the same range of reaction, and no significant difference in larval development for the two temperatures. Tadpoles from mixed crosses are supposed to share characteristics of both forest and meadow crosses, and if it is not, it would suggest a parental effect (females if their react always like forest tadpoles, male if they react like meadow one).

6.2. Materials and methods

FIELD

Adult water frogs were collected during June 2007 in a pond surrounded by grazed grassland close to Germont, called "meadow pond" (X=782.880 / Y=2495.640, Lambert II projection, system WGS 84), and in a pond surrounded by 4000 hectar of forest in Boulton-aux-Bois, called "forest pond" (X=780.468 / Y=2493.318). Both sites are 4 km distant (euclidean distance), and located in the Ardennes region, France. During June and July 2007, we recorded superficial water temperatures (at 50 cm from the edge, and at 20 cm depth) at 1 p.m. in 16 ponds of this region (6 from closed forest, 10 from meadow in open field) including ponds of sampled frogs. According to this field study, we chose median temperatures to mimic natural conditions: 20°C as the forest's reference temperature, and 26°C as the meadow's reference temperature (Figure 1).

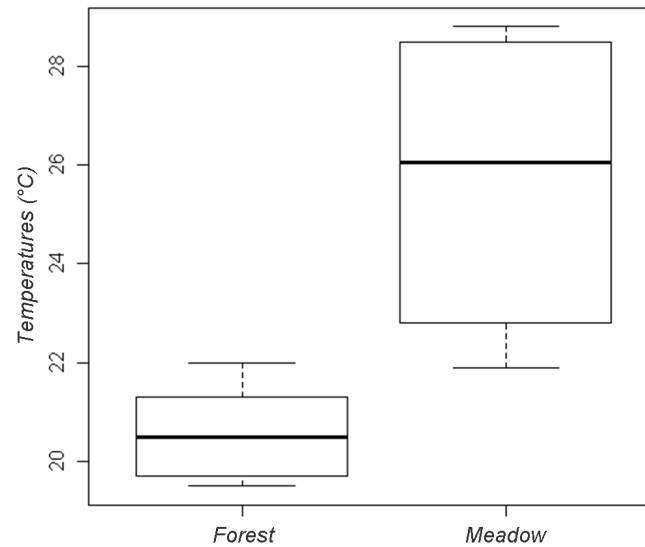


Figure 1: Water temperature variation in the two type of habitat surveyed; Boxes define the interquartile range (IQR), horizontal lines represent the median, and whiskers indicate the maximum and minimum values within 1.5 times the IQR.

EXPERIMENTAL CROSSES

Before experimental crosses, taxon of each sampled frog was determined from a toe using allozymes (LDH-B lactate deshydrogenase) (Hotz, 1983; Lodé, Pagano, 2000) and the RFLP method based on ITS2 (Patrelle *et al.*, in press). Two *P. lessonae* males, one for each habitat type, were artificially crossed with four *P. kl. esculentus* females (two for each habitat), giving rise to hybrid *P. kl. esculentus* tadpoles – such hybridisation often occurs naturally in ponds (L-E system, see e.g. Graf & Polls Pelaz 1989, Pagano et al. 2001). The male from the forest pond was crossed with two females from the same forest pond (offspring were called forest tadpoles). The male from the meadow pond was crossed with two females from the same meadow pond (meadow tadpoles), and with two females from the forest pond (mixed tadpoles). Then there was a total of six different clutches. Eggs were incubated in the laboratory in dechlorinated and oxygenated tap water at 20 ± 1 °C. The tadpoles hatched 10 days after fertilisation. Hatchlings were then reared in tanks until reaching stage 25 (free swimming; Gosner 1960). This was considered as the experiment start (T0).

EXPERIMENTAL PROCEDURE

After reaching free-swimming stage 25 (Gosner, 1960), each clutch was randomly divided into 6 groups of 9 tadpoles, and kept in large tanks filled with aerated tap water, continuously renewed: 3 groups were reared at 20°C (± 1 °C), and the other 3 groups at 26°C (± 1 °C). A total of 324 tadpoles were raised in 36 tanks. Tadpoles were at a 0.23 individuals/L density as in

natural conditions (Thurnheer, Reyer Heinz-Ulrich, 2000), and were fed with a mixture of rabbit and fish food *ad libitum*, until the onset of metamorphosis (developmental stage 42). The water quality (i.e. nitrate and nitrite concentration, pH, and conductivity) was checked twice a week during the experiment to keep tadpoles under constant conditions. Food and faeces were regularly removed to avoid microbial development. Tanks were also daily inspected for the removal of dead larvae.

MEASURES OF PERFORMANCE

The proportion of survivors reaching metamorphosis, time to metamorphosis, body mass at metamorphosis, and growth rate were used as components of fitness to measure the effects of habitat type and temperature treatment (Gervasi, Foufopoulos, 2008; Hocking, Semlitsch, 2008; Hotz *et al.*, 1999; Van Buskirk *et al.*, 1997). When tadpoles began to metamorphose, all tanks were checked each day for newly metamorphosed individuals. Metamorphosis was defined as the emergence of at least one forelimb (stage 42; Gosner 1960). At metamorphosis, metamorphs were removed and weighed to the nearest 0.1 mg and the number of days since hatching was recorded.

STATISTICAL ANALYSES

Individual values with no transformation were used as units for analysis. Three dependent variables were recorded for each individual; time to metamorphosis, mass at metamorphosis, and survival. As distribution of residuals is not normal (Kolmogorov-Smirnov test), non-parametric tests were used. Analyses were performed for all tadpoles in a first step, and then with temperature segregation. To test temperature effect, we compared the three dependent variables for the two temperatures using a Wilcoxon Man Whitney procedure, with the Wilcoxon rank-sum test (Crawley M., 2007). To test a habitat of origin effect, we compared dependent variables of the three crosses using the Kruskal Wallis test, and when significant differences were observed (indicated as $p < 0.05$), Mann-Whitney pairwise comparison (Bonferroni corrected) was used. For the proportion of survivors, the chi-square method of Pearson was performed.

6.3. Results

TEMPERATURE EFFECT

The overall survival rate for all experiments was 86.73%. At 26°C survival rate was significantly higher than at 20°C (95.68% vs 77.78%; chi² de Pearson test, $\chi^2 = 21.023$, $df = 1$, $p < 0.0001$). Controlling for habitat of origin effect, forest tadpoles presented the same survival rate for both temperatures ($\chi^2 = 3.375$, $df = 1$, $p = 0.066$, Figure 2). However meadow and mixed tadpoles showed a significantly better proportion of survivors at 26°C ($\chi^2 = 7.039$, $df = 1$, $p = 0.008$; and $\chi^2 = 6.721$, $df = 1$, $p = 0.009$ respectively, Figure 2).

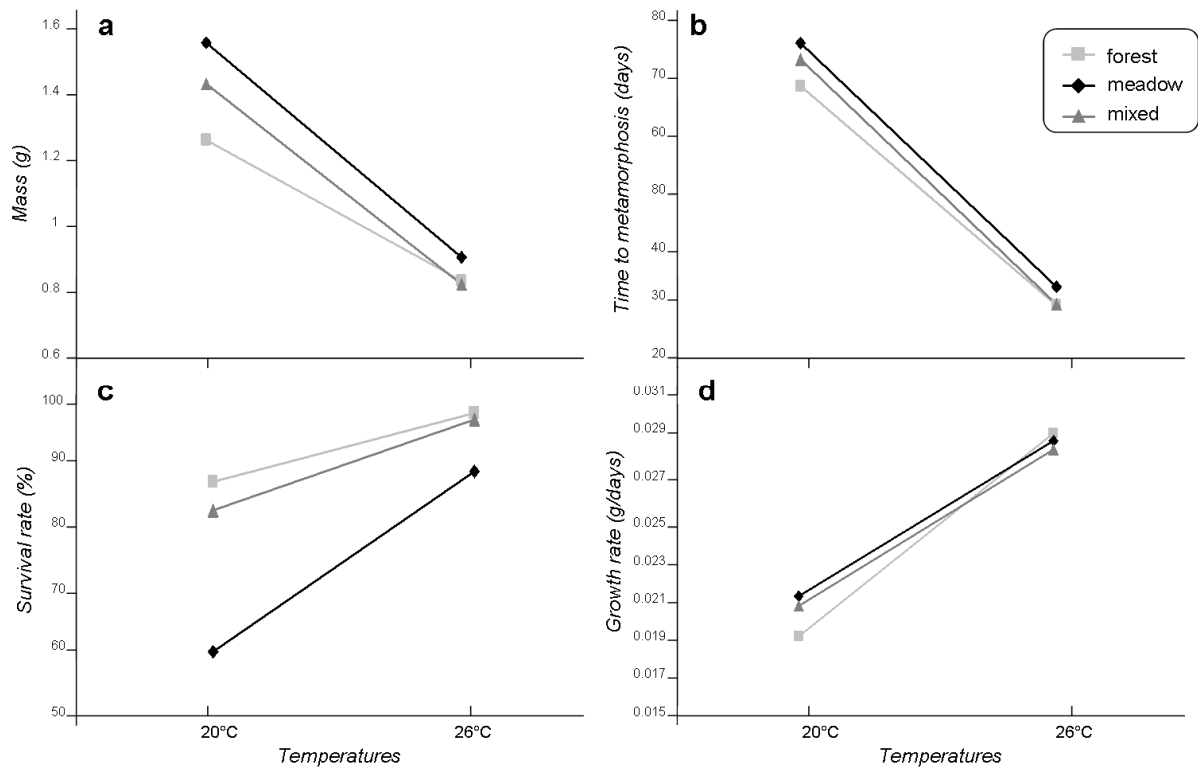


Figure 2: Size (a), Time to metamorphosis (b), Survival rate (c) and Growth rate (d) of tadpoles from the different habitats (forest, meadow, mixed) at the two temperature conditions. Plotted values are the means for each cross.

All tadpoles raised at 26°C were significantly smaller than those at 20°C (Table 1). The same result was observed when controlling for habitat of origin effect. Tadpoles raised at 26°C from forest, meadow, and mixed crosses were significantly smaller than those raised at 20°C (Table 1, Figure 2).

Concerning larval period, tadpoles raised at 26°C metamorphosed significantly earlier than those raised at 20°C (Table 1). Controlling habitat of origin effect, tadpoles raised at 26°C from forest, meadow and mixed crosses metamorphosed earlier than those raised at 20°C (Table 1, Figure 2).

Growth rates for all tadpoles, but also controlling habitat of origin, were significantly higher at 26°C (0.0028 to 0.0029 g/days) than those at 20°C (0.0019 to 0.002 g/days) (Table 1, Figure 2),

Table 1: Wilcoxon Mann-Whitney tests for temperature effect regarding either all tadpoles or according to their habitat of origin. Variables tested : mass at metamorphosis (Mass), time to metamorphosis (Time), and growth rate (Growth).

Variables	Crosses	Mean	SD	W	P
Mass (g)	All 20°C	1,4	0,26	18646,5	<0.0001
	All 26°C	0,85	0,2		
	Forest 20°C	1,26	0,19	2337	<0.0001
	Forest 26°C	0,84	0,2		
	Meadow 20°C	1,55	0,28	830	<0.0001
	Meadow 26°C	0,91	0,21		
	Mixed 20°C	1,43	0,26	3532,5	<0.0001
	Mixed 26°C	0,83	0,19		
Time (days)	All 20°C	70,53	8,73	19527	<0.0001
	All 26°C	29,81	5,86		
	Forest 20°C	67,11	6,64	2491	<0.0001
	Forest 26°C	29,02	5,08		
	Meadow 20°C	74,48	7,22	864	<0.0001
	Meadow 26°C	32,22	7,56		
	Mixed 20°C	71,73	9,93	3640	<0.0001
	Mixed 26°C	29,31	4,52		
Growth (g/days)	All 20°C	0,0201	0,0045	1692,5	<0.0001
	All 26°C	0,0285	0,0042		
	Forest 20°C	0,0191	0,0031	53,6	<0.0001
	Forest 26°C	0,0289	0,0044		
	Meadow 20°C	0,0210	0,0049	100,5	<0.0001
	Meadow 26°C	0,0286	0,0037		
	Mixed 20°C	0,0206	0,0053	453,5	<0.0001
	Mixed 26°C	0,0282	0,0043		

HABITAT OF ORIGIN EFFECT

Rates of survival significantly differed with regards to habitat of origin of tadpoles (chi² Pearson test, $\chi^2 = 17.057$, $df = 2$, $p = 0.0002$). Forest and mixed tadpoles showed no significantly different survival rates (92.6% vs 90.37%, $\chi^2 = 0.1466$, $df = 1$, $p = 0.702$), and better survivors than meadow tadpoles (72.84%, with respective chi² tests, $\chi^2 = 12.085$, $df = 1$, $p = 0.0005$; and chi² tests, $\chi^2 = 10.204$, $df = 1$, $p = 0.0014$). Controlling temperature treatment,

there was no habitat of origin effect on survival rate at 26°C (chi² Pearson test, $\chi^2 = 3.8133$, df = 2, p = 0.1486) while we observed an habitat of origin effect at 20°C ($\chi^2 = 11.7337$, df = 2, p = 0.0028). Forest and mixed tadpoles had no different survival rate ($\chi^2 = 0.172$, df = 1, p = 0.678), and exhibited a higher survivor proportion than meadow tadpoles (with respectfully chi² test, $\chi^2 = 8.127$, df = 1, p-value = 0.0044; and chi² test, $\chi^2 = 5.691$, df = 1, p = 0.0171).

We observed significant differences in mass at metamorphosis according to habitat of origin (Table 2, Figure 2). Meadow tadpoles were significantly bigger than those from forest (W = 5876, p = 0.0364, Table 1, Figure 2), but not bigger than mixed ones (W = 2926, p = 0.1254, Table 1, Figure 2). There was no difference in mass between forest and mixed tadpoles (W = 5876, p >0.9, Table 1, Figure 2). Controlling temperature treatment, there was a significant habitat of origin effect on mass at metamorphosis at 26°C (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 6.3191$, df = 2, p = 0.0424, Table 1). Meadow tadpoles were bigger than those from mixed crosses (W = 805.5, p = 0.0706, Table 1, Figure 2). Mass of forest and mixed tadpoles was not significantly different (W = 1841.5, p >0.9, Figure 2), nether those of forest and meadow (W = 594.5, p = 0.0652, Table 1, Figure 2). Moreover, significant mass differences were observed for tadpoles raised at 20°C (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 20.501$, df = 2, p < 0.0001; Table 2). Meadow tadpoles were significantly bigger than those from forest (W = 250.5, p < 0.0001, Table 1, Figure 2) and those from mixed tadpoles (W = 524, p = 0.0067, Table 1, Figure 2). Nevertheless, there was no difference between forest and mixed tadpoles (W = 785, p = 0.1997, Table 1, Figure 2).

Table 2: Kruskal-Wallis tests comparing the three crosses (habitat of origin effect) at all temperatures. Variable tested: mass at metamorphosis (Mass), time to metamorphosis (Time), and growth rate (Growth).

Variables	χ^2	df	P
Mass (g)	6.4225	2	0.0403
Time (days)	3.9874	2	0.1362
Growth (g/days)	1.884	2	0.391

Time to metamorphosis of all tadpoles was not affected by habitat of origin (Table 2). Controlling temperature effect, there was no significant differences between time to metamorphosis at 26°C (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 5.595$, df = 2, p = 0.0609, Table 1, Figure 2). However, distributions of time to metamorphosis at 20°C were affected by habitat of

origin effect (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 15.453$, $df = 2$, $p = 0.0004$, Table 1, Figure 2). Forest tadpoles metamorphosed earlier than those from meadow ($W = 292.5$, $p = 0.0004$, Table 1, Figure 2), and those from mixed crosses ($W = 845.5$, $p = 0.0252$, Table 1, Figure 2). Time to metamorphosis were not significantly different between meadow and mixed tadpoles ($W = 566$, $p = 0.484$, Table 1, Figure 2).

Growth rate for all tadpoles was not affected by habitat origin (Table 2). Controlling temperature effect, we do not observe habitat of origin effect, neither at 26°C (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 0.282$, $df = 2$, $p = 0.869$, Table 1, Figure 2) despite the effect on mass, nor at 20°C ($\chi^2 = 4.127$, $df = 2$, $p = 0.127$, Table 1, Figure 2).

6.4. Discussion

LARVAL PERFORMANCE AND RELATION TO FITNESS

Phenotypic plasticity is the ability of one genotype to express alternative phenotypes to match with current environment (Agrawal, 2001; Nylin, ~~Gottard, 1998~~; Pigliucci, 2005). It is measured by the observation of reaction norms. We wondered if hybrid tadpoles originating from different habitats show intra-specific variability when they are submitted to temperature variation. In such case, it would indicate different level of flexibility or local adaptation.

In our study, high survival rate in tadpoles under both treatments indicated that experimental conditions (density, temperature) remained within tolerance range of tadpoles from both habitat types. Both temperatures chosen to mimic natural conditions are indeed inferior to the limit of 42°C that skeletal muscle can tolerate (Litvinchuk *et al.*, 2007), and inferior to maximum temperatures observed in natural conditions (Pagano *et al.*, 2001).

TEMPERATURE EFFECT

Survival depended on temperature and was better at 26°C than at 20°C. This result indicated that tadpoles were in suitable conditions, because in amphibians, survival increased with temperature (Govindarajulu, Anholt, 2006).

Due to their important canopy cover, forest ponds are supposed to be constant habitats regarding small temperature variations (Jakob *et al.*, 2003; Matlack, 1997). In contrast, meadow ponds, more sunny, show important temperature variations related to weather oscillation (Peltzer *et al.*, 2006). Consequently, a higher phenotypic plasticity in meadow

tadpoles can be expected. Although we evidenced more variation in meadow tadpoles' life history traits (see range distribution (SD) in Table 1), forest tadpoles cope better with low temperature than tadpoles meadows one. This is congruent with other studies, like those of Hocking et al. (2008), who observed a better survival rate when they tested clear-cut effect on larval development in gray tree frogs (*Hyla versicolor*).

According to distributions of mass at and time to metamorphosis, all tadpoles were very sensitive to temperature. In natural conditions, high temperature seems to be a signal to accelerate larval development and tadpoles undergo metamorphosis as soon as possible. Our study would mean that, whatever habitat of origin of individuals, tadpoles are able to undergo metamorphosis with such stimuli.

As expected, at 26°C tadpoles had an important growth rate, underwent metamorphosis earlier and were smaller than those raised at 20°C, trade-off already observed in most amphibian species, especially *P. kl. esculentus* (Blaustein et al., 2001; Brady, Griffiths, 2000; Jorgensen, Sheil, 2008; Negovetic et al., 2001). Reducing larval period by realizing an earlier metamorphosis can increase fitness because individuals can avoid pond dessication. However, individuals that metamorphose earlier usually reach a smaller size at metamorphosis, that is considered as negative for their fitness, because they may reach reproductive maturity later (Smith 1987) and get reduced fecundity (Berven, 1981; Howard, 1980) and survival (Altwegg, Reyer, 2003; Berven, 1983). For instance, individuals exposed to desiccation had shorter development times, were smaller, had weaker cellular immune system responses to phytohaemagglutinin, and had lower total leucocyte numbers than individuals from control groups (Gervasi, Foufopoulos, 2008). Thus, this phenotypic plasticity that confers immediate benefits in the larval environment may have long-term accumulated costs in later stages (Gervasi, Foufopoulos, 2008). As pond temporarity could be more important with global warming, these results are important for amphibian management. Frogs from *Pelophylax* group are able to adjust their development in response to external stimuli, like temperature, water depth, and temporarity, osmolarity, as other amphibians (Bancroft et al., 2008; Gomez-Mestre, Tejedo, 2005; Jakob et al., 2003). Our data indicates that tadpoles are able to support warm temperature whatever their habitat of origin.

