

**Bioacoustique de la batrachofaune guadeloupéenne:
inventorisation, communication et effets des espèces invasives.**

rapport final

Etude effectuée par :

Thierry AUBIN (DR CNRS, Université Paris-Sud)

Renaud BOISTEL (IR CNRS, Université de Poitiers)

Gheylen DAGHFOUS (Post-Doc, Université de Montréal)

Nicolas Pollet (CR CNRS, Université d'Evry, Génopole)

Anthony Herrel (CR CNRS, MNHN, Paris)

Michel Breuil (MNHN, Paris)



Bioacoustique de la batrachofaune guadeloupéenne: inventorisat

ion, communication et effets des espèces invasives.

Rapport final



Résumé.

Cette recherche a pour but d'étudier la biodiversité des Hylodes du Parc National de la Guadeloupe par l'analyse de l'évolution du système de communication acoustique des espèces endémiques et «allopatriques» et par l'analyse de la variation spécifique au travers d'un échantillonnage morphologique et génétique. Les chants de trois des espèces du Parc National de Guadeloupe, *E. pinchoni*, *E. johnstonei*, et *E. martinicensis*, ont été enregistrés et analysés. Des enregistreurs automatiques positionnés dans différents milieux ont permis de suivre l'évolution journalière et annuelle de l'activité vocale de ces espèces et serviront dans le futur à établir des indices d'abondance de ces espèces en fonction des saisons et des années. Parallèlement, des expériences de propagation de signaux ont permis de définir d'une part la portée de la transmission d'information de ces chants dans différents milieux et d'autre part de définir la portée de la zone active d'enregistrement des enregistreurs automatiques. De nombreuses expériences de diffusion des chants émis par différentes populations (forêt et savane en particulier) ont permis, au niveau des trois espèces, d'étudier comment s'effectuait le décodage de l'information véhiculée par le chant, décodage qui participe à la sélection sexuelle et donc à la spéciation. Enfin, des prélèvements génétiques et des mesures morphométriques ont été réalisés sur les différentes espèces et au niveau des différentes populations, ceci afin de comprendre la biologie de ces taxons problématiques.

Contexte

Les amphibiens sont un groupe de vertébrés très menacé, principalement en raison d'une combinaison de deux facteurs : la destruction de l'habitat et l'action d'agents pathogènes. Ils peuvent être considérés comme des indicateurs d'une sixième extinction de masse induite par l'activité humaine sur Terre (Wake et Vredenburg 2008). Le « Global Amphibian Assessment » (GAA) (Stuart *et al.* 2004) a examiné à l'échelle mondiale les amphibiens selon les critères de l'UICN (Union Mondiale pour la Nature, 2001) et a identifié 427 espèces (soit 7,4% des espèces mondiales d'amphibiens) comme étant au bord de l'extinction, et environ 150 espèces considérées comme éteintes. Étant donné le nombre d'espèces d'amphibiens tropicaux, il existe peu de données sur la densité des populations et les tendances démographiques actuelles. Les variables les plus importantes utilisées pour évaluer l'état de la menace d'une espèce ont été la taille de sa zone géographique et ses conditions d'habitat, combinées avec le taux de la perte d'habitat dans son aire de répartition (Stuart *et al.* 2004). Pour une évaluation fiable des menaces, il est donc crucial que la biologie et l'aire de répartition des espèces soient bien connues. C'est principalement en raison de l'absence de ces connaissances que la GAA a répertorié 1294 espèces (22,5%) pour lesquelles les données s'avèrent insuffisantes. La connaissance de la diversité de ces espèces en déclin devient cruciale car ces espèces d'amphibiens ne peuvent être intégrées à des programmes de conservation de la nature qu'une fois décrites (Andreone *et al.* 2008; Fouquet *et al.* 2007; Myers *et al.* 2000; Stuart *et al.* 2004).

L'avancée des techniques moléculaires a changé la façon dont nous accédons à la diversité biologique des amphibiens (Fouquet *et al.* 2007 ; Meegaskumbura *et al.*, 2002; Vieites *et al.* 2009). L'exploration accrue des régions tropicales, l'utilisation accrue de séquences d'ADN comme caractère taxonomique, et la combinaison des approches de bioacoustique, d'anatomie et de morphologie ont amélioré la délimitation des espèces et stimulé la description d'espèces (James, 1999 ; Köhler *et al.* 2005). Si les espèces sont considérées comme l'évolution de métapopulations séparées, toute délimitation des espèces fondée sur l'application aveugle d'une seule source de données peut être trompeuse. Les espèces peuvent se différencier à différents moments du processus de spéciation (de Queiroz 1998, 2007). La taxonomie

intégrative s'appuie sur une approche pluridisciplinaire. La fiabilité de la délimitation de lignées évolutives augmente en combinant des informations indépendantes (Dayrat 2005; Padial *et al.* 2010).