HABITAT OF ORIGIN EFFECT

Hybrids *P. kl. esculentus* are widespread in Europe and considered as ubiquitous. Moreover, adult amphibians are though to reproduce every year in the same pond they were born (strong

site fidelity). If so, it can be expected that there is selection of adaptive traits to the environmental characteristics of their pond (local adaptation) in comparison to another population inhabiting another pond with contrasting environmental characteristics, resulting in variabilities in response to reciprocal transplantation. If not, no differences in life history traits might be observed among tadpoles originating from different habitats.

Regarding habitat of origin, our results evidenced differences in larval development that fit well with the characteristics of the habitat they originate from. Mixed tadpoles, which had mothers from forest and father from meadow, exhibited intermediate larval performances, suggesting an absence of bias due to a parental effect. Forest tadpoles had a better proportion of survivors at 20°C than tadpoles from meadows while they were smaller to meadow ones, whatever temperatures, but underwent metamorphosis faster only at 20°C. These results match field observations on adult hybrids, where meadow frogs were greater (Patrelle 2010). Meadow tadpoles showed less survivors at 20°C and were the largest individuals. This result is very important for meadow tadpoles fate, because this larger size at metamorphosis can result in better physiological and locomotor performance in the terrestrial environment (Newman, Dunham, 1994), but also higher proportion of juvenile survivors (Scott 1994), earlier first reproduction, and larger size at first reproduction (Smith 1987, Scott 1994). Nevertheless, growth rates were not affected by habitat of origin, that is relativizing size result since this variable is the ratio of mass over time to metamorphosis. Survival to metamorphosis reflects juvenile recruitment and the potential for population growth (Berven, 1990). However, the poor survival rate of meadow tadpoles at 20°C suggests that they do not cope well at low temperatures, and they may be locally adapted to their habitat with warmer temperatures.

Thus, these hybrid tadpoles showed variations in intensity of responses according to their habitat origin face to reciprocal transplantation. These differences of larval performances according to the habitat of origin have to be related to the putative existence of several hybrid lineages. Indeed, the success and the evolutionary fate of hybridogenetic lineages of *P. kl. esculentus* are explained by both a generalistic heterosis hypothesis (General Purpose Genotype model, noted GPG) (Baker H., 1965; Schultz, 1971), and an alternative hypothesis, the habitat segregation hypothesis (Frozen Niche Variation model, noted FNV) (Pagano *et al.*, 2008; Plenet *et al.*, 2005; Vrijenhoek, 1979). The GPG model predicts that a hybrid lineage will be able to exploit different habitats with contrasting ecological characteristics, as a generalist, while the FNV model predicts that each hybrid lineage will occupy a narrow niche, as a specialist, and will exhibit local adaptation to similar habitats (Vrijenhoek, 1978;

Vrijenhoek, 1994). These models are not exclusive but rather co-occurring, and may explain hybrids life history traits (Pagano *et al.*, 2008). Indeed, several experimental studies evidenced local adaptations among these hybrids, explained that hybrids are common and used many habitats because the whole set of clones confers an adaptation to a wide range of environmental conditions (Forbes, 1997; Pagano *et al.*, 2001; Pagano *et al.*, 2008; Plenet *et al.*, 1998; Semlitsch *et al.*, 1997). As meadow tadpoles not fit well with cold temperature, they could be locally adapted to their warm habitat of origin, suggesting that they are specialist i.e. representative of a FNV lineage, whereas forest tadpoles, which were more flexible to different temperatures, seems to have a good phenotypic plasticity, and could be representative of a GPG lineage).

6.5. Conclusions

Hemiclonal hybrids from the *P. esculentus* complex have been evidenced to get a good fitness relative to that of parental species (literature cited therein), thus highlighting that asexuality is not only penalized by deleterious mutations but may exhibit advantages. Our data evidenced phenotypic plasticity that suggests both broad and local adaptations. It contributes to explain long-term persistence of such clonal hybrids. Thus, as long as multiple clones exist, water frog hybrids will be able to maintain face to environmental modifications.

Our results have to be extended to genetic analysis in order to evidence (or not) adaptations among the different hybrid lineages (i.e. clones). Indeed, those complexes appear to be suitable models to study interclonal selection and local adaptation in the light of hybrid variability.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Vivianne Hardouinneau and Alban Gerard for their help during the breeding, Thomas Sire for frogs catching, and Estelle Germain for her statistical advices. We are grateful to Guex Gaston-Denis, and Mark Phipps for constructive and critical comments on the manuscript.

Chapitre 7

Discussion et Perspectives

7.1. L'identification taxonomique

L'identification taxonomique des grenouilles vertes des différents complexes d'hybridation est une étape essentielle et incontournable, aussi bien pour poursuivre les études fondamentales que dans un but de conservation. Jusque récemment, l'identification taxonomique était basée sur des mesures morphométriques très sophistiquées (Berger, 1966; Crochet *et al.*, 1995), ainsi que sur le chant (Roesli Marzia, 2000; Wycherley *et al.*, 2002). Mais plusieurs études ont montré que ces méthodes n'étaient pas assez robustes pour les individus de l'Ouest de l'Europe, du fait notamment de la capacité de ces grenouilles à s'hybrider, de leur grande ressemblance, et parce que les hybrides ont des caractéristiques morphologiques et vocales intermédiaires aux espèces parentales (Lodé, Pagano, 2000; Pagano, Joly, 1999; Plötner *et al.*, 2001). Des scientifiques ont alors développé une méthode génétique basée sur des allozymes, possédant des allèles spécifiques de chaque taxon, permettant une affiliation fiable (Gutmann *et al.*, 1994; Hotz, 1983). Néanmoins, cette méthode est très invasive, car elle requière un fragment de tissu ou de muscle, nécessitant au mieux l'ablation d'un doigt, voir même le sacrifice de l'individu. Afin de s'affranchir de l'identification allozymique, nous tentons de mettre au point de nouvelles méthodes à une échelle plus fine, moléculaire, utilisant de l'ADN issu de simples prélèvements salivaires ou de frottis tégumentaires (Pidancier *et al.*, 2003). Néanmoins, le nombre de séquences disponibles pour ces différents taxa de grenouilles sont rares, rendant la tâche plus ardue. La situation taxonomique des grenouilles vertes en France est d'autant plus difficile à clarifier que depuis les années 1928, de nombreuses grenouilles allochtones ont été importées. Ces dernières originaires des Balkans, d'Anatolie et d'Egypte ce sont parfaitement mélangées aux populations locales, et hybridés avec les espèces autochtones.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode PCR-RFLP basée sur la séquence ITS2 afin d'identifier les grenouilles du complexe *P. esculentus*. Cette méthode, basée sur un arbre phylogénique robuste, est efficace, rapide, peu onéreuse, et surtout non invasive. Elle nous a permis d'identifier tous les échantillons collectés durant la thèse dans la moitié Nord de la France. La comparaison entre cette méthode et celle basée sur les allozymes montrent 83% de correspondance, cette différence pouvant essentiellement être imputée à des cas d'introgression génétique. En effet, ce phénomène a déjà été observé parmi les grenouilles

vertes de l'Ouest (Mezhzherin, Morozov-Leonov, 1997; Pagano *et al.*, 2003; Pagano, Joly, 1999; Pagano, Schmeller, 1999), où des évènements d'introgression entre *P. lessonae* et *P. ridibundus* ont été décrits et vice versa, par l'intermédiaire de l'hybride hybridogénétique *P. esculentus* (Holsbeek *et al.*, 2008; Pagano *et al.*, 2003; Pagano *et al.*, 2001c; Plötner *et al.*, 2008; Vorburger, Reyer, 2003). Cependant, cette nouvelle méthode ne permet pas de distinguer les grenouilles autochtones et allochtones, telles *P. kurtmuelleri* (originaire des Balkans), *P. bedriagae* (Levant), et les grenouilles d'Anatolie (*P. cf. bedriagae*). Ces dernières sont classées avec les *P. ridibundus* comme faisant partie du « groupe *ridibundus* ». De même avec *P. lessonae*, et *P. bergeri*, toutes deux classées par notre méthode dans le « groupe *lessonae* ».

Dans un second temps, afin de palier les limites éventuelles de cette nouvelle méthode, nous avons réalisé une analyse multilocus en utilisant d'autres marqueurs moléculaires, les microsatellites (Christiansen, 2005; Garner *et al.*, 2000; Holsbeek *et al.*, 2009a; Hotz *et al.*, 2000; Primmer *et al.*, 2002; Zeisset, Beebe, 2000), dans le but de réaliser une identification spécifique, mais aussi et surtout de mettre en évidence l'existence de différentes lignées hybrides potentielles au sein des *P. kl. esculentus*. Malheureusement, l'utilisation de microsatellites comme outils d'identification n'a pas été fructueuse pour nos échantillons français, car l'ADN des deux espèces parentales n'a pu être distingué. Bien que cet échec puisse être dû à des problèmes méthodologiques ou d'analyse (mauvaise amplification, logiciels non adaptés au cas d'hybridation), deux explications semblent être plus probables :

1) les cas d'introgression sont très importants en France. Ils seraient liés à l'impact d'introduction de grenouilles exotiques augmentant le brassage génétique. Cette hypothèse est corroborée par les travaux de Holsbeek en Belgique, où le brassage génétique n'atteint toutefois pas un niveau comparable à celui observé dans notre étude, car, si le contexte d'introductions de grenouilles exotiques est similaire, leur histoire est plus récente et les introductions moins massives. Dans ces 2 cas, l'étiquette taxonomique est délicate à attribuer car il existe des espèces parentales « pures » (100% du génome sans introgression de l'autre espèce parentale), des hybrides 50-50, et tout un tas d'individus s'écartant de ces « cas d'école », c'est à dire présentant un pourcentage d'introgression plus ou moins important. On peut suggérer un modèle de gradient d'hybridation, en fonction du pourcentage de génome *ridibundus* et de celui de *lessonae* (Figure 7.1). Ainsi, Holsbeek *et al.* (2009) ont considéré qu'un individu est identifié comme espèce parentale s'il a 90% du génome spécifique de

cette espèce. Par extension, si on retient ce seuil, devraient être considérés comme hybrides tous ceux qui ont un mélange des 2 génomes parentaux compris dans la fourchette 90%-10%. On comprend dès lors que la question de l'identification taxonomique devient plus relative et surtout ne se pose plus dans les mêmes termes qu'il y a quelques années seulement.

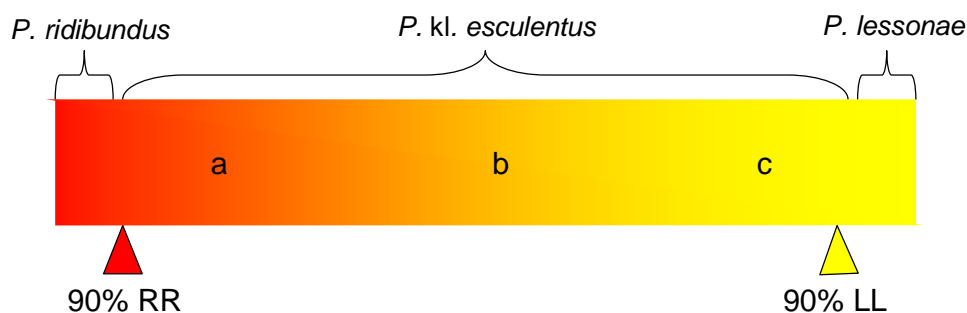


Figure 7.1 : Gradient d'hybridation traduisant les variations de proportions des génomes *ridibundus* et *lessonae* au sein des hybrides. L'individu a est un hybride génétiquement proche de *P. ridibundus*. L'individu b est constitué d'autant de génome *ridibundus* que de génome *lessonae*. Et l'individu c est un hybride génétiquement proche de *P. lessonae*.

- 2) et/ou des marqueurs microsatellites non adaptés au cas des grenouilles vertes en France. En effet, de nombreuses grenouilles vertes d'origine allochtone ont été importées en France possédant un patrimoine génétique légèrement différent de celui des *P. ridibundus* natives pour lesquelles ont été développés mes marqueurs. Cet échec corrobore celui d'autres collègues menant une étude en France (Plénet & Schmeller, com pers), et, il il conviendrait d'utiliser d'autres marqueurs microsatellites qui soient capables de distinguer entre *ridibundus* native et exotiques. Considérant que cette méthode étant assez lourde, il nous semble plus opportun de se tourner vers d'autres types de marqueurs moléculaires.

Plusieurs marqueurs moléculaires ont été développés depuis quelques années, d'origine mitochondriale, avec les séquences ND2, ND3 (Plötner *et al.*, 2008), ou nucléaire, essentiellement des microsatellites, mais aussi RanaCR1 et SAI-1 (Plötner *et al.*, 2009). Ces derniers semblent particulièrement intéressants car ils permettent d'identifier les hybrides, contrairement aux séquences mitochondriales. La méthode PCR-RFLP basée sur la séquence ITS2 étant pratique, il serait intéressant de l'affiner en procédant en différentes étapes : 1) Il convient de pratiquer du clonage afin d'étudier l'éventuel polymorphisme intra-individuel qui

pourrait biaiser nos identifications. 2) Construire un modèle basé sur des taux de mutations (neutres), ou sur l'horloge moléculaire afin de valider notre choix de séquence ITS2. 3) L'étude de nouvelles séquences ITS2 venant d'échantillons de toute l'Europe nous permettrait d'observer plus de polymorphisme et d'identifier de nouvelles zones conservées spécifiques d'autres espèces, et qui pourraient être reconnues par de nouvelles enzymes de restriction. Il serait alors possible de distinguer les différentes espèces allochtones, mais aussi d'identifier les taxa du complexe *P. grafi* présents dans le Sud de la France pour lesquelles aucun marqueur moléculaire n'a été développé à ce jour.

Nous avons commencé à mettre au point une nouvelle méthode d'identification basée sur une portion du gène codant pour la rhodopsine (Veith *et al.*, 2003). Ce dernier étant très conservé, il y a de fortes chances que le polymorphisme observé entre *P. ridibundus*, *P. lessonae* et *P. perezi* persiste quelque soit la provenance des grenouilles analysées. Les domaines spécifiques de chaque taxon n'étant pas des sites de restriction enzymatique, nous avons eu recours à la technique de mise en évidence des SNPs. Néanmoins, un séquençage d'un nombre plus grand d'individus des espèces parentales semble indispensable avant de poursuivre les analyses, car pour le moment, notre initiative ne se base que sur un individu de chaque espèce.

La recherche de nouvelle méthode d'identification doit passer par la recherche de nouvelles séquences, les plus conservées et spécifiques possibles. L'un des moyens d'en trouver serait de passer par le DNA Barcoding. Il s'agit d'une méthode rapide et peu onéreuse du séquençage de plusieurs petites parties de l'ADN (mitochondrial ou nucléaire), utilisée dans le cadre d'identification taxonomique, et gérée par le CBOL (Consortium for the barcode of life). Néanmoins, l'une des limites de cette méthode pourrait être les cas d'hybrides. Le séquençage des gènes codant pour les allozymes pourrait s'avérer intéressant, bien qu'il s'agisse de groupes multi-géniques. En effet, puisque la méthode allozymique permet d'identifier de nombreuses espèces et hybrides du groupe des grenouilles vertes, garder les mêmes marqueurs, mais en passant à l'échelle moléculaire semble être la meilleure solution.

En revanche, la mise au moins d'outils systématiques pour les grenouilles du genre *Pelophylax* sera toujours difficile, car perturbée par les cas d'introgession génétique, d'hybridogénèse permissive, et d'introductions massives de grenouilles allochtones.

7.2. L'utilisation de l'habitat chez le complexe *P. esculentus*

De nombreux auteurs ont tenté de comprendre le maintien à l'équilibre des taxa au sein de ce complexe d'hybridation, et ont suggéré une utilisation différentielle de l'habitat. Néanmoins, ces descriptions comportent des limites, car les taxa n'ont pas toujours été identifiés formellement. Toutes les descriptions s'accordent sur le fait que *P. ridibundus* occupe préférentiellement des milieux à forte influence fluviale, à eau renouvelée, de grande taille, contrairement à *P. lessonae* qui évitent les milieux où l'eau est courante et occupe des sites plus petits, temporaires, isolés (Berger, 1973; Morand, Joly, 1995; Morand *et al.*, 1997; Pagano *et al.*, 1997). Les hybrides occuperaient une large gamme d'habitats (Berger, 1973). Les études de terrain et expérimentales tentant de définir les exigences écologiques de chaque taxon sont finalement peu nombreuses. Ainsi, Plénet *et al.* (2000) a montré que l'oxygène est une des facteurs limitant la répartition des différents taxa (Plénet *et al.*, 2000a), les rieuses ayant une préférence pour les milieux fortement oxygénés, les *lessonae* une meilleure tolérance aux conditions d'hypoxie, et l'hybride ayant des performances intermédiaires. Une autre étude montre que les rieuses occupent des sites à forte fluctuation du niveau d'eau, à substrat gravillonneux, et à faible taux de matières organiques, les *lessonae* occupent des milieux aux caractéristiques inverses, et les hybrides des habitats intermédiaires (Pagano *et al.*, 2001b).

Suite à l'identification taxonomique des grenouilles vertes prélevées dans l'Argonne et en Anjou, j'ai étudié leur répartition et leur utilisation de l'habitat sur 26 sites. Les populations sont majoritairement composées de 2 taxa, le troisième étant parfois présent mais en minorité. Aucune population d'espèce parentale pure n'a été identifiée, l'hybride étant toujours présent. Le peuplement en grenouilles vertes est différent entre les deux zones étudiées, composé essentiellement de *P. lessonae* et *P. kl. esculentus* dans l'argonne constituant un système « L-E », et de *P. ridibundus* et de *P. kl. esculentus* au sein d'un système « R-E » dans l'anjou. De plus, nous avons observé que les rieuses occupent préférentiellement les habitats prairiaux, proche de rivière et à faible altitude, peu turbide, à faibles taux de nitrates et forte quantité d'ions magnésiques, tandis que les *lessonae* les habitats forestiers à pH plus élevé, à faible alcalinité, éloigné de rivière et à plus haute altitude (donc, à faible influence fluviale). Les hybrides, bien que proche de l'habitat des *lessonae*, semblent occuper une niche large, tantôt avec l'une des espèces parentales, tantôt avec l'autre. Cette

répartition différentielle corrobore les études précédentes, et nous a permis d'affiner les exigences écologiques en mettant en évidence de nouveaux facteurs impliqués dans la partition de niche écologique, à tout le moins pour les espèces parentales. L'habitat semble avoir aussi un effet sur la masse et la taille des grenouilles des différents taxa. Les adultes sont tous, à l'exception des grenouilles de lessona, plus grands et plus gros lorsqu'ils occupent des habitats prairiaux plutôt que forestier. De même, l'expérimentation montre que les pontes issues de grenouilles « prairiales » donnent également des têtards plus gros quelles que soient les conditions d'élevage, suggérant une sélection pour des phénotypes plus gros (grands).

Les hybrides montrant une large valence écologique, nous sommes passés à l'échelle populationnelle afin d'observer un éventuel effet de l'habitat sur les stades précoces. Dans le chapitre 6, nous avons pu observer chez des têtards *P. kl. esculentus* des performances larvaires différentes en fonction de leur origine. Ceux originaires d'une population forestière sont capables de s'acclimater à des températures élevées, représentant les conditions d'une mare prairiale, tandis que les têtards originaires d'une population prairiale ont un développement affecté négativement par les conditions simulant celles d'une mare forestière. Ces résultats sont importants d'un point de vue évolutif, car ils montrent des réactions différentielles de population appartenant au même groupe taxonomique. Ces différences de performances révéleraient l'existence de différentes lignées hybrides en lien avec leur fitness pour certains traits. Nos résultats peuvent suggérer une adaptation locale de la population prairiale à son habitat, validant partiellement les prédictions du modèle FNV (Semlitsch *et al.*, 1997; Vrijenhoek, 1978; Vrijenhoek, 1994), tandis que la population forestière répond aux prédictions du modèle GPG (Baker H., 1965; Schultz, 1971; Schultz, 1977) et semble être généraliste. Le succès évolutif de ces hybrides s'expliquerait alors par le fait que ces deux modèles ne sont pas antagonistes (Pagano, 1999; Pagano *et al.*, 2008; Plenet *et al.*, 2005; Semlitsch *et al.*, 1997).

Il serait intéressant de poursuivre les analyses en mettant en évidence génétiquement différentes lignées clonales, puis les soumettre à des transplantations réciproques afin de déterminer leur capacité d'acclimatation et la plasticité de leur réponse face aux modifications de leur environnement. Cette expérience nous permettrait d'identifier les lignées spécialistes (faible plasticité face aux changements) et celles généralistes (bonne plasticité) pour l'utilisation de l'habitat. Néanmoins, la véracité de ces modèles repose sur le postulat d'une

hybridogénèse stricte. Or, compte tenu des cas d'introgression génétique relativement fréquents, notamment dans les zones où les introductions de grenouilles exotiques sont nombreuses, nous pouvons être amenés à douter du caractère (fortement) clonal de nos hybrides. Il serait donc plus prudent d'étudier les lignées hybrides GPG et FNV dans des zones où l'espèce parentale *P. ridibundus* est absente ou native, et dans des populations mixtes (L-E) et non E-pures, afin d'éviter les risques d'introgression et d'étudier des hybrides « réellement » clonaux.

Une étude de la dynamique des populations semble aussi indispensable à la compréhension de ces systèmes de reproduction. Grâce à l'analyse des classes d'âge de chaque population par la méthode de squelettochronologie, nous pourrions peut-être expliquer les différences de taille de grenouilles observées entre les milieux prairiaux et forestiers, mais aussi être plus rigoureux en observant les capacités d'acclimatation, d'adaptation, et *in fine* la fitness au regard des âges.

De plus, étudier les capacités de migration par radiopistage ou plus indirectement par CMR en fonction des taxa nous aiderait à comprendre plusieurs aspects des dynamiques évolutives. Évaluer les flux d'individus migrants représente un enjeu concernant la propagation des rieuises exotiques, enjeu à la fois de conservation mais aussi de compréhension plus fine des mécanismes potentiels d'introgression, de pollution génétique. Pour observer la structure des populations, compte tenu des nombreuses introductions de rieuises exotiques, et des cas relativement fréquents d'introgression génétique, altérant l'intégrité des génomes des espèces parentales, la génétique des populations est inappropriée. L'observation des migrants est donc le seul moyen d'étudier la structure des populations.

7.3. Fitness hybride et heterosis

L'hybride du complexe *P. esculentus* a fait l'objet de nombreuses études qui ont montré que son succès évolutif s'expliquerait par une bonne fitness au sein d'une grande gamme d'habitat. Plusieurs études ont analysé les performances larvaires des têtards du système « L-E » et ont observé chez cet hybride un effet heterosis positif (Berger, Rybacki, 1997; Berger, Uzzell, 1980; Gutmann *et al.*, 1994; Hotz *et al.*, 1999; Semlitsch, Reyer, 1992;

Tietje, Reyer, 2004; Tunner, Nopp, 1979), ce qui signifie qu'il manifeste une supériorité par rapport aux deux espèces parentales pour au moins un trait (Manwell *et al.*, 1963). Dans d'autres cas, les hybrides ont plutôt montré des performances intermédiaires aux espèces parentales plutôt que supérieures (Plenet *et al.*, 2000a; Plenet *et al.*, 2005; Plenet *et al.*, 1998; Plenet *et al.*, 2000b). On ne peut donc classer ces hybrides dans un groupe uniforme : certaines lignées présentent des traits supérieurs, d'autres sont intermédiaires, voire plus faibles que ceux des espèces parentales. Contrairement aux hybrides *P. kl. esculentus*, les performances larvaires du complexe *P. grafi* n'ont encore jamais été étudiées à notre connaissance. Ce dernier étant analogue au complexe *P. esculentus*, on peut supposer que les 2 hybrides partagent des caractéristiques analogues. Lors de l'élevage expérimental présenté en chapitre 4, nous avons pu observer que, en effet, les hybrides *P. kl. grafi* ont des performances intermédiaires, car supérieures à l'espèce parentale *P. perezi*, mais inférieures à *P. ridibundus*.

Il serait particulièrement intéressant de poursuivre les recherches sur ce complexe peu connu, en étudiant les performances larvaires d'hybride *P. kl. grafi* issus de différents croisements (PPxRR, PPxRL, RPxPP) afin de les comparer et d'observer l'effet de l'ancienneté de la clonalité. De plus, les grenouilles du complexe *P. grafi* occupant des milieux très souvent temporaires, l'étude de leur utilisation de l'habitat semble indispensable afin de connaître au mieux les exigences écologiques de chaque taxon et d'observer d'éventuelles lignées hybrides différentes. Dans un contexte de réchauffement climatique, comprendre le maintien de ces taxa dans des habitats soumis à de fortes sécheresses pourrait être une clé importante en écologie évolutive.

7.4. Le devenir évolutif des grenouilles vertes

7.4.1. L'hybridogénèse : un modèle biologique en péril

Les zones d'hybridation sont considérées comme étant des lieux où des événements évolutifs importants se produisent. Le mode de reproduction hybridogénétique a été considéré par certains comme une impasse évolutif, car l'hybride ne maintient sa lignée qu'en parasitant une des deux espèces parentales (Milinski, 1994). Néanmoins, plusieurs événements

invalident cette prédiction, remettant en cause la théorie de l'hybridogénèse comme mode de reproduction strict.

1) De nombreux cas d'introgression ont été répertoriés, par l'intermédiaire des hybrides (Holsbeek *et al.*, 2008; Mezhzherin, Morozov-Leonov, 1997; Pagano *et al.*, 2003; Pagano, Joly, 1999; Pagano *et al.*, 2001c; Pagano, Schmeller, 1999; Plötner *et al.*, 2008; Vorburger, Reyer, 2003). Le mode de reproduction hybridogénétique exclu en théorie ce type de recombinaison génétique, mais il ne fait aucun doute que chez les grenouilles vertes, l'hybridogénèse permet la recombinaison de manière plus ou moins importante.

2) Les hybrides *P. kl. esculentus* peuvent constituer des populations E-pures, sans aucune des deux autres espèces parentales. L'existence de ces populations suggère que ces hybrides ont une hybridogénèse permissive, et produisent d'autres types de gamètes que ceux renfermant le génome rieuse (cf introduction) afin de s'auto-entretenir en l'absence d'espèce « hôte » (Christiansen *et al.*, 2005; Uzzell *et al.*, 1980)

3) Certaines lignées hybrides ont des niveaux de ploïdies multiples, souvent triploïdes voire, plus rarement, tétraploïdes (Berger *et al.*, 1986; Plötner *et al.*, 2008). Une étude menée en Hongrie a observé des mâles *P. esculentus* triploïdes dans un système « E pur » (Vorburger, 2001b). Ils avaient un génotype RLL, mais ressemblaient (morphologiquement) plus à des rieuses qu'à des lessona, ce qui était dû à une accumulation de mutations réduisant l'expression du génome L. Ces hybrides particuliers produisaient des gamètes diploïdes de génotype LL, et devaient se reproduire avec des *P. ridibundus* pour reconstituer chez leurs descendants le génotype RLL. Nous suspectons d'ailleurs cette éventualité dans les cas d'identification d'individus notés R1 (supposés de génotype RRL) ou rL (supposés de génotype RLL ; chapitre 3) et cela influe sur le modèle de gradient d'hybridation (fig 7.1) présenté précédemment.

L'ensemble de ces 3 faits montre que l'hybridogénèse n'est pas aussi figée que décrite dans la littérature et que les hybrides clonaux peuvent l'être totalement ou partiellement.

Par ailleurs, les caractéristiques du complexe d'hybridation sont modifiées par les nombreuses introductions de grenouilles vertes des Balkans, d'Anatolie et d'Égypte qui ont augmenté la diversité génétique du génome *ridibundus*, notamment ceux portés par les hybrides. Ainsi, la reproduction entre deux hybrides d'origines différentes aboutit souvent à des descendants rieuses viables et fertiles, car les mutations délétères sont portées à l'état

hétérozygote (Guex *et al.*, 2002; Vorburger, 2001d). Les bonnes performances des hybrides et l'existence de plusieurs lignées hybrides pourraient d'ailleurs être liées à cette forte diversité génétique. Lors de nos analyses, les hybrides ont été identifiés dans toutes les populations, à l'exception de celles de l'île d'Yeu. Cette omniprésence montre à quel point ces hybrides occupent une grande diversité d'habitat.

Ces grenouilles vertes combinent donc les avantages de la reproduction clonale avec ceux de la reproduction sexuée (recombinaison). Tous ces éléments pourraient suggérer que l'hybride *P. kl. esculentus* pourrait ou serait engagé dans un processus de spéciation, où il pourrait alors totalement s'affranchir des deux espèces parentales. Dans ce contexte, l'analyse des processus de recombinaison apparaît incontournable. L'introgression génétique doit être quantifiée afin d'évaluer son implication dans l'évolution du complexe d'hybridation, notamment dans les processus de spéciation potentiels. Il semble aussi indispensable d'observer les différents niveaux de ploïdie, ainsi que la production de gamètes, afin de comprendre comme les populations E-pures persistent, quel habitat ces populations utilisent et quelle est la fitness de chaque lignée hybride afin de pouvoir prédire le devenir des hybrides.

7.4.2. La propagation du génome R

L'origine des grenouilles de l'espèce *P. ridibundus* présentes en France n'a pas été déterminée. Deux hypothèses expliqueraient leur présence : 1) elles sont autochtones, et résultent de la colonisation de l'Europe de l'Ouest depuis la déglaciation en provenance des zones refuges situées dans le Sud Est ; 2) elles sont toutes allochtones, issues des importations massives des grenouilles vertes en provenance de Yougoslavie et d'Anatolie depuis les années 1920. Suites aux quelques études sur le sujet, nous pouvons supposer que les deux hypothèses seraient vraies, certaines seraient autochtones, notamment dans la vallée du Rhône, mais la grande majorité allochtones résultant des nombreuses introductions (Pagano *et al.*, 2001a; Schmeller *et al.*, 2007). Ces grenouilles importées font toutes partie du « groupe *ridibundus* », la plupart étant des *P. ridibundus*, les autres appartenant potentiellement à des espèces différentes (*P. kutmueleri*, *P. bedriagae*, *P. cf. ridibundus*). Elles ce sont mélangées et reproduites avec les populations locales, ce qui a augmenté la diversité génétique des rieuses. Des gènes exotiques sont en effet retrouvés dans des lignées rieuses natives, ce qui peut être

considéré comme une invasion de gènes étrangers d'une espèce à une autre, que l'on appelle aussi « une pollution génétique » (Pagano et al. 2003).

Ces nombreuses introductions de grenouilles exotiques font évoluer ce complexe d'hybridation très rapidement. L'explosion du nombre de grenouilles rieuses exotiques augmente les probabilités d'hybridations avec les espèces natives, comme *P. lessonae*, et même *P. kl. esculentus* (Schmeller et al., 2007). Le fait que les descendants *P. ridibundus* néo-formés issus de croisement entre 2 hybrides soient souvent viables est très probablement la conséquence de cette grande diversité génétique. Ainsi, les génomes clonaux R sont différents et portent des mutations délétères seulement à l'état hétérozygote (Guex et al., 2002; Vorburger, 2001d). De plus, les têtards de rieuses portant un des génomes en provenance d'un hybride montrent des performances larvaires tout aussi bonnes que ceux issus de parents *P. ridibundus* (chapitre 4).

Ces études nous amènent à passer à une observation à l'échelle du génome. En effet, l'équipe lyonnaise travaillant sur ce modèle biologique a proposé il y a quelques années que le génome *rididundus* pourrait être considéré comme un parasite lorsqu'il est véhiculé par les hybrides. Ce génome est le seul qu'on retrouve dans tous les complexes hémiclonaux (Polls-Pelaz, 1995). De plus, de nombreux croisements aboutissent soit à des rieuses, soit à des hybrides, tous portant ce génome R. Vorburger et al (2003) avaient d'ailleurs proposé un tableau résumant les cas simples de croisement chez les grenouilles du complexe *P. esculentus*, et on constate que le génome R est impliqué dans 8 des 9 types de descendants (Figure 7.2).

		Male		
		<i>Rana lessonae</i> (LL)	<i>Rana esculenta</i> (RL)	<i>Rana ridibunda</i> (RR)
Female	<i>Rana lessonae</i> (LL)	LL (<i>R. lessonae</i>)	RL (<i>R. esculenta</i>)	RL (<i>R. esculenta</i>)
	<i>Rana esculenta</i> (RL)	RL (<i>R. esculenta</i>)	RR (<i>R. ridibunda</i>)	RR (<i>R. ridibunda</i>)
	<i>Rana ridibunda</i> (RR)	RL (<i>R. esculenta</i>)	RR (<i>R. ridibunda</i>)	RR (<i>R. ridibunda</i>)

Figure 7.2 : Schéma représentant les différents types de croisement possible chez les grenouilles vertes du complexe *P. esculentus*, et les génotypes des descendants issus de ces croisements (Vorburger, Reyer, 2003).

Les cas d'introgession ont aussi un rôle potentiel dans la colonisation des rieuses car ils leur permettent de s'accaparer de nouveaux gènes et donc potentiellement de nouvelles ressources. Plötner (2005) a ainsi observé des cas de transfert d'ADN mitochondrial de *P. lessonae* chez des individus *P. ridibundus* s'élevant à 32%, par m'intermédiaire d'hybridation antérieure (Plötner, 2005). Ainsi, si la tolérance à l'hypoxie dépend d'enzyme codées par l'ADN mitochondrial, ces rieuses auraient les mêmes performances que les lessona face au manque d'oxygène (Plötner *et al.*, 2008), ce qui agrandit leur gamme d'habitat.

Ces évènements expliquent le succès de ces grenouilles rieuses, et plus particulièrement du génome R, qui colonisent progressivement l'Europe entière.

7.4.3. Biologie de la conservation

Les cas d'hybridation chez les grenouilles vertes sont des phénomènes naturels, mais qui sont accélérés depuis ces dernières années suite aux activités anthropiques. L'introduction par l'homme de grenouilles exotiques est en partie responsable de l'évolution de la répartition des différents taxa au détriment de la grenouille de Lessona. Le déclin des populations de grenouilles est majoritairement la conséquence d'une destruction de certains habitats : la réduction du nombre de sites de reproduction du au développement agricole et lié au drainage de certaines zones humides, ou encore du au réchauffement climatique, augmente fortement les probabilités d'hybridations. En outre, ces modifications paysagères touchent particulièrement les sites correspondant aux préférences écologiques de l'espèce *P. lessonae* (marais, etc...). L'habitat préférentiel des grenouilles rieuses est quant à lui suivi et protégé par les agences de l'eau, garantes d'une bonne qualité des eaux pour la consommation de l'homme. Mettre en place un programme d'élevage et de réintroduction de grenouilles de Lessona semble inconcevable, puisque si tôt relâchées, elles seraient en contact avec des rieuses et/ou des hybrides avec lesquelles elles se reproduiraient. La seule solution pour protéger au mieux cette espèce et ralentir son déclin est de préserver ses habitats. Affiner l'utilisation de l'habitat par cette espèce, ce que nous avons pu faire lors de cette étude, est une étape indispensable, car ces connaissances nous aident à la prise de décision quant aux habitats à prioriser en termes de conservation.

Bibliographie

- Agrawal AA (2001) Ecology: Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* **294**, 321-326.
- Altwegg R, Reyer HU (2003) Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* **57**, 872-882.
- Anderson E (1949) Introgressive hybridization. *John Wiley & Sons, New York*.
- Anderson E, Hubricht L (1938) Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany* **25**, 396-402.
- Anholt BR, Negovetic S, Rauter C, Som C (2005) Predator complement determines the relative success of tadpoles of the *Rana esculenta* complex. *Evolutionary Ecology Research* **7**, 733-741.
- Arano B, Llorente G, A., Herrero P, Sanchiz B (1994) Current studies on Iberian water frogs. *Zoologica Poloniae* **39**, 365-375.
- Arano B, Llorente G, Garcia-Paris M, Herrero P (1995) Species translocation menaces Iberian waterfrogs. *Conservation Biology* **9**, 196-198.
- Araujo MB, Thuiller W, Pearson RG (2006) Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe. *Journal of Biogeography* **33**, 1712-1728.
- Archetti M (2005) Accumulation of deleterious mutations in hybridogenetic organisms. *Journal of Theoretical Biology* **234**, 151-152.
- Arnold ML, Hodges SA (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution* **10**, 67-71.
- Babik W, Branicki W, Sandera M, *et al.* (2004) Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology* **13**, 1469-1480.
- Baker H. G (1965) Characteristics and modes of origin of weeds. *Academic Press, New York*, 137-172.
- Bancroft BA, Baker NJ, Searle CL, Garcia TS, Blaustein AR (2008) Larval amphibians seek warm temperatures and do not avoid harmful UVB radiation. *Behavioral Ecology* **19**, 879-886.
- Barault R (2003) Ecologie générale. Structure et fonctionnement de la biosphère. *Dunod, Paris*.
- Barbault R, Chevassus-au-louis B (2004) Biodiversité et changements globaux. *Association pour la diffusion de la pensée française*.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**, 133-164.