Les grenouilles à développement direct (comme les *Eleutherodactylus*) du clade Terrarana (Hegdes *et al.* 2008) se caractérisent par une grande diversité d'espèces, une stase morphologique remarquable parmi beaucoup d'espèces étroitement liées, et une convergence morphologique entre les principaux sous-clades. Au niveau intraspécifique, plusieurs études ont montré une divergence génétique profonde entre lignées mitochondriales difficiles à identifier par la morphologie (Crawford, 2003; Crawford and Smith 2005; Elmer *et al.* 2007; Padial et De la Riva 2009; Rodriguez *et al.* 2010 ; Streicher *et al.* 2009; Velo-Anton *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008). Les espèces cibles de la présente étude sont *E. barlagnei*, *E. pinchoni*, *E. martinicensis* et *E. johnstonei*. Ces grenouilles, de taille moyenne à petite, occupent une large plage d'habitats qui sont très localisés géographiquement (Kaiser *et al.*, 2003 et 2004). Ces taxons sont censés présenter une grande variation tout au long de la chaîne de montagne de la Basse Terre, couverte de forêts et de savanes. *E. martinicensis* et *E. johnstonei* sont considérées comme les espèces les plus répandues des Eleutherodactylidae dans l'archipel de la Guadeloupe (Hegdes *et al.* 2008, Breuil, 2002). En raison de la présence d'une importante zone protégée que constitue le Parc National de Guadeloupe, ces espèces sont classées comme suit (selon la Liste rouge de l'UICN): espèces en danger (EN) pour *E. barlagnei* et *E. pinchoni* (les deux espèces endémiques), espèce menacée (NT) pour *E. martinicensis*, espèce peu préoccupante (LC) pour *E. johnstonei*.

Toutefois, les données préliminaires ont indiqué une situation taxonomique déroutante pour ces espèces. Selon Breuil (2002), il existe un niveau élevé de variations phénotypiques, en particulier en ce qui concerne la coloration et la taille. Une étude ultérieure menée sur les vocalisations a montré également des différences dans les vocalisations d'appels sexuels en fonction de l'altitude chez *E. coqui* (voir Meenderink *et al.*, 2009). Il a également été montré l'existence de variations de cris d'appel au sein de deux populations d'*E. pinchoni* (voir Fig. 2 Kaiser *et al.*, 2003, Breuil, 2002), ce qui suggère un complexe d'espèces encore non résolu. Ainsi, les Hylodes de la Guadeloupe sont actuellement considérées comme des espèces répandues présentant une diversité morphologique et bioacoustique remarquable. Leurs distributions actuelles vont de la forêt ombrophile et héliophile, à la mangrove et la savane, et même jusqu'à des habitats anthropisés pour *E. martinicensis* et *E. johnstonei* (Breuil, 2002).

Comprendre la biologie de ces taxons problématiques nécessite une approche pluridisciplinaire et un suivi des populations. Parmi elles, les marqueurs moléculaires de la lignée, c'est à dire des séquences d'ADN mitochondrial (ADNmt), devraient apporter de précieuses informations. Par la suite devrait être étudiée la congruence des lignées d'ADNmt avec les informations géographique, morphologique et bioacoustique (Padial *et al.* 2010). En particulier, l'utilisation de données bioacoustiques paraît essentielle pour soutenir les hypothèses d'espèces chez les anoues, puisque la sélection sexuelle peut conduire à une divergence rapide des appels sexuels et générer ainsi des barrières reproductives prézygotiques (examinées dans Vences et Wake, 2007). Ici, nous suivons cette approche consistant à combiner des preuves éthologiques, bioacoustiques, génétiques et morphologiques en travaillant sur des échantillons de *E. barlagnei*, *E. pinchoni*, *E. martinicensis* et *E. johnstonei*, couvrant une grande partie de la distribution de ces espèces au sein du Parc national de Guadeloupe. Nous espérons que cette étude (barrières reproductives prézygotiques, bioacoustique, activité vocale, génétique) sur les Hylodes et que le fait de disposer d'un outil d'évaluation de l'état de santé des populations, généralisable à d'autres espèces de grenouilles, aura un impact sur l'histoire naturelle et la conservation de ces grenouilles à développement direct.