- Beckel L (1999) The Atlas of global change. *MacMillan Reference books*, 164.
- Beebee TJC (2005) Conservation genetics of amphibians. *Heredity* **95**, 423-427.
- Beebee TJC, Blaustein AR, Root TL, *et al.* (2002) Amphibian phenology and climate change (multiple letters). *Conservation Biology* **16**, 1454-1455.
- Beebee TJC, Buckley J, Evans I, *et al.* (2005) Neglected native or undesirable alien? Resolution of a conservation dilemma concerning the pool frog *Rana lessonae*. *Biodiversity and Conservation* **14**, 1607-1626.
- Beebee TJC, Griffiths RA (2005) The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation* **125**, 271-285.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II*.
- Berger L (1966) Biometrical studies on the population of green frogs from the environs of Poznan. *Annales Zoologici* **23**, 303-323.
- Berger L (1973) Some characteristics of backcrosses within forms of *Rana esculenta* complex. *Genetica Polonica* **14**.
- Berger L (1988) Principles of studies of European water frogs. *Acta. Zool. Cracov.* **31**, 563-580.
- Berger L, Hotz H, Roguski H (1986) Diploid eggs of *Rana esculenta* with two *Rana ridibunda* genomes. *Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **138**, 1-13.
- Berger L, Rybacki M (1997) Competition between tadpoles of water frogs of the *Rana esculenta* complex. *Zoologica Poloniae* **42**, 141-154.
- Berger L, Rybacki M, Hotz H (1994) Artificial fertilization of water frogs. *Amphibia Reptilia* **15**, 408-413.
- Berger L, Uzzell T (1980) The eggs of European water frogs (*Rana esculenta* complex) and their hybrids. *Folia Biologica* **28**, 3-25.
- Bernard P (1994) Rapport d'évaluation des politiques publiques en matière de zones humides.
- Berven K, A., (1981) Mate choice in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Evolution* **35**, 707-722.
- Berven K, A., (1983) Interpreting geographic variation in life-history traits. *Am. Zool.* **23**, 85-97.

- Berven K, A., (1990) Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wool frog (*Rana sylvatica*). *Ecology* **71**, 1599-1608.
- Berven K, A., Gill D, E., S. J, Smith-Gill (1979) Countergradient selection in the green frog, *Rana clamitans*. *Evolution* **33**, 609-623.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, *et al.* (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 148-155.
- Binkert J, Borner P, Chen PS (1982) *Rana esculenta* complex: An experimental analysis of lethality and hybridogenesis. *Experientia* **38**, 1283-1292.
- Blaustein AR, Belden LK, Olson DH, *et al.* (2001) Amphibian breeding and climate change. *Conservation Biology* **15**, 1804-1809.
- Blaustein AR, Wake DB, Sousa WP (1994) Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* **8**, 60-71.
- Blondel J (1993) Biogéographie Evolutive. Masson, Paris.
- Blouin MS, Brown ST (2000) Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia* **125**, 358-361.
- Boecklen W, J., Howard D, J., (1997) Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology* **78**, 2611-2616.
- Bradley GA, Rosen PC, Sredl MJ, Jones TR, Longcore JE (2002) Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases* **38**, 206-212.
- Brady LD, Griffiths RA (2000) Developmental responses to pond desiccation in tadpoles of the British anuran amphibians (*Bufo bufo*, *B. calamita* and *Rana temporaria*). *Journal of Zoology* **252**, 61-69.
- Breton C, Pinatel C, Médail F, Bonhomme F, Bervillé A (2008) Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. *Plant Science* **175**, 524-532.
- Bridges CM, Semlitsch RD (2000) Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of ranidae and patterns of amphibian decline. *Conservation Biology* **14**, 1490-1499.
- Broquet T, Berset-Braendli L, Emaresi G, Fumagalli L (2007) Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics* **8**, 509-511.

- Cakir Y, Strauch SM (2005) Tricaine (MS-222) is a safe anesthetic compound compared to benzocaine and pentobarbital to induce anesthesia in leopard frogs (*Rana pipiens*). *Pharmacological Reports* **57**, 467-474.
- Carey C, Heyer WR, Wilkinson J, *et al.* (2001) Amphibian declines and environmental change: Use of remote-sensing data to identify environmental correlates. *Conservation Biology* **15**, 903-913.
- Carroll EA, Sparks TH, Collinson N, Beebee TJC (2009) Influence of temperature on the spatial distribution of first spawning dates of the common frog (*Rana temporaria*) in the UK. *Global Change Biology* **15**, 467-473.
- Casagrande J, Zaidman Y (1999) Defining a new balance between humans and the environment. *Changemarkers*.
- Chadwick EA, Slater FM, Ormerod SJ (2006) Inter- and intraspecific differences in climatically mediated phenological change in coexisting *Triturus* species. *Global Change Biology* **12**, 1069-1078.
- Che J, Pang J, Zhao H, *et al.* (2007) Phylogeny of Raninae (Anura: Ranidae) inferred from mitochondrial and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**, 1-13.
- Chevin LM, Lande R, Mace GM (2010) Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: Towards a predictive theory. *PLoS Biology* **8**.
- Christiansen DG (2005) A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex. *Molecular Ecology Notes* **5**, 190-193.
- Christiansen DG, Fog K, Pedersen BOV, Boomsma JJ (2005) Reproduction and hybrid load in all-hybrid populations of *Rana esculenta* water frogs in Denmark. *Evolution* **59**, 1348-1361.
- Clabaut C, Herrel A, Sanger TJ, Smith TB, Abzhanov A (2009) Development of beak polymorphism in the African seedcracker, *Pyrenestes ostrinus*. *Evolution and Development* **11**, 636-646.
- Collares-Pereira MJ, Alves MJ, Coelho MM (1999) Reassessment of the generic position of the Iberian cyprinid alburnoides complex: Its return to the genus *Leuciscus*. *Journal of Fish Biology* **54**, 465-468.
- Collins JP, Storfer A (2003) Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* **9**, 89-98.

- Corn PS, Blaustein AR, Root TL, *et al.* (2003) Amphibian breeding and climate change: Importance of snow in the mountains. *Conservation Biology* **17**, 622-627.
- Coyne JA, Orr HA (2004) Speciation. *Sinauer Associates, Sunderland*.
- Crawley M. J (2007) The R book. *John Wiley & Sons Ltd*, 949.
- Crochet P-A, Dubois A, Ohler A, Tunner H (1995) *Rana (Pelophylax) ridibunda* Pallas, 1771, *Rana (Pelophylax) perezi* Seoane 1885 and their associated klepton (Amphibia, Anura): morphological diagnoses and description of a new taxon. *Bull. Mus. natl. Hist. nat. Paris* **17**.
- Cummins CP (1989) Interaction between the effects of pH and density on growth and development in *Rana temporaria* L. tadpoles. *Functional Ecology* **3**, 45-52.
- Cushman SA (2006) Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation* **128**, 231-240.
- D'Amen M, Bombi P (2009) Global warming and biodiversity: Evidence of climate-linked amphibian declines in Italy. *Biological Conservation* **142**, 3060-3067.
- D'Amore A, Kirby E, McNicholas M (2009) Invasive species shifts ontogenetic resource partitioning and microhabitat use of a threatened native amphibian. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **19**, 534-541.
- Daf OS, Pagano Alain, Lodé Thierry (2006) Taxonomic diversity and sympatry among water frogs from Southern France: evidence for new assemblages. *Amphibia-Reptilia*.
- Dajoz R (2006) Précis d'Ecologie. *Dunod, Paris*, 631.
- Davidson C, Shaffer HB, Jennings MR (2002) Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conservation Biology* **16**, 1588-1601.
- Davis MB, Shaw RG, Etterson JR (2005) Evolutionary responses to changing climate. *Ecology* **86**, 1704-1714.
- Dingemanse NJ, Kazem AJN, Réale D, Wright J Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* **25**, 81-89.
- Dobzhansky T (1940) Speciation as a stage in evolutionary divergence. *Amer. Nat.* **74**, 312-321.
- Duguet R, Melki F (2003) Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. *Collection Parthénope, éditions Biotope, Mèze (France)*, 480.

- Duputié A, Debain P, McKey D (2007) Natural hybridization between a clonally propagated crop, cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and a wild relative in French Guiana. *Molecular Ecology* **16**, 3025-3038.
- Eiby YA, Booth DT (2009) The effects of incubation temperature on the morphology and composition of Australian Brush-turkey (*Alectura lathami*) chicks. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **179**, 875-882.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Fahrig L (1997) Relative effects of habitat loss and fragmentation on population extinction. *Journal of Wildlife Management* **61**, 603-610.
- Fahrig L (2003) Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**, 487-515.
- FAO (2001) Food and Agriculture Organisation. Forest resources assessment 2000. *FAO, Rome*.
- FAO (2008) Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation de l'Agriculture. *Rome*.
- Felsenstein J (1985) Confidence-limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Ficetola GF, De Bernardi F (2004) Amphibians in a human-dominated landscape: The community structure is related to habitat features and isolation. *Biological Conservation* **119**, 219-230.
- Ficetola GF, Thuiller W, Miaud C (2007) Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species - The American bullfrog. *Diversity and Distributions* **13**, 476-485.
- Fitzpatrick BM, Bradley Shaffer H (2007) Hybrid vigor between native and introduced salamanders raises new challenges for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15793-15798.
- Foley JA, DeFries R, Asner GP, *et al.* (2005) Global consequences of land use. *Science* **309**, 570-574.
- Forbes VE (1997) Are there advantages of having sex in novel environments? *Oikos* **80**, 411.
- Foster JP, Beebee TJC (2004) Research as a tool to inform amphibian conservation policy in the UK. *Herpetological Journal* **14**, 209-214.

- Frost DR, Grant T, Faivovich J, *et al.* (2006) The amphibian tree of life. In: *Bulletin of the American Museum of Natural History*, pp. 1-370.
- Futuyma D, J., (1998) *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Gallant AL, Klaver RW, Casper GS, Lannoo MJ (2007) Global rates of habitat loss and implications for amphibian conservation. *Copeia*, 967-979.
- Garland Jr T, Kelly SA (2006) Phenotypic plasticity and experimental evolution. *Journal of Experimental Biology* **209**, 2344-2361.
- Garner T, W., J., Angelone S, Pearman P, B., (2003) Genetic depletion in Swiss populations of *Rana latastei*: conservation implications. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences* **270**, 619-624.
- Garner TWJ, Gautschi B, Rothlisberger S, Reyer HU (2000) A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae*. *Molecular Ecology* **9**, 2173-2175.
- Gervasi SS, Foufopoulos J (2008) Costs of plasticity: Responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology* **22**, 100-108.
- Gibbs JP, Breisch AR (2001) Climate warming and calling phenology of frogs near Ithaca, New York, 1900-1999. *Conservation Biology* **15**, 1175-1178.
- Giordano A, R., Ridenhour R, J., Storfer A (2007) The influence of altitude and topography on genetic structure in the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Molecular Ecology* **16**, 1625-1637.
- Goldberg CS, Kaplan ME, Schwalbe CR (2003) From the frog's mouth: Buccal swabs for collection of DNA from amphibians. *Herpetological Review* **34**, 220-221.
- Goldstein D, B., Schlötterer C (2000) *Microsatellites. Evolution and applications*. Oxford University Press, New York.
- Gomez-Mestre I, Tejedo M (2005) Adaptation or exaptation? An experimental test of hypotheses on the origin of salinity tolerance in *Bufo calamita*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 847-855.
- Gosner K, L., (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**, 183-190.
- Gotthard K, Nylin S (1995) Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: A selective review of plasticity in animal morphology and life history. *Oikos* **74**, 3-17.

- Gottschling M, Keupp H, Plotner J, *et al.* (2005a) Phylogeny of calcareous dinoflagellates as inferred from ITS and ribosomal sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**, 444-455.
- Gottschling M, Knop R, Plötner J, *et al.* (2005b) A molecular phylogeny of *Scrippsiella* sensu lato (Calciodinellaceae, Dinophyta) with interpretations on morphology and distribution. *European Journal of Phycology* **40**, 207-220.
- Govindarajulu PP, Anholt BR (2006) Interaction between biotic and abiotic factors determines tadpole survival rate under natural conditions. *Ecoscience* **13**, 413-421.
- Graf J.-D., P. MW (1979) Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex. *Experientia* **35**.
- Graf JD, Karch F, Moreillon MC (1977) Biochemical variation in the *Rana esculenta* complex: a new hybrid form related to *Rana perezii* and *Rana ridibunda*. *Experientia* **33**, 1582-1584.
- Graf JD, Mueller WP (1979) Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex. *Experientia* **35**, 1574-1576.
- Graf JD, Polls Pelaz M (1989) Evolutionary genetics of *Rana esculenta* complex. *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* (Dawley R. M., Bogart J. P., eds), 289-302.
- Grant BS, Wiseman LL (2002) Recent history of melanism in American peppered moths. *Journal of Heredity* **93**, 86-90.
- Griffiths A, J-F., Miler J, H., Suzuki D, T., Lewontin R, C., Gelbart W, M., (2000) An introduction to genetic analysis. *W. H. Freeman Company, New York, New York and Basingstoke*, 860.
- Grinnell J (1917) The niche-relationships of California thrasher. *Auk* **34**, 427-433.
- Groot TVM, Janssen A, Pallini A, Breeuwer JAJ (2005) Adaptation in the asexual false spider mite *Brevipalpus phoenicis*: Evidence for frozen niche variation. *Experimental and Applied Acarology* **36**, 165-176.
- Gross BL, Rieseberg LH (2005) The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. *Journal of Heredity* **96**, 241-252.
- Guerrini F, Bucci S, Raghianti M, *et al.* (1997) Genomes of two water frog species resist germ line exclusion in interspecies hybrids. *Journal of Experimental Zoology* **279**, 163-176.
- Guex GD, Hotz H, Semlitsch RD (2002) Deleterious alleles and differential viability in progeny of natural hemiclinal frogs. *Evolution* **56**, 1036-1044.

- Guindon S, Gascuel O (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696-704.
- Gulve PS (1994) Distribution and extinction patterns within a northern metapopulation of the pool frog, *Rana lessonae*. *Ecology* **75**, 1357-1367.
- Günther R (1990) Die Wasserfrösche Europas. *Die Neue Brehm-Bücherei* 600, A. Ziemsen, Wittenberg-Lutherstadt.
- Günther R, Uzzell T, Berger L (1979) Inheritance patterns in triploid *Rana esculenta* (Amphibia, Salienta). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin* **55**, 35-57.
- Gutmann E, Hotz H, Semlitsch R, D., *et al.* (1994) Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclinal water frog hybrids. *Zoologica Poloniae* **39**, 527-528.
- Harrisson R, G., (1986) Pattern and process in a narrow hybrid zone. *Heredity* **56**, 337-349.
- Harrisson R, G., (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford surveys in Evolutionary Biology* **7**, 69-128.
- Harry M (2008) Génétique moléculaire et évolutive. *Maloine. Collection Sciences fondamentales*, 465.
- Hellriegel B, Reyer HU (2000) Factors influencing the composition of mixed populations of a hemiclinal hybrid and its sexual host. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 906-918.
- Heppich S (1977) Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta*. *Z. zool. Syst. Evolut.forsch.* **16**, 27-39.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* **359**, 183-195.
- Hill JK, Thomas CD, Fox R, *et al.* (2002) Responses of butterflies to twentieth century climate warming: Implications for future ranges. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **269**, 2163-2171.
- Hocking DJ, Semlitsch RD (2008) Effects of experimental clearcut logging on gray treefrog (*Hyla versicolor*) tadpole performance. *Journal of Herpetology* **42**, 689-698.

- Holenweg Peter AK (2001) Dispersal rates and distances in adult water frogs, *Rana lessonae*, *R. ridibunda* and their hybridogenetic associate *R. esculenta*. *Herpetologica* **57**, 449-460.
- Holenweg Peter AK, Reyer H.-U., Tietje A (2001) Homing behavior of *Rana lessonae*, *R. ridibunda* and their hybridogenetic associate *R. esculenta* after experimental displacement. *Amphibia Reptilia* **22**, 475-480.
- Holsbeek G, Jooris R (2009) Potential impact of genome exclusion by alien species in the hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Biological Invasions*, 1-13.
- Holsbeek G, Maes GE, De Meester L, Volckaert FAM (2009a) Conservation of the introgressed European water frog complex using molecular tools. *Molecular Ecology* **18**, 1071-1087.
- Holsbeek G, Mergeay J, Hotz H, *et al.* (2008) A cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex: Consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation. *Molecular Ecology* **17**, 5023-5035.
- Holsbeek G, Mergeay J, Volckaert FAM, De Meester L (2009b) Genetic detection of multiple exotic water frog species in Belgium illustrates the need for monitoring and immediate action. *Biological Invasions*, 1-5.
- Hotz H (1983) Genetic diversity among water frog genomes inherited with and without recombination. *Universität Zurich, Zurich*.
- Hotz H, Mancino G, Bucci-Innocenti S, *et al.* (1985) *Rana ridibunda* varies geographically in inducing clonal gametogenesis in interspecies hybrids. *The Journal of Experimental Zoology* **236**, 199-210.
- Hotz H, Semlitsch RD (2000) Differential performance among LDH-B genotypes in *Rana lessonae* tadpoles. *Evolution* **54**, 1750-1759.
- Hotz H, Semlitsch RD, Gutmann E, Guex GD, Beerli P (1999) Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclinal frog hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2171-2176.
- Hotz H, Uzzell T (1983) Interspecific hybrids of *Rana ridibunda* without germ line exclusion of a parental genome. *Experientia* **39**, 538-540.

- Hotz H, Uzzell T, Guex G-D, Alpers D, Semlitsch R, D., (2000) Microsatellites: a tool for evolutionary genetic studies of western Palearctic water frogs. *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin. Zoologische Reihe* **77**, 43-50.
- Hotz H, Uzzell T, Guex G-D, Alpers D, Semlitsch R, D., (2001) Microsatellites: a tool for evolutionary genetic studies of western Palearctic water frogs. *Mitt. Mus. Nat. kd. Berl., Zool. Reihe* **77**, 43-50.
- Hotz H, Uzzell Thomas, Berger Leszek, (1994) Hemiclonal hybrid water frogs associated with the sexual host species *Rana perezi*. *Zoologica Poloniae* **39**, 243-266.
- Houlahan JE, Fiday CS, Schmidt BR, Meyer AH, Kuzmin SL (2000) Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* **404**, 752-755.
- Howard D, J., (1986) A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution* **40**, 34-43.
- Howard RD (1980) Mating behavior and mating success in wood frogs, *Rana sylvatica*. *Animal Behaviour* **28**, 705-716.
- Hutchinson G, E., (1957) Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **22**, 415-427.
- Jakob C, Poizat G, Veith M, Seitz A, Crivelli AJ (2003) Breeding phenology and larval distribution of amphibians in a Mediterranean pond network with unpredictable hydrology. *Hydrobiologia* **499**, 51-61.
- Jehle R, Arntzen JW (2002) Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological Journal* **12**, 1-9.
- Johanet A, Picard D, Garner TWJ, *et al.* (2009) Characterization of microsatellite loci in two closely related *Lissotriton* newt species. *Conservation Genetics* **10**, 1903-1906.
- Johansen-Morris AD, Latta RG (2008) Genotype by environment interactions for fitness in hybrid genotypes of *Avena barbata*. *Evolution* **62**, 573-585.
- Jorgensen ME, Sheil CA (2008) Effects of temperature regime through premetamorphic ontogeny on shape of the chondrocranium in the American Toad, *Anaxyrus americanus*. *Anatomical Record* **291**, 818-826.
- Joseph N, Krauskopf E, Vera MI, Michot B (1999) Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Research* **27**, 4533-4540.
- Jump AS, Penuelas J (2005) Running to stand still: Adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters* **8**, 1010-1020.