La communication acoustique a favorisé, par sa plasticité et son rôle clé dans les mécanismes d'isolement pré-reproducteur, la diversification des formes d'anoues dans divers habitats (Mayr, 1948). Selon Endler (1993). Toute étude d'un système de communication doit considérer les facteurs qui affectent la qualité et l'évolution des informations produites et reçues. Ces facteurs sont des contraintes intrinsèques et extrinsèques ainsi que des forces sélectives (Otte, 1974 ; Ryan, 1990 ; Endler, 1992). Il est donc essentiel d'obtenir des informations sur toutes les étapes de la chaîne de transmission de l'information, à savoir production, propagation et réception des signaux (Shannon et Weaver 1949).

Objectifs

Nous avons proposé d'étudier la biodiversité des Hylodes du Parc de la Guadeloupe par l'analyse de l'évolution du système de communication acoustique des espèces endémiques et

«allopatriques», et par l'analyse de la variation spécifique au travers d'un échantillonnage génétique. Il a nous a semblé nécessaire d'aborder l'ensemble des éléments du processus de communication afin d'établir un « état de santé » des populations de ces espèces insulaires. Ce travail a été principalement fondé sur une approche intégrative comme le suggère le travail de Padial *et al.* (2010). En effet, il est plus efficace de fonder la première approche d'identification sur la signature bioacoustique des spécimens, puis de tenter une approche moléculaire se basant sur les marqueurs utilisés chez les amphibiens et disponibles dans les banques de séquences nucléotidiques.

Etapes de l'étude

1) Etude des variations inter et intra-spécifiques des émissions vocales

Cette étude qui permet de faire ressortir l'étendue de la variation spécifique des émissions vocales sera par la suite confrontée aux données moléculaires et morphologiques (taille et patron de coloration) des différentes populations du Parc National de la Guadeloupe.

Nous avons donc réalisé des études :

- Acoustiques
- Morphologiques
- Génétiques

2) Caractérisation de l'environnement

Nous avons relevé différents problèmes auxquels les hylodes doivent faire face : 1) un niveau élevé de bruit ambiant, 2) un milieu absorbant, 3) une densité élevée des animaux, et 4) une compétition inter-spécifique. Il est donc important de caractériser l'environnement sonore pour comprendre comment les hylodes arrivent à reconnaître leurs congénères dans des conditions naturelles où le niveau de bruit ambiant est élevé. Pour répondre à cette question, nous avons effectué :

- Des mesures de l'intensité du bruit ambiant
- Une analyse du contenu temporel et spectral du bruit ambiant
- Des expériences de propagation des signaux d'hylodes à différentes distances, à différentes hauteurs et dans différents milieux.

3) Etude de la reconnaissance spécifique

Le décodage de l'information permet de questionner l'espèce sur les paramètres clés nécessaires et suffisants pour une reconnaissance spécifique aussi bien chez les femelles que les mâles (interactions). Ces paramètres hautement discriminatoires de sélection sexuelle sont le fruit de la sélection naturelle. Ce sont les seuls caractères dont nous pouvons démontrer l'utilisation par les espèces pour se discriminer entre elles. En effet, ils peuvent faire l'objet d'analyses précises et être testés par des expériences de « play-back » avec des leurres acoustiques.

4) Suivi des populations

Nous proposons qu'une partie de la diversité puisse être estimée et comparée par une analyse rapide bioacoustique du signal produit par les communautés animales. Pour ce faire, nous avons utilisé des enregistreurs autonomes capables d'enregistrer de façon automatique les sons suivant une périodicité temporelle programmée.