- Kearney M (2005) Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 495-502.
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* **17**, 230-241.
- Kettlewell H, B., D., (1958) A survey of the frequencies of *Biston betularia* (L.) (Lep.) and its melanic Great Britain. *Heredity* **12**, 51-72.
- Koh L, P., Dunn R, R., Sodhi NS (2004) Species coextinctions and the biodiversity crisis. *Science* **305**, 1632-1634.
- Kolozsvary MB, Swihart RK (1999) Habitat fragmentation and the distribution of amphibians: Patch and landscape correlates in farmland. *Canadian Journal of Zoology* **77**, 1288-1299.
- Lahlou B (1995) *Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie. Amphibiens*, Tome XIV, Fascicule 1-A. *Publié sous la direction de Grassé P. P., Edition Masson.*
- Laurila A, Kujasalo J (1999) Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Journal of Animal Ecology* **68**, 1123-1132.
- Le Garff B (1998) *Les Amphibiens et les reptiles dans leur milieu. Bordas.*
- Leips J, McManus MG, Travis J (2000) Response of treefrog larvae to drying ponds: Comparing temporary and permanent pond breeders. *Ecology* **81**, 2997-3008.
- Lepetz V (2009) Réchauffement climatique, dessins dorsaux et variabilité environnementale chez le lézard vivipare, *Lacerta vivipara*. *Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie.*
- Lepetz V, Massot M, Chaine AS, Clobert J (2009) Climate warming and the evolution of morphotypes in a reptile. *Global Change Biology* **15**, 454-466.
- Li C, Wilkerson RC (2007) Intragenomic rDNA ITS2 variation in the neotropical *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). *Journal of Heredity* **98**, 51-59.
- Lind MI, Johansson F (2007) The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 1288-1297.
- Lippman ZB, Zamir D (2007) Heterosis: revisiting the magic. *Trends in Genetics* **23**, 60-66.
- Litvinchuk SN, Pashkova IM, Rozanov YM, Borkin LY (2007) Heat resistance of the skeletal muscle in Western Palearctic green frogs (*Rana esculenta* complex). *Biology Bulletin* **34**, 61-66.

- Ljubisavljevic K, Dzukic G, Kalezic M (2003) Green frogs are greatly endangered in Serbia and Montenegro. *FROGLOG* **58**.
- Lodé T, Pagano A (2000) Variations in call and morphology in male water frogs: taxonomic and evolutionary implications. *Life Sciences* **323**, 995-1001.
- Loman J (2002) *Rana temporaria* metamorph production and population dynamics in the field effects of tadpole density, predation and pond drying. *Journal for Nature Conservation* **10**, 95-107.
- Longato S, Bonfante P (1997) Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycological Research* **101**, 425-432.
- Lord JM, Norton DA (1990) Scale and the spatial concept of fragmentation. *Conservation Biology* **4**, 197-202.
- Lymberakis P, Poulakakis N, Manthou G, *et al.* (2007) Mitochondrial phylogeography of *Rana (Pelophylax)* populations in the Eastern Mediterranean region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 115-125.
- Lynch M (1984) Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *Quarterly Review of Biology* **59**, 257-290.
- Malécot V, Macquaire-Le Pocreau N, Auvray G, Kapusta V (2009) Polymorphic ITS as a tool to identify hybrids and their parents in cultivated genisteae (fabaceae). In: *Acta Horticulturae*, pp. 91-96.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 229-237.
- Manchester SJ, Bullock JM (2000) The impacts of non-native species on UK biodiversity and the effectiveness of control. *Journal of Applied Ecology* **37**, 845-864.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP (2009) Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* **157**, 2903-2927.
- Manwell C, Baker C, M., A., Childers W (1963) The genetics of hemoglobin in hybrids.-1 A molecular basis for hybrid vigor. *Comparative Biochemistry and Physiology* **10**, 103-120.
- Marr AB, Arcese P, Hochachka WM, Reid JM, Keller LF (2006) Interactive effects of environmental stress and inbreeding on reproductive traits in a wild bird population. *Journal of Animal Ecology* **75**, 1406-1415.

- Marshall DL, Levin DA, Fowler NL (1986) Plasticity of yield components in response to stress in *Sesbania macrocarpa* and *Sesbania vesicaria* (Leguminosae). *American Naturalist* **127**, 508-521.
- Martinez-Gordillo D, Rojas-Soto O, Espinosa De Los Monteros A (2010) Ecological niche modelling as an exploratory tool for identifying species limits: An example based on Mexican muroid rodents. *Journal of Evolutionary Biology* **23**, 259-270.
- Matlack GR (1997) Land use and forest habitat distribution in the hinterland of a large city. *Journal of Biogeography* **24**, 297-307.
- Mayr E (1942) Systematics and the origin of species. *Columbia University Press, New York*.
- McMenamin SK, Hadly EA, Wright CK (2008) Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16988-16993.
- McNeill J, R., (2000) Something new under the sun - An environmental history of the twentieth century world. *W. W. Norton & Company, New York, USA.*, 421.
- Menzel A, Dose V (2005) Analysis of long-term time series of the beginning of flowering by Bayesian function estimation. *Meteorologische Zeitschrift* **14**, 429-434.
- Merakova E, Gvozdik L (2009) Thermal acclimation of swimming performance in newt larvae: The influence of diel temperature fluctuations during embryogenesis. *Functional Ecology* **23**, 989-995.
- Merriam HG (1984) Connectivity: a fundamental characteristic of landscape pattern. In methodology in landscape ecological research and planning. J., Brandt and P., Agger. *Roskilde University Center, Denmark* **1**, 5-15.
- Mezhzherin SV, Morozov-Leonov S, Y., (1997) Gene introgression in hybrid populations of green frogs of *Rana esculenta* L, 1758 complex (Amphibia, Ranidae) from the Dnepr Basin. *Genetika* **3**, 358-364.
- Miaud C (1992) La squelettochronologie chez les Triturus (Amphibiens, Urodeles) a partir d'une etude de *T. alpestris*, *T. helveticus* et *T. cristatus* du sud-est de la France. *Colloque Paris: ORSTOM*.
- Miaud C, Muratet J (2004) Identifier les oeufs et les larves des amphibiens de France. *INRA Editions, Paris*, 200.
- Mikkola K (1997) Population trends of Finnish Lepidoptera during 1961-1996. *Entomologica Fennica* **8**, 121-143.

- Milinski M (1994) Hybridogenetic frogs on an evolutionary dead end road. *Trends in Ecology and Evolution* **9**, 62.
- Miller DL, Gray MJ (2009) Amphibian decline and mass mortality: The value of visualizing ranavirus in tissue sections. *Veterinary Journal*.
- Miller HC (2006) Cloacal and buccal swabs are a reliable source of DNA for microsatellite genotyping of reptiles. *Conservation Genetics* **7**, 1001-1003.
- Miner BG, Sultan SE, Morgan SG, Padilla DK, Relyea RA (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 685-692.
- Ministère de l'Ecologie, du Développement et de l'Aménagement durables (2007) Arrêté du 19 décembre 2007 fixant les listes des amphibiens et des reptiles protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection. *Journal Officiel de la République Française*.
- Moore WS (1977) An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review of Biology* **52**, 263-277.
- Moore WS (1984) Evolutionary ecology of unisexual fishes. In *Evolutionary genetics of fishes*. Tunner, B.J., Ed., New York, Plenum, 329-398.
- Morand A, Joly P (1995) Habitat variability and space utilization by the amphibian communities of the French upper-rhone floodplain. *Hydrobiologia* **300-301**, 249-257.
- Morand A, Joly P, Grolet O (1997) Phenotypic variation in metamorphosis in five anuran species along a gradient of stream influence. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Serie III* **320**, 645-652.
- Mourgaud G, Pailley P (2005) Atlas de répartition des Amphibiens (Urodèles, Anoures) et Reptiles (Chéloniens, Squamates) de Maine-et-Loire (France) 1990-2004. *Bulletin de l'Association "Les naturalistes Angevins"* **1**.
- Muir G, Fleming CC, Schllötterer C (2001) Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 112-119.
- Müller H, J., (1964) The relation of recombination to mutation advance. *Mutation Research* **1**, 2-9.
- Muratet J (2008) Identifier les Amphibiens de France métropolitaine. *Association Ecodiv*, 291.

- Murray KA, Skerratt LF, Speare R, McCallum H (2009) Impact and dynamics of disease in species threatened by the amphibian chytrid fungus, *batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* **23**, 1242-1252.
- Neat F, Fowler K, French V, Partridge L (1995) Thermal evolution of growth efficiency in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **260**, 73-78.
- Negovetic S, Anholt BR, Semlitsch RD, Reyer HU (2001) Specific responses of sexual and hybridogenetic European waterfrog tadpoles to temperature. *Ecology* **82**, 766-774.
- Neher RA, Shraiman BI, Fisher DS (2010) Rate of adaptation in large sexual populations. *Genetics* **184**, 467-481.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**, 283-292.
- Neveu A (2004) Raniculture or field harvesting? State of the art in France. *La raniculture est-elle une alternative a la recolte? Etat actuel en France* **17**, 167-175.
- Neveu A (2009) Suitability of European green frogs for intensive culture: Comparison between different phenotypes of the *esculenta* hybridogenetic complex. *Aquaculture* **295**, 30-37.
- Newman R, A., (1992) Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *BioScience* **42**, 671-678.
- Newman RA (1988) Adaptive plasticity in development of *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Evolution* **42**, 774-783.
- Newman RA (1989) Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology* **70**, 1775-1787.
- Newman RA, Dunham AE (1994) Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia*, 372-381.
- Newman RA, Squire T (2001) Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology* **10**, 1087-1100.
- Nikoloudakis N, Skaracis G, Katsiotis A (2008) Evolutionary insights inferred by molecular analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 and IGS *Avena* sp. sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**, 102-115.
- Nöller A, Nöller C (2003) Guide des amphibiens d'Europe - Biologie, Identification, Répartition. *Delachaux et Niestlé S.A., Lonay (Switzerland). Paris*, 383.
- Nylin S, Gotthard K (1998) Plasticity in life-history traits. In: *Annual Review of Entomology*, pp. 63-83.

- Oertli B, Auderset Joye D, Castella E, *et al.* (2005) PLOCH: a standardized method for sampling and assessing the biodiversity in ponds. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **15**, 665-679.
- Ogielska M (1994) Nucleus-like bodies in gonial cells of *Rana esculenta* (Amphibia, Anura) tadpoles - a putative way of chromosome elimination. *Zoologica Poloniae* **39**.
- Ohst T (2008) Genetische Einflüsse allochthoner Wasserfrösche auf endemische Wasserfroschpopulationen (*R. kl. esculenta* Komplex). *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin*, 127p.
- Ow YX, Todd PA (2010) Light-induced morphological plasticity in the scleractinian coral *Goniastrea pectinata* and its functional significance. *Coral Reefs*, 1-12.
- Pagano A (1999) Les complexes hybridogénétiques de grenouilles vertes: déterminants de la distribution dans la vallée alluviale du Rhône. *Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard - Lyon I*.
- Pagano A, Crochet PA, Graf JD, Joly P, Lode T (2001a) Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Global Ecology and Biogeography* **10**, 433-441.
- Pagano A, Dubois A, Lesbarrères D, Lodé T (2003) Frog alien species: A way for genetic invasion? *Comptes Rendus - Biologies* **326**, 85-92.
- Pagano A, Joly P (1999) Limits of the morphometric method for field identification of water frogs. *Alytes* **16**, 130-138.
- Pagano A, Joly P, Hotz H (1997) Taxon composition and genetic variation of water frogs in the Mid-Rhone floodplain. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Serie III* **320**, 759-766.
- Pagano A, Joly P, Plénet S, Lehman A, Grolet O (2001b) Breeding habitat partitioning in the *Rana esculenta* complex: The intermediate niche hypothesis supported. *Ecoscience* **8**, 294-300.
- Pagano A, Lesbarreres D, Crivelli A, *et al.* (2008) Geographical and ecological distributions of frog hemiclones suggest occurrence of both "general purpose genotype" and "frozen niche variation" clones. *J Zool Syst Evol Res* **46**, 162-168.
- Pagano A, Lode T, Crochet PA (2001c) New contact zone and assemblages among water frogs of Southern France. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **39**, 63-67.

- Pagano A, Schmeller D, S., (1999) Is recombination less negligible than previously described in hybridogenetic water frogs? In: *Miaud C, Guyétant R (eds) 9th O.G.Meeting - Current studies in Herpetology, Le Bourget du lac, Chambéry, France*, 351-356.
- Pahkala M, Laurila A, Merila J (2002) Effects of ultraviolet-B radiation on common frog *Rana temporaria* embryos from along a latitudinal gradient. *Oecologia* **133**, 458-465.
- Parmesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. In: *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* eds. Futuyma, Shaffer, Simberloff), pp. 637-669.
- Pascal M, Lorvelec O, Vigne JD, Keith P, Clergeau P (2003) Evolution holocène de la faune de vertébrés de France: Invasion et disparition. *Chap. Herpétofaune*, 143-165.
- Pasmans F, Mutschmann F, Halliday T, Zwart P (2006) Amphibian decline: The urgent need for amphibian research in Europe. *Veterinary Journal* **171**, 18-19.
- Patrelle C, Torsten O, Picard D, *et al.* (2010) A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs. *Molecular Ecology Resources*.
- Patrelle C (2010) Les complexes d'hybridation chez les grenouilles vertes: identification taxonomique, exigences écologiques, et capacités d'acclimatation. *PhD thesis, University of Angers, France*.
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Attademo AM, Beltzer AH (2006) Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. *Biodiversity and Conservation* **15**, 3499-3513.
- Pidancier N, Miquel C, Miaud C (2003) Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetological Journal* **13**, 175-178.
- Pigliucci M (2001) Phenotypic plasticity. Beyond Nature and Nurture. *John Hopkins University Press, Baltimore*.
- Pigliucci M (2005) Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 481-486.
- Pimm SL (1987) Determining the effects of introduced species. *Trends in Ecology & Evolution* **2**, 106-108.
- Plenet S, Hervant F, Joly P (2000a) Ecology of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: Differential oxygen requirements of tadpoles. *Evolutionary Ecology* **14**, 13-23.
- Plenet S, Joly P, Hervant F, Fromont E, Grolet O (2005) Are hybridogenetic complexes structured by habitat in water frogs? *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 1575-1586.
- Plenet S, Joly P, Pagano A (1998) Is habitat requirement by an oxygen-dependent frog (*Rana ridibunda*) governed by its larval stage? *Archiv fur Hydrobiologie* **143**, 107-119.

-
- Plenet S, Pagano A, Joly P, Fouillet P (2000b) Variation of plastic responses to oxygen availability within the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 20-28.
- Plötner J (2005) Die westpaläarktischen Wasserfrösche. *Von Märtyren der Wissenschaft zur biologischen sensation. Laurenti Verlag, Bielefeld, 160 Seiten.*
- Plötner J, Köhler F, Uzzell T, *et al.* (2009) Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5' truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia). *Molecular phylogenetics and evolution* **53**, 784-791.
- Plötner J, Ohst T (2001) New hypotheses on the systematics of the western Palearctic water frog complex (Anura, Ranidae) *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin. Zoologische Reihe* **77**, 5 – 21.
- Plötner J, Ohst T, Bohme W, Schreiber R (2001) Divergence in mitochondrial DNA of near Eastern water frogs with special reference to the systematic status of cyprite and Anatolian populations (Anura, Ranidae). *Amphibia Reptilia* **22**, 397-412.
- Plötner J, Uzzell T, Beerli P, *et al.* (2008) Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: A case in western Palaeartic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 668-681.
- Polls-Pelaz M (1995) Modes of gametogenesis among kleptons of the hybridogenetic water frog complex: an evolutionnary synthesis. *Zoologica Poloniae* **39**, 123-138.
- Pope SE, Fahrig L, Merriam HG (2000) Landscape complementation and metapopulation effects on leopard frog populations. *Ecology* **81**, 2498-2508.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Poschadel JR, Möller D (2004) A versatile field method for tissue sampling on small reptiles and amphibians, applied to pond turtles, newts, frogs and toads. *Conservation Genetics* **5**, 865-867.
- Poulakakis N, Lymberakis P, Antoniou A, *et al.* (2003) Molecular phylogeny and biogeography of the wall-lizard *Podarcis erhardii* (Squamata: Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **28**, 38-46.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, *et al.* (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* **439**, 161-167.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, *et al.* (2007) Global warming and amphibian losses; The proximate cause of frog declines? (Reply). *Nature* **447**.

- Primmer CR, Borge T, Lindell J, Sætre GP (2002) Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: High nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Molecular Ecology* **11**, 603-612.
- Pritchard J, K., Stephens M, and Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Quattro JM, Avise JC, Vrijenhoek RC (1992) An ancient clonal lineage in the fish genus *Poeciliopsis* (Atheriniformes: Poeciliidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 348-352.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Regnier V (1983) Etude écologique des grenouilles du complexe *Rana esculenta* L. en pays de Vilaine (Bretagne). *Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes I*, 125.
- Rhode JM, Cruzan MB (2005) Contributions of heterosis and epistasis to hybrid fitness. *The American naturalist* **166**.
- Richards J, F., (1990) Land transformation. in Turner II B. L., Clark W. C., Kates, R. W., Richards J. F., Mathews J. T., & Meyer W. B. . (eds) *The earth as transformed by human action*. New York, Cambridge University Press, 713.
- Rieseberg L, H., Wendel J, F., (1993) Introgression and its consequences in plant. In: Harrison (ed.) *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press, New York, 70-109.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, et al. (2003) Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* **301**, 1211-1216.
- Robbins TR, Pruitt JN, Straub LE, McCoy ED, Mushinsky HR (2010) Transgressive aggression in *Sceloporus* hybrids confers fitness through advantages in male agonistic encounters. *Journal of Animal Ecology* **79**, 137-147.
- Robinson SJW, Partridge L (2001) Temperature and clinal variation in larval growth efficiency in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 14-21.
- Roesli Marzia RH-U (2000) Male vocalization and female choice in the hybridogenetic *Rana lessonae/Rana esculenta* complex. *Animal Behaviour* **60**, 745-755.
- Rose M, R., Lauder G, V., (1996) Adaptation. *Academic Press, Inc.*
- Rowe G, Beebee T, J., C., (2004) Reconciling genetic and demographic estimators of effective population size in the anuran amphibian *Bufo calamita*. *Conservation Genetics* **5**, 287-298.

- Roy DB, Sparks TH (2000) Phenology of British butterflies and climate change. *Global Change Biology* **6**, 407-416.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, *et al.* (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 305-332.
- Santiani M (2002) Amphibiens et reptiles. *Artémis Editions*, 128.
- Saunders D, A., Hobbs R, J., Margues C, R., (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* **5**, 18-32.
- Scheepens JF, Frei ES, Stöcklin J (2010) Genotypic and environmental variation in specific leaf area in a widespread Alpine plant after transplantation to different altitudes. *Oecologia*, 1-10.
- Scheiner SM (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 35-68.
- Schlichting C, D., Pigliucci M (1998) Phenotypic evolution. *Sinauer Sunderland, MA*.
- Schmalhausen I, I., (1949) Factors of evolution. *University of Chicago Press, Chicago*.
- Schmeller DS (2004) Tying ecology and genetics of hemiclonally reproducing waterfrogs (Rana, Anura). *Annales Zoologici Fennici* **41**, 681-987.
- Schmeller DS, Pagano A, Plénet S, Veith M (2007) Introducing water frogs - Is there a risk for indigenous species in France? *Comptes Rendus - Biologies* **330**, 684-690.
- Schon I, Martens K, Van Doninck K, Butlin RK (2003) Evolution in the slow lane: Molecular rates of evolution in sexual and asexual ostracods (Crustacea: Ostracoda). *Biological Journal of the Linnean Society* **79**, 93-100.
- Schultz RJ (1969) Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost Poeciliopsis (Poeciliidae) and other vertebrates. *Amer. Nat.* **103**, 605-619.
- Schultz RJ (1971) Special adaptive problems associated with unisexual fishes. *Am. Zool.* **11**, 351-360.
- Schultz RJ (1977) Evolution and ecology of unisexual fishes. *Plenum Press, New York, USA*, 277-331.
- Scott D, E., (1994) The effect of larval density on adult demographic traits in *Ambystoma opacum*. *Ecology* **75**, 1383-1396.
- Scribner KT, Arntzen JW, Cruddace N, Oldham RS, Burke T (2001) Environmental correlates of toad abundance and population genetic diversity. *Biological Conservation* **98**, 201-210.

- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 198-207.
- Semlitsch R, D., (1990) Effects of body size, sibship, and tail injury on the susceptibility of tadpoles to dragonfly predation. *Canadian Journal of Zoology* **68**, 1027-1030.
- Semlitsch RD (1993) Adaptive genetic variation in growth and development of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Evolution* **47**, 1805-1818.
- Semlitsch RD, Hotz H, Guex GD (1997) Competition among tadpoles of coexisting hemiclones of hybridogenetic *Rana esculenta*: Support for the frozen niche variation model. *Evolution* **51**, 1249-1261.
- Semlitsch RD, Reyer HU (1992) Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: interactions with pond drying and interspecific competition. *Evolution* **46**, 665-676.
- Seppa P, Laurila A (1999) Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity* **82**, 309-317.
- Shiesari L (2006) Pond canopy cover: a resource gradient for anuran larvae. *Freshwater Biology* **51**, 412-423.
- Simon JC, Delmotte F, Rispe C, Crease T (2003) Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: The possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society* **79**, 151-163.
- Sinervo B, Méndez-de-la-Cruz F, Miles DB, *et al.* (2010) Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science* **328**, 894-899.
- Sinsch U (1992) Structure and dynamic of a natterjack toad metapopulation (*Bufo calamita*). *Oecologia* **90**, 489-499.
- Sjogren P (1991) Extinction and isolation gradients in metapopulations: the case of the pool frog (*Rana lessonae*). *Biological Journal of the Linnean Society* **42**, 135-147.
- Skelly D, K., Freidenburg L, K., Kiesecker J, M., (2002) Forest canopy and the performance of larval amphibians. *Ecology* **83**, 983-992.
- Skelly DK, Werner EE (1990) Behavioral and life-historical responses of larval American toads to an odonate predator. *Ecology* **71**, 2313-2322.
- Skov F, Svenning JC (2004) Potential impact of climatic change on the distribution of forest herbs in Europe. *Ecography* **27**, 366-380.
- Smith D, C., (1987a) Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* **68**, 344-350.

- Smith DC (1983) Factors controlling tadpole populations of the chorus frog (*Pseudacris triseriata*) on Isle Royale, Michigan. *Ecology* **64**, 501-510.
- Smith DC (1987b) Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* **68**, 344-350.
- Smith GR, Waters MA, Rettig JE (2000) Consequences of embryonic UV-B exposure for embryos and tadpoles of the plains leopard frog. *Conservation Biology* **14**, 1903-1907.
- Smith JJ, Voss SR (2009) Amphibian sex determination: Segregation and linkage analysis using members of the tiger salamander species complex (*Ambystoma mexicanum* and *A. t. tigrinum*). *Heredity* **102**, 542-548.
- Snell C, Tetteh J, Evans IH (2005) Phylogeography of the pool frog (*Rana lessonae* Camerano) in Europe: Evidence for native status in Great Britain and for an unusual postglacial colonization route. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**, 41-51.
- Soderback B (1995) Replacement of the native crayfish *Astacus astacus* by the introduced species *Pacifastacus leniusculus* in a Swedish lake: Possible causes and mechanisms. *Freshwater Biology* **33**, 291-304.
- Stearns S, C., (1989) The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience* **39**, 436-445.
- Stebbins G, L., Jr. (1959) Variation and evolution in plants. *Columbia University Press, New York*.
- Steigenga MJ, Fischer K (2007) Within- and between-generation effects of temperature on life-history traits in a butterfly. *Journal of Thermal Biology* **32**, 396-405.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, *et al.* (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* **306**, 1783-1786.
- Sultan SE (1996) Phenotypic plasticity for offspring traits in *Polygonum Persicaria*. *Ecology* **77**, 1791-1807.
- Sultan SE (2000) Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* **5**, 537-542.
- Sultan SE (2001) Phenotypic plasticity for fitness components in *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. *Ecology* **82**, 328-343.
- Sultan SE, Spencer HG (2002) Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *American Naturalist* **160**, 271-283.

- Sunquist M, E., Sunquist F (2001) Changing landscapes: consequences for carnivores, in Gittleman J. L., Funk S. M., Macdonald D. W. & Wayne R. K. (eds). *Carnivore conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 640.
- Swihart RK, Gehring TM, Kolozsvary MB, Nupp TE (2003) Responses of 'resistant' vertebrates to habitat loss and fragmentation: The importance of niche breadth and range boundaries. *Diversity and Distributions* **9**, 1-18.
- Tagu U (2003) Principes des techniques de biologie moléculaire. *INRA Editions, Paris*.
- Tallmon DA, Luikart G, Waples RS (2004) The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 489-496.
- Tejedo M, Reques R (1994) Plasticity in metamorphic traits of natterjack tadpoles: The interactive effects of density and pond duration. *Oikos* **71**, 295-304.
- Terry Bowyer R, Stewart KM, Kie JG, Gasaway WC (2001) Fluctuating asymmetry in antlers of Alaskan moose: Size matters. *Journal of Mammalogy* **82**, 814-824.
- Thomas CD, Lennon JJ (1999) Birds extend their ranges northwards [4]. *Nature* **399**, 213.
- Tietje GA, Reyer HU (2004) Larval development and recruitment of juveniles in a natural population of *Rana lessonae* and *Rana esculenta*. *Copeia*, 638-646.
- Tinti F, Mantovani B, Scali V (1995) Reproductive features of homospecific hybridogenetically-derived stick insects suggest how unisexuals can evolve. *Journal of Evolutionary Biology* **8**, 81-92.
- Travis J, Keen W, H., Julianna J (1985) The effects of multiple factors on viability selection in *Hyla gratiosa* tadpoles. *Evolution* **39**, 1087-1099.
- Trexler JC, Travis J, Trexler M (1990) Phenotypic plasticity in the sailfin molly, *Poecilia latipinna* (Pisces: Poeciliidae). II. Laboratory experiment. *Evolution* **44**, 157-167.
- Tully T, Ferrière R (2008) Reproductive flexibility: Genetic variation, genetic costs and long-term evolution in a collembola. *PLoS ONE* **3**.
- Tunner H, G., (1979) The inheritance of morphology and electrophoretic markers from homotypic crosses of the hybridogenetic *Rana esculenta*. *Mitt. Zool. Mus. Berlin* **55**, 89-109.
- Tunner HG (1992) Locomotory behaviour in water frogs from Neusiedlersee (Austria, Hungary). 15 km migration of *Rana lessonae* and its hybridogenetic associate *Rana esculenta*. Z. Korsos, and I. Kiss (Eds). *Proc. Sixth Ord. Gen. Meet. S. E. H. Budapest 1991.*, 449-452.

- Tunner HG, Heppich S (1981) Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. *Naturwissenschaften* **68**, 207-208.
- Tunner HG, Nopp H (1979) Heterosis in the common European water frog. *Naturwissenschaften* **66**, 268-269.
- UICN (2008) Comité français de l'UICN. Liste rouge des Amphibiens et Reptiles de France.
- UNEP (2002) Global environment outlook 3 (GEO3). Past, present and future perspectives. *Earthscan, London, UK*, 446. <http://www.unep.org/geo/geo443/>.
- UNEP (2010) UNEP Annual Report 2009. *UNEP Publication*, 94.
- Uzzell T, Berger L (1975) Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and their hybridogenetic associate, *Rana esculenta*. *Proceedings of the Academy of Natural sciences of Philadelphia* **127**, 13-24.
- Uzzell T, Hotz H (1979) Electrophoretic and morphological evidence for two forms of green frogs (*Rana esculenta* complex) in peninsular Italy (Amphibia, Salientia). *Mitt. Zool. Mus. Berlin* **55**, 13-27.
- Uzzell T, Hotz H, Berger L (1980) Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* Hybrid: evidence from electrophoresis of individual oocytes. *The Journal of Experimental Zoology* **214**.
- Van Buskirk J (2002) A comparative test of the adaptative plasticity hypothesis: relationships between habitat and phenotype in Anuran larvae. *The American Naturalist* **160**.
- Van Buskirk J, Arioli M (2005) Habitat specialization and adaptative phenotypic divergence of anuran populations. *J. Evol. Biol.* **18**, 596-608.
- Van Buskirk J, McCollum SA, Werner EE (1997) Natural selection for environmentally induced phenotypes in tadpoles. *Evolution* **51**, 1983-1992.
- Van Doninck K, Schön I, De Bruyn L, Martens K (2002) A general purpose genotype in an ancient asexual. *Oecologia* **132**, 205-212.
- Van Doorn GS, Edelaar P, Weissing FJ (2009) On the origin of species by natural and sexual selection. *Science* **326**, 1704-1707.
- Veith M, Kosuch J, Vences M (2003) Climatic oscillations triggered post-Messinian speciation of Western Palearctic brown frogs (Amphibia, Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**, 310-327.
- Vié J-C, Hilton-Taylor C, Stuart S, N., (2009) Wildlife in a changing world - An analysis of the 2008 IUNC red list of threatened species. *Gland, Switzerland: IUCN*, 180.

- Vinogradov A, E., Chubinishvili AT (1999a) Genome reduction in a hemiclonal frog *Rana esculenta* from Radioactively contaminated areas. *Genetics* **151**.
- Vinogradov AE, Borkin LJ, Gunther R, Rosanov JM (1991) Two germ cell lineages with genomes of different species in one and the same animal. *Hereditas* **114**, 245-251.
- Vinogradov AE, Chubinishvili AT (1999b) Genome reduction in a hemiclonal frog *Rana esculenta* from radioactively contaminated areas. *Genetics* **151**, 1123-1125.
- Vitousek P, M., Mooney H, A., Lubchenko J, Melillo J, M., (1997) Human domination of earth's ecosystems. *Science* **277**, 494-499.
- Vorburger C (2001a) Fixation of deleterious mutations in clonal lineages: Evidence from hybridogenetic frogs. *Evolution* **55**, 2319-2332.
- Vorburger C (2001b) Genomic imprinting or mutation and interclonal selection in triploid hybrid frogs? A comment on Tunner. *Amphibia-Reptilia* **22**, 263-265.
- Vorburger C (2001c) Heterozygous fitness effects of clonally transmitted genomes in waterfrogs. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 602-610.
- Vorburger C (2001d) Non-hybrid offspring from matings between hemiclonal hybrid waterfrogs suggest occasional recombination between clonal genomes. *Ecology Letters* **4**, 628-636.
- Vorburger C, Reyer HU (2003) A genetic mechanism of species replacement in European waterfrogs? *Conservation Genetics* **4**, 141-155.
- Vorburger C, Ribi G (1999) Aggression and competition for shelter between a native and an introduced crayfish in Europe. *Freshwater Biology* **42**, 111-119.
- Vorburger C, Sunnucks P, Ward SA (2003) Explaining the coexistence of asexuals with their sexual progenitors: no evidence for general-purpose genotypes in obligate parthenogens of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Ecology Letters* **6**, 1091-1098.
- Vorburger C. (2001) Heterozygous fitness effects of clonally transmitted genomes in waterfrogs. *J. Evol. Biol.*, 602-610.
- Vos CC, Chardon JP (1998) Effects of habitat fragmentation and road density on the distribution pattern of the moor frog *Rana arvalis*. *Journal of Applied Ecology* **35**, 44-56.
- Voyles J, Young S, Berger L, *et al.* (2009) Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science* **326**, 582-585.

- Vrijenhoek RC (1978) Coexistence of clones in a heterogeneous environment. *Science* **199**, 549-552.
- Vrijenhoek RC (1979) Factors affecting clonal diversity and coexistence. *Am. Zool.* **19**, 787-797.
- Vrijenhoek RC (1984) Ecological differentiation among clones: the frozen niche variation model. *Population biology and evolution*, 217-231.
- Vrijenhoek RC (1994) Unisexual fish: Model systems for studying ecology and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**, 71-96.
- Vrijenhoek RC (1998) Animal clones and diversity: Are natural clones generalists or specialists? *BioScience* **48**, 617-628.
- Wagner RS, Miller MP, Haig SM (2006) Phylogeography and genetic identification of newly-discovered populations of torrent salamanders (*Rhyacotriton cascadae* and *R. variegatus*) in the central cascades (USA). *Herpetologica* **62**, 63-70.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**, 506-513.
- Walsh PT, Downie JR, Monaghan P (2008) Larval over-wintering: Plasticity in the timing of life-history events in the common frog. *Journal of Zoology* **276**, 394-401.
- Weir B, S., Cockerham C, C., (1984) Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Werner EE, Glennemeier K, S., (1999) Influence of forest canopy cover on the breeding pond distributions of several amphibian species. *Copeia* **1999**, 1-12.
- West-Eberhard M, J., (2003) Developmental plasticity and evolution. *Oxford University Press, Inc.*
- Wilcox BA, Murphy DD (1985) Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. *American Naturalist* **125**, 879-887.
- Williams G, C., (1992) Natural selection, domains, levels, and applications. *Oxford University Press, Oxford.*
- Wilson ACC, Sunnucks P, Hales DF (1999) Microevolution, low clonal diversity and genetic affinities of parthenogenetic sitobion aphids in New Zealand. *Molecular Ecology* **8**, 1655-1666.
- Wilson CC, Hebert PDN (1992) The maintenance of taxon diversity in an asexual assemblage: an experimental analysis. *Ecology* **73**, 1462-1472.

- Wycherley J, Doran S, Beebee TJC (2002) Male advertisement call characters as phylogeographical indicators in European water frogs. *Biological Journal of the Linnean Society* **77**, 355-365.
- Yilmaz N, Kutrup B, Cobanoglu U, Ozoran Y (2005) Age determination and some growth parameters of a *Rana ridibunda* population in Turkey. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **51**, 67-74.
- Zeisset I, Beebee T, J., C., (2000) Primer notes: Polymerase chain reaction pprimers for microsatellite loci in the north european water frogs *Rana ridibunda* and *Rana lessonae*. *Molecular Ecology* **9**, 1173.
- Zeisset I, Beebee TJC (2001) Determination of biogeographical range: An application of molecular phylogeography to the European pool frog *Rana lessonae*. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **268**, 933-938.
- Zeisset I, Beebee TJC (2003) Population genetics of a successful invader: The marsh frog *Rana ridibunda* in Britain. *Molecular Ecology* **12**, 639-646.

Annexes

Annexe 1

Fiche terrain de caractérisation de l'habitat

Localisation du site

Type de site: fossé mare étang lac tourbière carrière
 Nom du site: Région:
 N° du site: Départmt:
 Coordonnées GPS: Canton:
 N°de la photo : Commune:
 Age: Lieu-dit:
 Propriétaire: Situation géographique:
 Coordonnées du Propriétaire:
 Gestionnaire: Date d'observation:

Hydrologie

Origine de l'eau: Ruissellement des eaux de pluies
 Débordement d'une rivière nom:
 Eaux de drainage
 Affleurement de la nappe phréatique: Source
 Rivière:
 Ruisseaux:
 Inconnue Autre:
Régime de mise en eau: Temporaire: Période d'assèchement:
 permanent
 permanent avec inondations
Connectivité: Nombre de connexions visibles avec le site:
 Connexions actives:
 Connexions non actives (asséchées):

Niveau de submersion par rapport à la première visite:

Coloration : algues matières en suspension pollution néant
Odeur nauséabonde : oui non
Turbidité de l'eau limpide claire turbide

Milieu d'implantation

Matrice :

Forêt:	de feuillus	de conifères	mixte	
Prairie:	de fauche	pâturée		
Champ cultivé	friches	carrière	tourbière	
Zone urbaine	Bois	Peupleraie	Autre:	

Situation du site:	zone ouverte	zone semi-ouverte		
	Zone partiellement ombragée	zone fermée		

Exposition du site:	< 25 %	25 à 50%	51 à 75%	> 75%
----------------------------	--------	----------	----------	-------

Nature du Substrat:	à dominance organique		mixte	à dominance inorganique
----------------------------	-----------------------	--	-------	-------------------------

Composition du fond:	pavé	béton	rocheux	graviers
	galets	sableux	limoneux	argileux
	vaseux	palplanches	encombrement	tourbeux
	bois mort	autre:		

Caractérisation des Berges

Contour des berges :	monotone	irrégulier
Présence de végétation sur les berges:	% age de berges nues (béton/terre):	
	% age de berges végétalisées:	

Type de végétation:	% age d'Herbacées (basses):
	% age d'Arbustes:
	% age d'Arbres:

Pente:	très douce	douce	moyenne	abrupte	très abrupte	à pic
Pourcentage :	=100%					

Milieu aquatique

Végétation aquatique visible:

flottante:	< 25%	26 à 50%	51 à 75%	> 75%
enracinées émergentes:	< 25%	26 à 50%	51 à 75%	> 75%

Recouvrement de la surface :

Hélophyte à appareil végétatif totalement aérien	Hydrophyte à feuilles de types émergentes et flottantes et/ou submergées	Hydrophyte à feuilles de 2 types : flottantes et submergées	Hydrophyte à feuilles toutes flottantes	hydrophyte flottant non enraciné	algues affleurantes	eau libre avec hydrophytes à feuilles toutes submergées	eau libre sans végétation aquatique	
... % + ±	... % + ±	... % + ±	... % + ±	... % + ±	... % + ±	... % + ±	... % + ±	=100% ±

Etat de Conservation

Utilisations connues:	abreuvoir bassin de rétention faune sauvage	loisir irrigation	aggrément chasse autre:	pêche aucun		
Accessibilité :	facile	grillage	clotûres (barbelé, électrique...)	murets	haie	fossé
Pollutions fixes connues:						
Entretien du site:	oui	non	inconnu			
	ℒ de quel type:		élagage autre:	curage	fauchage des berges	
Comblement:	par des gravats par des Bois morts autre:	par de la terre aucun	MO			
Stade d'évolution de la mare :	3. saturée à 100% de végétation herbacée enracinée					
1. pionnier (récemment curée...)	4. partiellement dissimulée sous rones/ligneux					
	5. entièrement sous les ronces					
2. végétation enracinée avec de l'eau libre	/ligneux					

Milieu environnant: rayon de 50m

Environnement Hydrologique: Rivières ℒ actif asséché Étangs ℒ actif asséché Tourbières ℒ actif asséché Canal ℒ actif asséché Autre: ℒ actif asséché Ruisseaux ℒ actif asséché Mare ℒ actif asséché Fossés ℒ actif asséché Source ℒ actif asséché Lacs ℒ actif asséché Marais ℒ actif asséché Ornières ℒ actif asséché Aucun
Infrastructures proches:autoroutes ℒ fréquent°routes 2ndaires ℒ fréquent° Autre: ℒ fréquent°nationales ℒ fréquent° Chemins ℒ fréquent°départementale ℒ fréquent° Voies ferrées ℒ fréquent°
Exploitation agricoles Habitations	...Patrimoine Bâti
Environnement terrestre:	Champs: ℒ %age: jardin: ℒ %age: forêt ℒ %age:	prairie de fauche: ℒ %age: haies: ℒ %age: zone urbaine: ℒ %age:	prairie pâturée: ℒ %age: bois: ℒ %age:

Milieu environnant: rayon de 250m
--

Environnement Hydrologique:

..... Rivières ℒ actif asséché Ruisseaux ℒ actif asséché Lacs ℒ actif asséché
..... Étangs ℒ actif asséché Mare ℒ actif asséché Marais ℒ actif asséché
..... Tourbières ℒ actif asséché Fossés ℒ actif asséché Ornières ℒ actif asséché
.... Canal ℒ actif asséché	Source ℒ actif asséché	Aucun
Autre: ℒ actif asséché		

Infrastructures proches:

.....autoroutes ℒ fréquent°nationales ℒ fréquent°départementale ℒ fréquent°
....routes 2ndaires ℒ fréquent° Chemins ℒ fréquent° Voies ferrées ℒ fréquent°
Autre: ℒ fréquent°		

.....Exploitation agricoles

..... Habitations

...Patrimoine Bâti

Environnement terrestre:

Champs: ℒ %age: jardin:	prairie de fauche: ℒ %age: haies:	prairie pâturée: ℒ %age: bois: ℒ %age:
ℒ %age: forêt ℒ %age:	ℒ %age: zone urbaine: ℒ %age:	

Annexe 2

Article sous presse dans *Mol Ecol Res*

A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs

Cécile Patrelle^{1,2,3*}, Torsten Ohst^{4,5}, Damien Picard¹, Alain Pagano¹, Stéphane Sourice¹,
Marie-Gaëlle Dally¹, and Jörg Plötner⁴

Postal addresses :

¹ LEESA, GECCO, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France ;

² C2A-CERFE, 5 rue de la Heronnière, F-08240 Boulton-aux-Bois, France;

³ UMR PaVé, INRA, 42 rue Georges Morel, Beaucozéz, France.

⁴ Museum für Naturkunde, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung an der Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstraße 43, D-10115 Berlin, Germany

⁵ Institut für Mikrobiologie und Hygiene (Charité), Humboldt-Universität zu Berlin, Dorotheenstraße 96, D-10117 Berlin, Germany

Key words: water frogs, *Pelophylax*, species determination, PCR-RFLP, ITS2.

Authors addresses:

*Author for Correspondence: Cécile Patrelle: cecile.patrelle@gmail.com; 2C2A-CERFE, 5 rue de la Heronnière, F-08240 Boulton-aux-Bois, France, Tel: +33 2 41 73 54 37, fax : +33 2 41 73 53 52;

*Author for Correspondence: Alain Pagano: alain.pagano@univ-angers.fr; LEESA, GECCO, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France Tel: +33 2 41 73 50 82; Fax : +33 2 41 73 53 52

Torsten Ohst: torsten.ohst@mfn-berlin.de Museum für Naturkunde, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung an der Humboldt-Universität zu Berlin,

Invalidenstraße 43, 10115 D-Berlin, Germany Tel: +49 30 2093 8731, Fax: +49 30 2093 8525.

Damien Picard: damien.picard@univ-angers.fr; *LEESA, GECCO, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France* Tel : +33 2 41 73 53 66, Fax : +33 2 41 73 53 52

Marie-Gaelle Dallay: mgdallay@hotmail.com, 2 impasse de Rivoli, 37000 Tours, France Tel: +33 2 47 66 34 19.

Stéphane Sourice: stephane.sourice@univ-angers.fr; *LEESA, GECCO, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 bvd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France* Tel : +33 2 41 73 54 10, Fax : +33 2 41 73 53 52

Jörg Plötner: joerg.ploetner@mfn-berlin.de, *Museum für Naturkunde, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung an der Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstraße 43, D-10115 Berlin, Germany* Tel: +49 30 2093 8508, Fax: +49 30 2093 8525.

Running title : PCR-RFLP for water frog determination

Abstract:

We describe a non-invasive, PCR-RFLP-based method that allows reliable determination of the European water frog species *Pelophylax lessonae* and *P. ridibundus* and the hybrid form *P. esculentus*. Maximum likelihood analysis of ITS2 sequences revealed two robust monophyletic clades corresponding to water frogs of the *P. lessonae* and *P. ridibundus* groups. Three restriction enzymes (*KpnI*, *HaeII*, *SmaI*) were used to digest three conserved ITS2 domains. Taxonomic identification was unambiguous; the three restriction enzymes gave the same results. A French reference sample was identified using allozyme electrophoresis. Our PCR-RFLP method confirmed circa 83% of identification of the allozyme method. We conclude that the difference between identifications was caused by introgression.

Text:

The western Palearctic water frog (WPWF) group is an impressive example demonstrating the importance of molecular methods for species determination (Hotz 1983; Hotz & Semlitsch 2000; Lodé & Pagano 2000; Pagano & Joly 1999; Plötner *et al.* 2007; Plötner & Ohst 2001;

Plötner *et al.* 2001), for example in the context of conservation and biodiversity studies. Many WPWF species are morphologically uniform but exhibit specific molecular characters such as unique protein coding alleles (Plötner & Ohst 2001), microsatellites (Christiansen 2005; Garner *et al.* 2000; Holsbeek *et al.* 2009a; Holsbeek *et al.* 2008; Holsbeek *et al.* 2009b; Hotz *et al.* 2001; Zeisset & Beebee 2000), nuclear sequences (Ohst 2008; Plötner *et al.* 2009) and mitochondrial (mt) DNA markers (Holsbeek *et al.* 2008; Plötner 1998; Plötner *et al.* 2008). Widespread hybridization between genetically similar water frog species and lineages (e.g. Akin *et al.* 2010) may pose serious problems for species determination.

In contrast to water frogs from Anatolia and central Asia, the Central and eastern European species *P. lessonae* and *P. ridibundus* and their hybridogenetic associate *P. esculentus* possess distinct morphological and bioacoustic characters that allow an almost exact determination of these forms (Günther 1990; Plötner 2005). Nevertheless, the occurrence of triploid hybrids that possess either two *lessonae* genomes and one *ridibundus* genome (LLR) or two *ridibundus* genomes and one *lessonae* genome (RRL) hampers identification because of gene-dosage effects (Berger *et al.* 1986; Vorburger 2001): in LLR individuals the L genome is expressed twice resulting in a *lessonae*-like phenotype while RRL hybrids are often similar to *P. ridibundus*. In western Europe the determination of water frogs by morphological and bioacoustic methods may also fail because of extensive hybridization between autochthonous and allochthonous lineages (Christiansen 2005; Günther *et al.* 1979; Holsbeek *et al.* 2008; Pagano *et al.* 2003), which produces intermediate character states for many individuals. Furthermore, character expression depends on age; compared to adults, diagnostic characters are often less clearly expressed in juveniles. Thus, genetic markers are a valuable addition to morphology for identifying adult frogs and even more useful for the determination of juveniles and larvae.

Here we present a relatively inexpensive, rapid, and non-invasive molecular method that allows distinguishing the European water frog forms *P. lessonae*, *P. ridibundus*, and *P. esculentus* with high certainty. Our method is based on specific restriction sites in a 271 bp PCR fragment obtained from the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of WPWFs. This ribosomal DNA region has high inter-specific variability and is useful in phylogeny (Gottschling *et al.* 2005; Van Doninck *et al.* 2002) and for determination purposes (Joseph *et al.* 1999; Nikoloudakis *et al.* 2008), especially in hybrid complexes (Malécot *et al.* 2009). 91

individuals were collected in Europe and Asia at 28 localities (sample 1, Table 1). Additionally, 93 specimens were collected in southern France at 8 localities (sample 2, locality information was given by Pagano *et al.* 2001a). DNA was isolated from tissue (blood, muscle, buccal swabs) using QIAmp blood and tissue kits (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) or the 5% Chelex 100 ion exchange resin method (Walsh *et al.* 1991). Before DNA extraction ethanol-preserved material was soaked in three changes of distilled water over a 48-h period.

DNA amplification was performed with the primer set ITS2-hin (5-GGATCACTCGGCTCGTGGTCGATGAAG-3) and ITS2-rück (5-CGGGGATTTCGGCGCTGGGCTCTTCCC) (Ohst 2008) on a iCycler® gradient (BIO-RAD) in a total volume of 35 µl containing 0.29 µM of each primer, 0.37 mM of each dNTP, 1.47 mM MgCl₂, 7 µl (20%) Q-Solution (Qiagen), and 1.25 units *Taq* DNA polymerase (Promega, Mannheim, Germany). Cycling consisted of a denaturation step at 96 °C for 30 s, annealing at 64 °C for 20 s, and extension at 72°C for 50 s for 40 cycles. ITS2 fragments, visualized via UV light in ethidium bromide stained 1.4% agarose gels, were cut out and purified with QIAquick PCR purification kits (Qiagen). PCR products were directly cycle sequenced using PCR primers and BigDye terminator chemistry on an ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Sequences were aligned with the alignment editor implemented in BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999). Among the 93 ITS2 sequences analysed (Table 1), 23 alleles were detected on the basis of DNA sequences (Ohst 2008): 2 alleles are specific for *P. epeiroticus*, 6 alleles are specific for frogs of the *P. lessonae* group (WFL alleles); 14 alleles are characteristic of frogs of the *P. ridibundus* group (WFR alleles) including *P. kurtmuelleri* (Balkan), *P. bedriagae* (The Levant), and Anatolian water frogs (*P. cf. bedriagae*). Model parameters for likelihood searches were estimated using Modeltest v.3.7 (Posada & Crandall 1998), which compares goodness of fit of models using likelihood ratio tests. The best-fit model for the *Pelophylax* sequences was the HKY model (Hasegawa *et al.* 1985), with a ts/tv ratio = 1.0742. Maximum likelihood (ML) analysis was conducted using the PHYML program (Guindon & Gascuel 2003). Tree robustness was assessed by bootstrap analysis (Felsenstein 1985) involving 1000 iterations. The ML tree clearly revealed two monophyletic clades, the “*P. ridibundus* group” and the “*P. lessonae* group” (Figure 1). Each clade was supported by a high bootstrap (value > 80%); genetic distances between haplotypes within each clade was relatively small compared to those

calculated between the two clades (cf branch lengths in Figure 1). Conserved domains detected in the alignment were tested for restriction enzymes that allow differentiation between alleles of the *P. ridibundus* group and alleles specific for *P. lessonae* and *P. bergeri* (Italy). Three restriction sites were found in a conserved ITS2 domain comprising 271 bp: all frogs of the *P. ridibundus* group exhibited a homologous restriction site for *KpnI* (Promega) in this domain; all individuals of the *P. lessonae* group possessed restriction sites for *HaeII* (Promega) and *SmaI* (Promega) at homologous positions.

A conserved 271 bp ITS2 domain within the ITS2 PCR product was amplified for 93 frogs (sample 2) using the primer set ITS2-WFL (5-TTCGTCCCCCGAAGGCCAGA-3) and ITS2-WFR (5-CTTAAATTCAGCGGGTCGCC-3). Amplifications were conducted on a iCycler® gradient (BIO-RAD) in a total volume of 10 µl, containing 0.24 µM of each primer, 0.25 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.8 µM DMSO, and 0.4 units *Taq* DNA polymerase (Promega) using the cycling profile described above. Amplified fragments were digested for 6 hours at 37 °C in a total volume of 12 µl containing 2 µl of the amplified conserved domain, 3.6 units restriction enzyme, 1 mM buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 50% glycerol), and 0.1 mM BSA. Digested fragments were separated in ethidium bromide stained 3% agarose gels and visualized via UV light. Fragment lengths were estimated by comparison with a 100 bp DNA Step Ladder (Promega).

The PCR-RFLP method for determination of European water frogs was compared to the taxonomic affiliation given by protein electrophoresis. We analyzed the following enzymes of all 93 French individuals (sample 2): lactate dehydrogenase (LDH-B, E.C.1.1.1.27), α-glycerophosphate dehydrogenase (α-GDH, E.C.1.1.1.8), mannose-6-phosphate isomerase (MPI E.C.5.3.1.8), and phosphoglucomutase 2 (PGM-2, E.C.5.4.2.2). We also compared DNA obtained from buccal swabs and DNA extracted from muscles tissue in the 93 French frogs previously sacrificed (data base of A. Pagano) to test whether there is an influence of the sample method on the DNA quality expressed by differences in the restriction patterns.

The restriction enzymes, applied to the ITS2 amplicons, revealed banding patterns specific for *P. ridibundus*, *P. lessonae*, and *P. esculentus* (Fig. 2). *KpnI* cuts *P. ridibundus* specific ITS2 products into fragments with sizes of 47 and 224 bp, *HaeII* and *SmaI* cut *P. lessonae* ITS2

products into fragments with sizes of 48 and 223 bp and 62 and 209 bp, respectively (Fig. 2). We cannot, however, distinguish between the restriction patterns of autochthonous and allochthonous lake frogs of the *P. ridibundus* group nor can we differentiate between Central European *P. lessonae* and Italian *P. bergeri*.

The tissue type (muscle tissue, blood, buccal swabs) had no influence on the restriction profiles evidencing the suitability of the swab method as a non-invasive sample technique (Broquet *et al.* 2007; Goldberg *et al.* 2003; Miller 2006; Pidancier *et al.* 2003; Poschadel & Möller 2004). From the perspective of animal welfare this is a great advantage of our method; toe clips as required for protein electrophoresis are no longer necessary.

As evidenced for the French reference samples, the three different restriction enzymes revealed identical identification results. Moreover, PCR-RFLP and protein electrophoresis (Pagano *et al.* 2001a) resulted in identical species affiliation in 83% of the individuals. 27 individuals classified as *P. ridibundus* on the basis of ITS2 exhibited *ridibundus* specific electrophoretic bands (concordance of 100%). Among 29 individuals determined as *P. lessonae* by the PCR-RFLP method, five (20.83%) were identified with allozyme markers as *P. esculentus*. 37 showed restriction patterns specific for *P. esculentus*, 9 of these (24.32%) exhibited a protein electrophoretic pattern specific for *P. ridibundus*, and two (5.4%) possessed zymograms specific for *P. lessonae*.

Our new PCR-RFLP based method, using three restriction sites, our allows an efficient taxonomic affiliation of Central European water frogs. The most parsimonious explanation for discrepancies between the allozyme and PCR-RFLP identifications methods is genetic introgression. Introgressions of *P. ridibundus* specific alleles into the gene pool of *P. lessonae* and vice versa, mediated by the hybrid form *P. esculentus* were observed several times (Mezhzherin & Morozov-Leonov 1997; Pagano & Schmeller 1999). In contrast to Central and eastern Europe, more genetic recombination and introgression can be expected in western Europe because of many fertile Mendelian hybrids that originate from matings between allochthonous lake frog lineages and autochthonous forms (Holsbeek *et al.* 2008; Mezhzherin & Morozov-Leonov 1997; Pagano *et al.* 2001a; Pagano *et al.* 2003; Pagano *et al.* 2001b; Plötner *et al.* 2008; Vorburger & Reyer 2003). Backcrosses of such hybrids with *P. lessonae*

and *P. ridibundus* can result in individuals that represent genetic mosaics comprising genetic characters specific for several species (Ohst 2008). To detect introgression events, and if the samples are expected to contain allochthonous water frogs, species determination requires more than one genetic marker, as for example, serum albumin intron 1 (Plötner et al. 2009) and/or a combination of different microsatellites (Garner *et al.* 2000; Hotz *et al.* 2001; Zeisset & Beebee 2000). We cannot, however, exclude identification errors regardless the method applied.

DNA based methods, such as PCR-RFLP, sequence analysis, or microsatellite analysis are current methods for water frog systematics. Compared to other DNA based methods, PCR-RFLP is a relatively inexpensive, fast, and non-invasive method that allows ready determination of the Central European water frog. Additional genetic methods are required, however, to differentiate between autochthonous and allochthonous water frogs.

Acknowledgements

We thank Ould Shela Daf Daf for providing frogs and Damien Perin for technical assistance. Grateful thanks are due to Christian Legros, Chaput-Bary Audrey, and Thomas Uzzell for critical comments on the manuscript. Water frog samples were kindly provided by Cigdem Akin, Martina Arioli, Can C. Bilgin, Gaston-Denis Guex, Hansjürg Hotz, Christian Jakob, Spartak N. Litvinchuk, and Thomas Uzzell. We are grateful to anonymous reviewers for constructive criticisms.

Literature

- Akın Ç, Bilgin M, Bilgin CC (2010) Discordance between ventral colour and mtDNA haplotype in the water frog *Rana (ridibunda) caralitana*, 1988 Arkan. *Amphibia-Reptilia* **31**, 9-20.
- Berger L, Hotz H, Roguski H (1986) Diploid eggs of *Rana esculenta* with two *Rana ridibunda* genomes. *Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **138**, 1-13.
- Broquet T, Berset-Braendli L, Emaresi G, Fumagalli L (2007) Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics* **8**, 509-511.
- Christiansen DG (2005) A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex. *Molecular Ecology Notes* **5**, 190-193.
- Felsenstein J (1985) Confidence-limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Garner TWJ, Gautschi B, Rothlisberger S, Reyer HU (2000) A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae*. *Molecular Ecology* **9**, 2173-2175.
- Goldberg CS, Kaplan ME, Schwalbe CR (2003) From the frog's mouth: Buccal swabs for collection of DNA from amphibians. *Herpetological Review* **34**, 220-221.