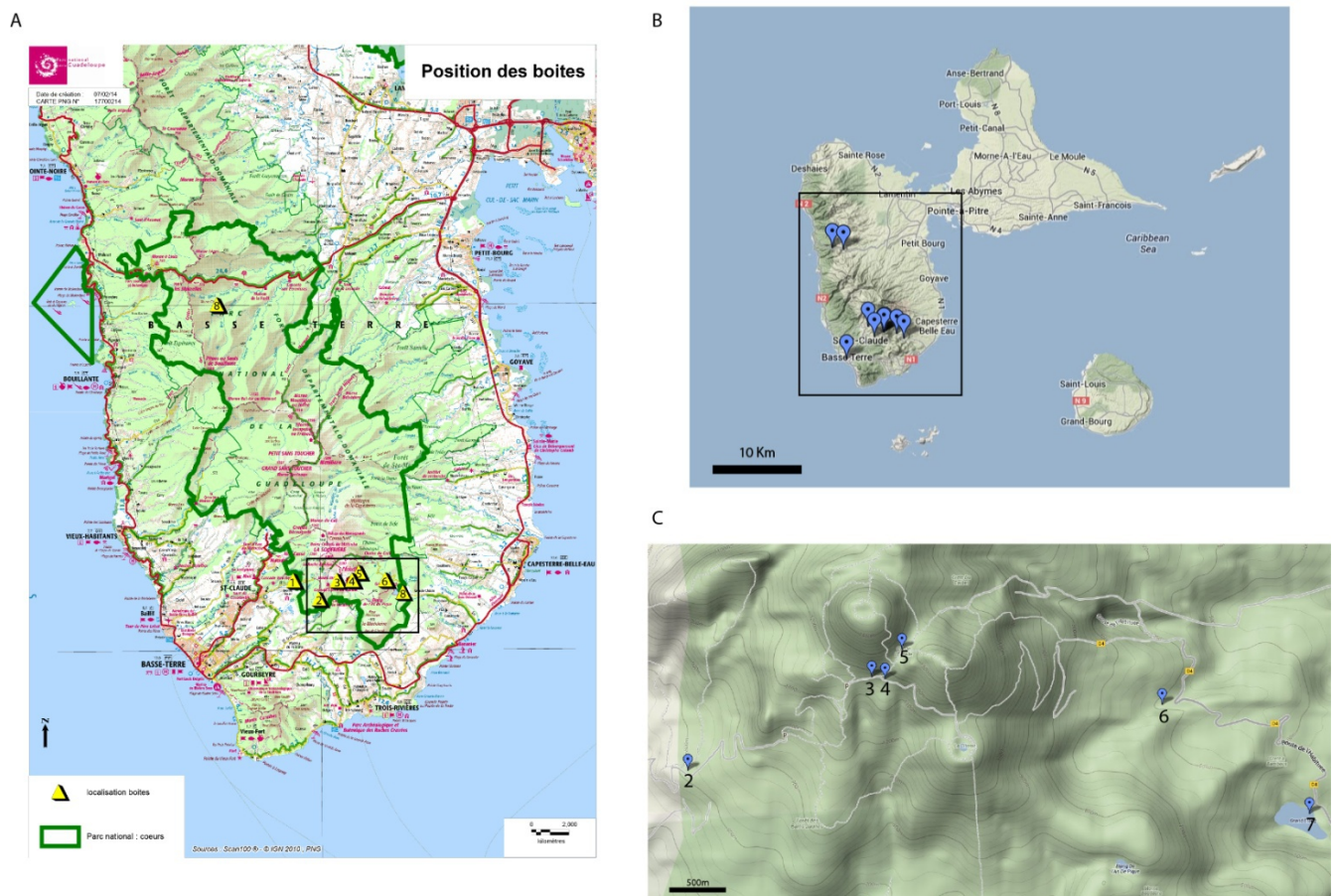


Figure 1. Cartes figurant les sites d'études où ont été disposés les enregistreurs autonomes.

- 1) forêt de Matouba ;
- 2) forêt des Bains Jaunes ;
- 3) savane à Mulet, au pied de la Soufrière ;
- 4) ravine Matylis, au pied du Morne Mitan ;
- 5) ravine Matylis, près de la Roche Fendue ;
- 6) rivière Grosse Corde ;
- 7) Grand Etang et
- 8) Les deux Mamelles.

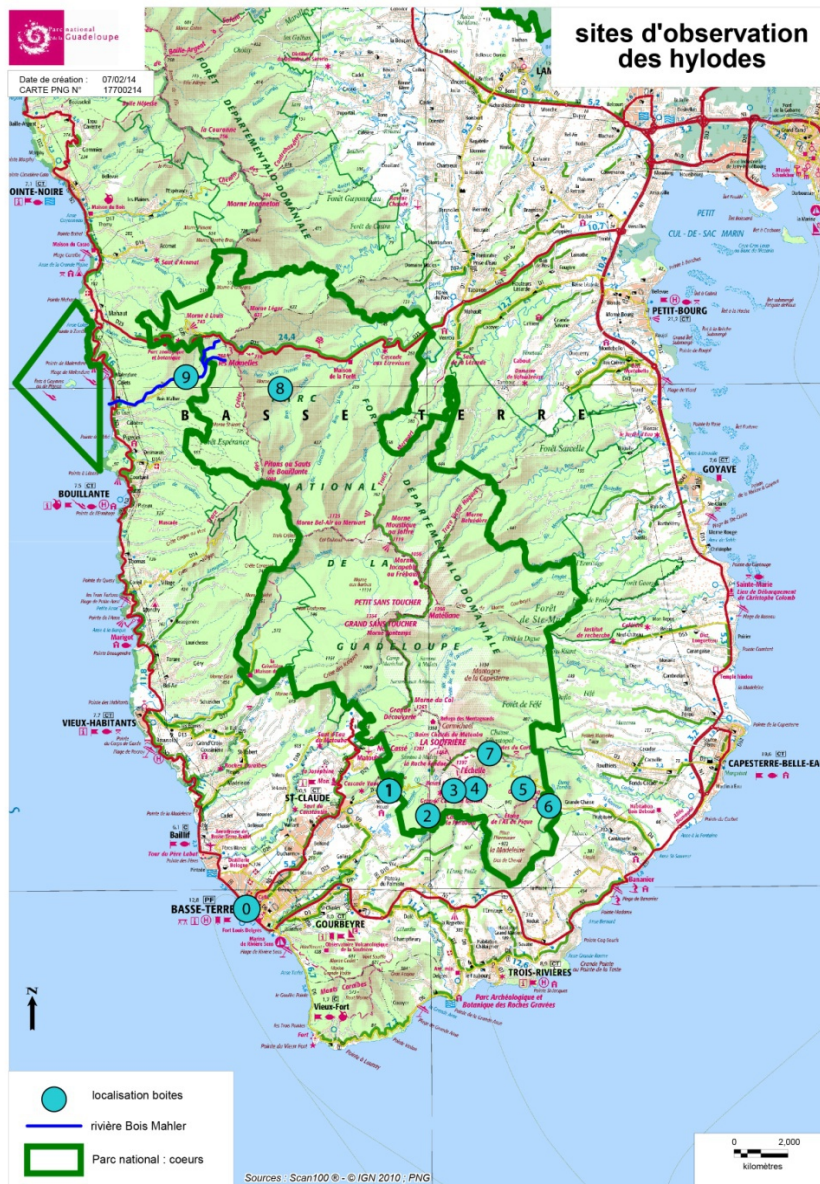


Figure 2. Carte figurant les sites d'études où a été enregistré et/ou testé le comportement des animaux. 0) Ville de Basse Terre (référence base altitude) 1) en Forêt de Matouba, 2) en forêt des Bains Jaunes 3) dans la savane à Mulet au pied de la Soufrière. 4) Ravine Matylis au pied et près de la Roche Fendue. 5) Entrée des Chutes du Carbet. 6). Grand Etang. 7) Chutes du Carbet. 8) Les deux Mamelles. 9) Rivière Bois Malher.

Mission au cœur du Parc

Nos missions se sont focalisées sur la Basse-Terre. Les sites d'études sont localisés sur la carte des figures 1 et 2. Nous avons étudié trois espèces au cours de cette période. : *E. pinchoni*, *E. martinicensis* et *E. johnstonei* (figure 3). Au cours de ces missions, nous n'avons pas pu observer *Eleutherodactylus barlagnei*. Dix sites représentatifs ont été sélectionnés (Fig. 1 et 2). Les enregistrements des chants ont été réalisés sur la totalité de ces sites. Un suivi de l'activité vocale a pu être réalisé dans huit sites différents. Sur cet ensemble, quatre

ont été étudiés au cours des trois missions (en mai, septembre et Janvier): Matouba (720 m alt., localité type *E. barlagnei*), Forêt des Bains Jaunes (entre 800 et 950 m alt., populations forestières de *E. pinchoni*, *E. martinicensis* et *E. johnstonei*) et la savane à mulet au pied de la Soufrière (à deux altitudes – 1100 et 1300 m- présentant une végétation différente, populations de savane de *E. pinchoni* et *E. martinicensis*). Par ailleurs, nous avons également commencé des relevés à Grand-Étang, aux Deux Mamelles ainsi que hors du Parc National à Basse Terre. Lors d'observations dans la ville de Basse Terre (à 80 m d'altitude), nous avons pu identifier également l'espèce *Scinax x-signata*.