- Gottschling M, Knop R, Plötner J, *et al.* (2005) A molecular phylogeny of *Scrippsiella* sensu lato (Calciodinellaceae, Dinophyta) with interpretations on morphology and distribution. *European Journal of Phycology* **40**, 207-220.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696-704.
- Günther R (1990) Die Wasserfrösche Europas. *Die Neue Brehm-Bücherei* 600, A. Ziemsen, Wittenberg-Lutherstadt.
- Günther R, Uzzell T, Berger L (1979) Inheritance patterns in triploid *Rana esculenta* (Amphibia, Salienta). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin* **55**, 35-57.
- Hall T, A., (1999) BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**, 160-174.
- Holsbeek G, Maes GE, De Meester L, Volckaert FAM (2009a) Conservation of the introgressed European water frog complex using molecular tools. *Molecular Ecology* **18**, 1071-1087.
- Holsbeek G, Mergeay J, Hotz H, *et al.* (2008) A cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex: Consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation. *Molecular Ecology* **17**, 5023-5035.
- Holsbeek G, Mergeay J, Volckaert FAM, De Meester L (2009b) Genetic detection of multiple exotic water frog species in Belgium illustrates the need for monitoring and immediate action. *Biological Invasions*, 1-5.
- Hotz H (1983) Genetic diversity among water frog genomes inherited with and without recombination. *Universität Zurich, Zurich*.
- Hotz H, Semlitsch RD (2000) Differential performance among LDH-B genotypes in *Rana lessonae* tadpoles. *Evolution* **54**, 1750-1759.
- Hotz H, Uzzell T, Guex G-D, Alpers D, Semlitsch R, D., (2001) Microsatellites: a tool for evolutionary genetic studies of western Palearctic water frogs. *Mitt. Mus. Nat. kd. Berl., Zolll Reihe* **77**, 43-50.
- Joseph N, Krauskopf E, Vera MI, Michot B (1999) Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Research* **27**, 4533-4540.
- Lodé T, Pagano A (2000) Variations in call and morphology in male water frogs: taxonomic and evolutionary implications. *Life Sciences* **323**, 995-1001.
- Malécot V, Macquaire-Le Pocreau N, Auvray G, Kapusta V (2009) Polymorphic ITS as a tool to identify hybrids and their parents in cultivated genisteae (fabaceae). In: *Acta Horticulturae*, pp. 91-96.
- Mezhzherin SV, Morozov-Leonov S, Y., (1997) Gene introgression in hybrid populations of green frogs of *Rana esculenta* L., 1758 complex (Amphibia, Ranidae) from the Dnepr Basin. *Genetika* **3**, 358-364.
- Miller HC (2006) Cloacal and buccal swabs are a reliable source of DNA for microsatellite genotyping of reptiles. *Conservation Genetics* **7**, 1001-1003.
- Nikoloudakis N, Skaracis G, Katsiotis A (2008) Evolutionary insights inferred by molecular analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 and IGS *Avena* sp. sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**, 102-115.
- Ohst T (2008) Genetische Einflüsse allochthoner Wasserfrösche auf endemische Wasserfroschpopulationen (*R. kl. esculenta* Komplex). *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin*, 127p.
- Pagano A, Crochet PA, Graf JD, Joly P, Lode T (2001a) Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Global Ecology and Biogeography* **10**, 433-441.
- Pagano A, Dubois A, Lesbarrères D, Lodé T (2003) Frog alien species: A way for genetic invasion? *Comptes Rendus - Biologies* **326**, 85-92.
- Pagano A, Joly P (1999) Limits of the morphometric method for field identification of water frogs. *Alytes* **16**, 130-138.
- Pagano A, Lode T, Crochet PA (2001b) New contact zone and assemblages among water frogs of Southern France. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **39**, 63-67.
- Pagano A, Schmeller D, S., (1999) Is recombination less negligible than previously described in hybridogenetic water frogs? In: *Miaud C, Guyétant R (eds) 9th O.G.Meeting - Current studies in Herpetology, Le Bourget du lac, Chambéry, France*, 351-356.
- Pidancier N, Miquel C, Miaud C (2003) Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetological Journal* **13**, 175-178.
- Plötner J (1998) Genetic diversity in mitochondrial 12S rDNA of western Palearctic water frog (*Anura*, *Ranidae*) and implication of their systematics. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **36**, 191-201.
- Plötner J (2005) Die westpaläarktischen Wasserfrösche. *Von Märtyren der Wissenschaft zur biologischen sensation. Laurenti Verlag, Bielefeld, 160 Seiten*.

- Plötner J, Köhler F, Uzzell T, Beerli P (2007) Molecular systematics of amphibians. *Heatwole, Amphibian Biology. Band 7: Phylogeny and Systematics, Surrey Beatty & Sons*.
- Plötner J, Köhler F, Uzzell T, *et al.* (2009) Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5' truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **53**, 784-791.
- Plötner J, Ohst T (2001) New hypotheses on the systematics of the western Palearctic water frog complex (Anura, Ranidae) *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin. Zoologische Reihe* **77**, 5 – 21.
- Plötner J, Ohst T, Bohme W, Schreiber R (2001) Divergence in mitochondrial DNA of near Eastern water frogs with special reference to the systematic status of cypricote and Anatolian populations (Anura, Ranidae). *Amphibia Reptilia* **22**, 397-412.
- Plötner J, Uzzell T, Beerli P, *et al.* (2008) Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: A case in western Palearctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 668-681.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Poschadel JR, Möller D (2004) A versatile field method for tissue sampling on small reptiles and amphibians, applied to pond turtles, newts, frogs and toads. *Conservation Genetics* **5**, 865-867.
- Van Doninck K, Schön I, De Bruyn L, Martens K (2002) A general purpose genotype in an ancient asexual. *Oecologia* **132**, 205-212.
- Vorburger C (2001) Genomic imprinting or mutation and interclonal selection in triploid hybrid frogs? A comment on Tunner. *Amphibia-Reptilia* **22**, 263-265.
- Vorburger C, Reyer HU (2003) A genetic mechanism of species replacement in European waterfrogs? *Conservation Genetics* **4**, 141-155.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**, 506-513.
- Zeisset I, Beebe T, J., C., (2000) Primer notes: Polymerase chain reaction pprimers for microsatellite loci in the north european water frogs *Rana ridibunda* and *Rana lessonae*. *Molecular Ecology* **9**, 1173.

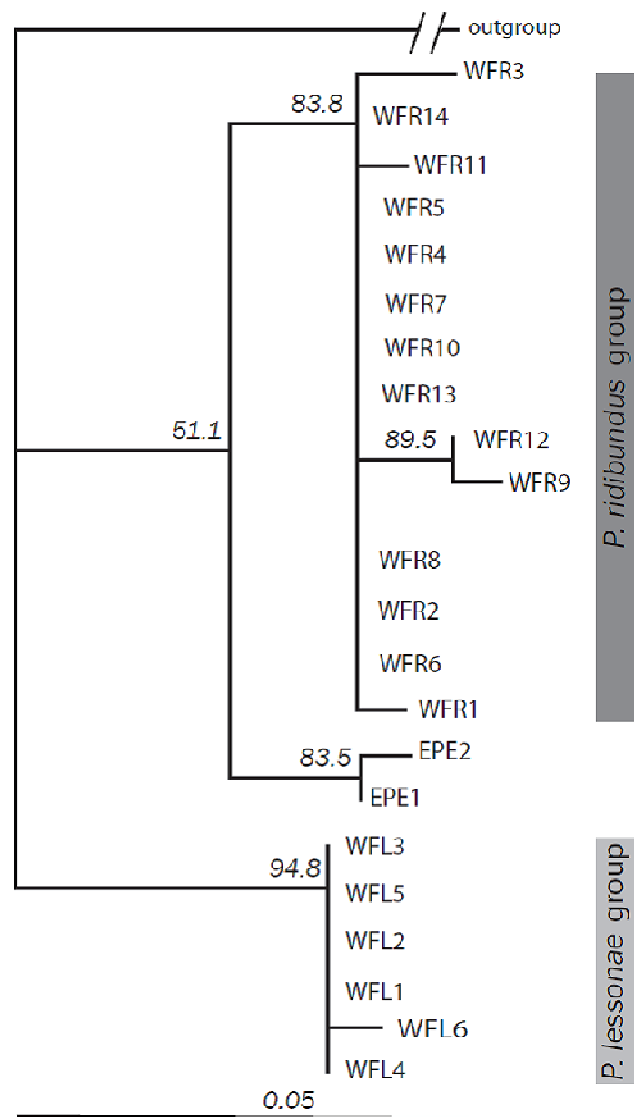
Figure Captions

Figure 1:

Phylogenetic tree of *Pelophylax* species based on the ribosomal internal transcribed spacer 2 . Maximum-likelihood analysis was conducted using the best nucleotide substitution model (HKY) selected by Modeltest. Bootstrap values (1000 iterations) are indicated for the main nodes. Two monophyletic clades specific for *P. lessonae* group and *P. ridibundus* group are designated by grey boxes. The outgroup corresponds to *P. nigromaculatus*. Abbreviations corresponding to species names are listed in the Table 1.

Figure 2:

Digestion patterns of ITS2 segments specific for *P. lessonae*, *P. esculentus*, and *P. ridibundus*. *HaeII* and *SmaI* cut ITS2 segments of *P. lessonae* while *KpnI* cuts ITS2 segments of *P. ridibundus*. Lanes 1, 4, and 10: *P. lessonae*; Lanes 2, 5, and 11: *P. esculentus*; Lanes 3, 6, and 12: *P. ridibundus*. Lanes 7, 8, and 9: *P. lessonae*, *P. esculentus*, and *P. ridibundus*, undigested ITS2 segments. Lane 13: no DNA (negative control). The scale is indicated by “pb”, which is the 100 bp DNA Step Ladder (Promega).

**Figure 1**

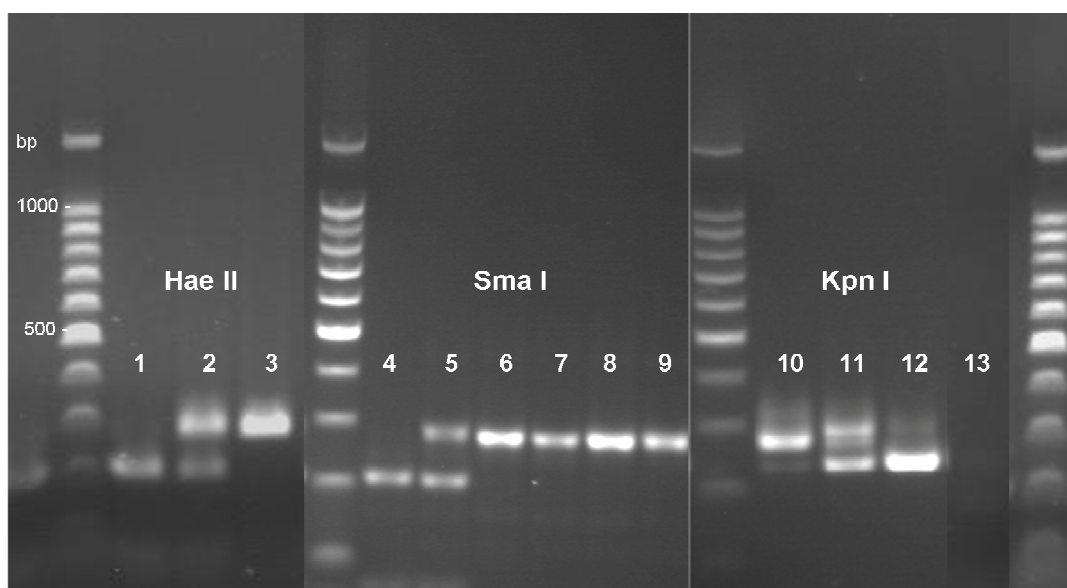
**Figure 2**

Table 1: ITS2-alleles specific for water frogs of the *P. lessonae* and *P. ridibundus* group with corresponding accession numbers (GenBank), origin (locality, coordinates), and number (N) of individuals studied.

Taxon/Group	Allele	Accession No	Origin				
			Country	Locality	Latitude	Longitude	N
<i>P. lessonae/P. bergeri</i>	WFL1	HM445714	Germany	Niemegk	52.08 N	12.70 E	1
			Germany	Wernitz	52.57N	12.92 E	1
			France	Ramière	44.77 N	4.85 E	1
			Italy	Carbonara	45.93 N	11.22 E	2
			Sweden	Uppland	60.60 N	17.62 E	1
			Ukraine	Chernigov	51.03 N	31.88 E	1
	WFL2	HM445715	Estonia	Tartu	58.37 N	26.72 E	1
			France	Chautagnes	46.05 N	5.88 E	1
			Germany	Flüren	51.67 N	6.52 E	2
			Russia	Smolensk	55.60 N	33.30 E	1
			Sweden	Skåne	55.37 N	13.10 E	1
			Switzerland	Bremgarten	47.90 N	7.58 E	5
			Ukraine	Kharkov	49.47 N	36.87 E	1
	WFL3	HM445716	Germany	Ettenheim	48.27 N	7.87 E	2
			Switzerland	Bremgarten	47.90 N	7.58 E	2
	WFL4	HM445717	Romania	Donau-Delta	45.03 N	29.17 E	1
			Romania	Caraorman	45.08 N	29.40 E	1
	WFL5	HM445718	Switzerland	Dätwil-Garden	47.60 N	8.70 E	1
WFL6	HM445719	Italy	Pianadi	37.67 N	15.00 E	3	
<i>P. ridibundus</i> group	WFR1	HM445720	Germany	Niemegk	52.08 N	12.70 E	9
			Germany	Pünderich	50.04 N	7.14 E	2
			France	Chautagnes	46.05 N	5.88 E	1
			Russia	Moskau	54.98 N	39.07 E	1
			Switzerland	Creux de Terre	46.72 N	6.57 E	2
	WFR2	HM445721	Germany	Niemegk	52.08 N	12.70 E	2
			France	Chautagnes	46.05 N	5.88 E	6
			Romania	Donau-Delta	45.03 N	29.17 E	2
			Russia	Moskau	54.98 N	39.07 E	1
			Switzerland	Bremgarten	47.90 N	7.58 E	1
			Switzerland	Arnex	46.70 N	6.52 E	2
			Turkey	Edirne	41.78 N	26.82 E	1
			Ukraine	Chernobyl	51.27 N	30.23 E	1
			WFR3	HM445722	Switzerland	Creux de Terre	46.72 N
	Turkey	Edirne			41.78 N	26.82 E	1
	WFR4	HM445723	Turkey	Akcapinar	37.20 N	32.20 E	2
			Turkey	Burdur Lake	37.72 N	30.10 E	2
			Turkey	Aksehir Lake	38.47 N	31.42 E	1
	WFR5	HM445724	Turkey	Mugla	36.85 N	28.23 E	2
			Turkey	Antalya	36.20 N	29.63 E	2
	WFR6	HM445725	Russia	Ryazan	54.73 N	39.52 E	2
	WFR7	HM445726	Kazakhstan	Aktobe	50.28 N	57.22 E	1
	WFR8	HM445727	Syria	Abu Kamal	34.43 N	40.93 E	1
	WFR9	HM445728	Greece	Kalanistra	38.07 N	21.87 E	1
			Greece	Lechena	37.93 N	21.27 E	1
	WFR10	HM445729	Kazakhstan	Atyrau	47.10 N	51.92 E	3
	WFR11	HM445730	Greece	Olympos	35.58 N	27.13 E	2
			Greece	Archipolis	36.25 N	28.03 E	1
	WFR12	HM445731	Greece	Mistros	38.52 N	23.85 E	1
	WFR13	HM445732	France	Chautagnes	46.05 N	5.88 E	2
WFR14	HM445733	Turkey	Antalya	36.98 N	30.56 E	1	
		Turkey	Antalya	36.96 N	30.51 E	1	
<i>P. epeiroticus</i>	EPE1	HM445712	Greece	Nea Manolada	37.7 N	21.4 E	1
	EPE2	HM445713	Greece	Igoumitsa	39.5 N	20.27 E	1

Résumé :

Les organismes asexués constituent un cas particulier en écologie évolutive spécialement intéressant pour étudier les processus d'adaptation. La reproduction sexuée est avantageuse puisqu'elle maintient un polymorphisme et une diversité génétique importants, mais elle l'est moins si on prend en compte ses coûts. La persistance de plusieurs lignées hybrides asexués au sein de taxa indépendants, parfois anciennes, amène à s'interroger sur ce mode de reproduction : avantages, risques d'extinction des complexes d'hybridation. Nous avons étudié le cas des grenouilles vertes européennes présentes en France, où l'on retrouve le complexe *P. esculentus*, très commun, ainsi que le complexe *P. grafi*, localisé dans le Sud du pays. Ces lignées hybrides sont particulières car elles ont un mode de reproduction unisexué appelé hybridogénèse.

Les différents taxa de grenouilles vertes se ressemblent tant que leur distinction est difficile, et nécessite des analyses génétiques. Ainsi, une nouvelle méthode PCR-RFLP basée sur la région ITS2 a été mise au point, permettant une affiliation fiable des taxa du complexe *P. esculentus*. Puis, les marqueurs microsatellites ont été testés comme outils d'identification taxonomique, sans succès, à cause d'un manque de spécificité, ainsi qu'à la situation complexe des peuplements français.

Le fardeau génétique porté par les génomes clonaux *ridibundus* a été évalué lors d'un élevage expérimental, où des têtards de *P. rididundus* possédant soit 50% de leur génome clonal ou 0% n'ont montré aucune différence de performances larvaires. Dans cette même expérimentation, la fitness de l'hybride *P. kl. grafi* a été comparée à ces deux espèces parentales. Les hybrides ont montré des performances intermédiaires, meilleures que *P. perezi*, mais inférieures à *P. ridibundus*.

Lors de l'étude de l'utilisation de l'habitat, nous avons pu mettre en évidence une répartition différentielle des grenouilles vertes du complexe *P. esculentus* en fonction du type d'habitat, et observer de nouveaux facteurs influençant leur abondance tels l'altitude, la distance à la rivière, le taux de nitrates, l'alcalinité, les duretés. Nous avons observé la relation entre le type d'habitat et la capacité d'acclimatation chez les hybrides *P. esculentus* au stade larvaire, et les performances révèlent que les têtards forestiers semblent généralistes en s'accommodant du changement de milieu, tandis que ceux originaires de prairie semblent localement adaptés à leur milieu.

Ces résultats nous amènent à discuter du devenir évolutif des grenouilles vertes et à proposer des perspectives, afin d'affiner nos connaissances de ces complexes et d'aider à la prise de décision quant aux habitats à prioriser en termes de gestion conservatoire.

Mots clés : Amphibiens, hybridogénèse, complexe *P. esculentus*, complexe *P. grafi*, génétique, adaptation, écologie évolutive, conservation, utilisation de l'habitat.

Abstrat :

Asexual organisms are a special case in evolutionary ecology interesting to study adaptation. Sexual reproduction is advantageous since it maintains an important polymorphism and genetic diversity, but it is less taking into account its costs. The persistence of many hybrid asexual lineages among independent taxa, some old, raise questions about this reproductive mode: benefits, extinction risks of hybridization complexes. We have studied the case of the European water frogs present in France, where we find the complex *P. esculentus*, very common, and the complex *P. graf*, located in the south. These hybrid lineages are special because having a unisexual mode of reproduction called hybridogenesis.

These different taxa of water frogs are so alike that their distinction is difficult and requires genetic analysis. Thus, a new PCR-RFLP based on ITS2 has been developed, allowing reliable taxonomic affiliation of the complex *P. esculentus*. Then, the microsatellite markers were tested as tools for taxonomic identification, without success, due to a lack of specificity, and the complex situation of French frog assemblages.

The genetic load carried by clonal genomes was evaluated in an experimental breeding, where tadpoles of *P. rididundus* bearing either 50% clonal genome or 0% showed no differences in larval performances. Regarding hybrid fitness of *P.kl. grafi* tadpoles compared to that of parental species, hybrids showed intermediate performance, better than *P. perezi*, but worse than *P. ridibundus*.

In the habitat use study, we were able to evidence a differential distribution of water frogs of *P. esculentus* complex according to habitat type, and observe new factors influencing their abundance as altitude, distance to the river, the nitrate level, alkalinity, hardness. We observed the relationship between habitat type and acclimation abilities in *P. esculentus* hybrids at larval stage, and performances show that forest tadpoles seem to be generalists and bear environmental modifications, while those from meadows appear locally adapted to their environment.

These results bring us to discuss the future evolution of water frogs and offer opportunities, to refine our knowledge of these complexes and assist in making decisions regarding habitat to prioritize in terms of conservation management.

Key words: Amphibians, hybridogenesis, *P. esculentus* complex, *P. grafi* complex, genetic analysis, adaptation, evolutionary ecology, conservation, habitat use.