Figure 3. Photographie du comportement vocal de trois espèces d'hyloides : *E. martinicensis* (en haut à gauche), *E. johnstonei* (en bas à gauche) et *E. pinchoni* (en haut à droite, forêt des Bains Jaunes ; en bas à droite, savane à Mulet - Soufrière).

Confrontation des observations effectuées antérieurement (dans les années 2000) avec les observations actuelles.

Les populations *E. pinchoni* forestières de basse altitude et celles de la savane à Mulet proches du sommet du volcan de la Soufrière montrent un chant distinct (Breuil, 2002). Au cours d'observations préliminaires en 2000, nous avons constaté que les populations forestières chantaient préférentiellement au crépuscule (pendant un très court laps de temps du nyctémère) tandis que les populations de la savane, où *E. martinicensis* est minoritaire, chantaient de manière très sporadique et isolée. Nos récentes missions nous ont permis de constater que certaines des observations précédentes peuvent être affirmées et d'autres infirmées. En effet, après une première analyse, nous observons bien des différences acoustiques et morphologiques entre les populations de forêt et de savane chez non seulement *E. pinchoni* mais aussi chez *E. martinicensis*. De plus, ces dernières espèces semblent plus

abondantes que lors de nos observations initiales au sommet de la Soufrière. Les heures de début d'activité des différents taxons semblent plus variables que lors de nos observations de 2000. Ceci est peut-être lié à des différences d'ordre climatique (notamment l'humidité) entre ces deux périodes. Concernant, *E. johnstonei*, elle apparaît plus fréquente en lisière (aire de repos de Beausoleil) et leur nombre diminue avec l'altitude et avec la densité du couvert forestier. Par contre, au Grand Etang, elle est très abondante.

Enregistrements et mesures morphométriques.

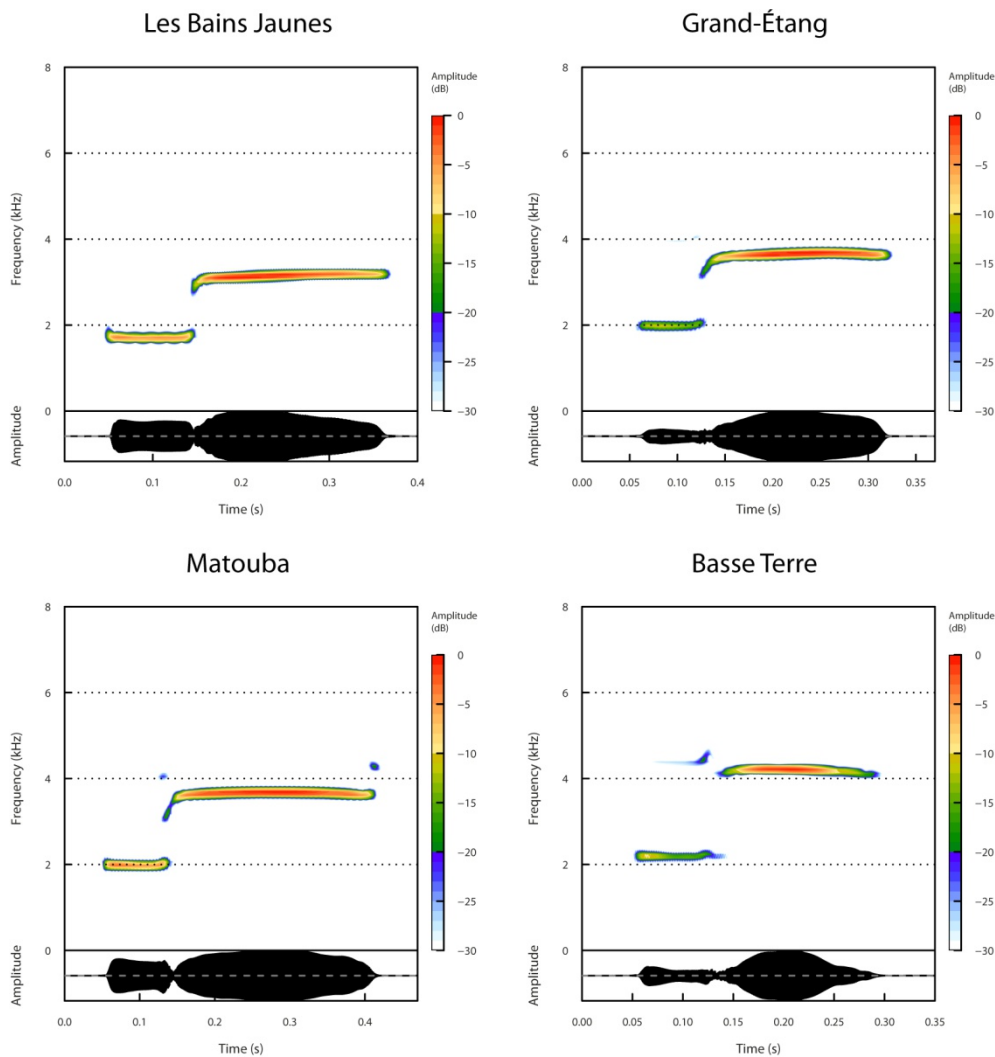


Figure 4: Illustration de la variation du chant d'*E. johnstonei* en fonction de la localité. Le sonagramme et l'oscillogramme représentent le chant enregistré dans quatre localités. On observe des variations de durée des deux notes ainsi que de la hauteur des fréquences du chant.

Le chant d'appel d'*E. johnstonei* ressemble à celui d'*E. martinicensis* par la présence de deux notes. Ces notes ont des fréquences proches voire identiques à celles d'*E. martinicensis*. Le chant se distingue d'*E. martinicensis* par l'absence de modulation fréquence (MF) et par la durée de ces notes. La première note étant bien plus courte que celle d'*E. martinicensis*. La séquence d'appel est une répétition de chants identiques et chaque appel avec une durée moyenne de 311 ± 57 ms ($N = 56$). Les silences entre les chants sont d'environ 1048 ± 332 ms ($N = 52$). Un oscillogramme ne montre pas de motif périodique de variation d'amplitude. En ce qui concerne les caractéristiques spectrales, une transformation de Fourier rapide indique que le signal est pur, avec une fréquence dominante moyenne de 2412 ± 419 Hz ($N = 56$). Le sonographe et l'analyse utilisant la transformation de Hilbert (suivi de la fréquence instantanée) indiquent une absence de modulation de fréquence (MF).

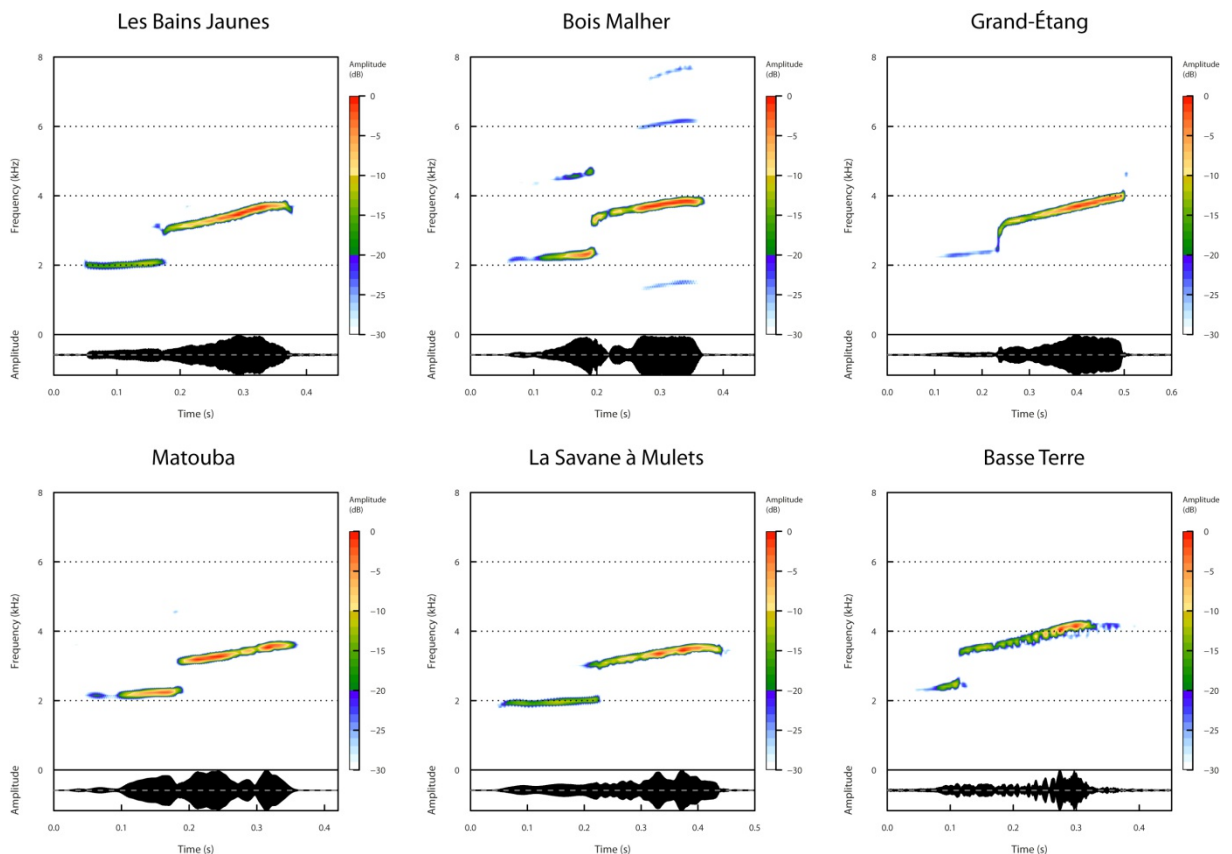


Figure 5 : Illustration de la variation du chant d'*E. martinicensis* en fonction de la localité. Le sonographe et l'oscillogramme représentent le chant enregistré dans six localités. On observe des variations de la durée des deux notes ainsi que de la hauteur des fréquences du chant et de la modulation de fréquence.

Le chant d'appel d'*E. martinicensis* ressemble à celui d'*E. johnstonei* par la présence de deux notes. Les notes qui le composent ont des fréquences proches voire identiques à celles d'*E. johnstonei*. Le chant se distingue d'*E. johnstonei* par la présence de modulations de fréquence (MF) et par la durée des notes plus longues, en particulier la première note bien

plus longue que celle d'*E. johnstonei*. La séquence d'appel est une répétition de chants identiques et chaque chant d'appel a une durée moyenne de 361 ± 47 ms (N = 111). Les silences entre les chants sont d'environ 909 ± 245 ms (N = 105). Un oscillogramme ne montre pas un motif périodique de modulation d'amplitude (MA). En ce qui concerne les caractéristiques spectrales, une transformation de Fourier rapide indique que le signal est pur, avec une fréquence dominante moyenne de 3607 ± 319 Hz (N = 112). Le sonographe et l'analyse utilisant la transformation de Hilbert indiquent une modulation de fréquence (MF) linéaire à faible pente positive pour les deux notes.

		<i>E. johnstonei</i>	<i>E. martinicensis</i>	<i>E. pinchoni</i>			<i>E. johnstonei</i>	<i>E. martinicensis</i>	<i>E. pinchoni</i>
chute du carbet	chant			166 ± 5 ms (160-173) 5	bain jaune	chant	341 ± 131 ms (322-364) 12	325 ± 9 ms (309-339) 21	171 ± 9 ms (157-191) 13
	silence			5,15 ± 2,92 s (2,66-9,351) 5		silence	0,96 ± 0,10 s (0,82-1,10) 11	0,74 ± 0,41 s (0,54-2,42) 11	4,95 ± 3,40 s (1,57-14,46) 12
	FD			529 ± 34 Hz (5201-5291) 5		FD	3112 ± 22 Hz (3056-3639) 12	3620 ± 97 Hz (3419-3730) 21	4750 ± 32 Hz (4702-4828) 13
basse terre (ville)	chant	250 ± 8 ms (235-261) 12	391 ± 26 ms (438-373) 16		grand etang	chant	276 ± 14 ms (249-298) 16	343 ± 26 ms (311-407) 16	162 ± 10 ms (141-176) 18
	silence	0,95 ± 0,18 s (0,18-0,75) 11	0,54 ± 0,34 s (0,26-1,53) 15			silence	1,40 ± 0,84 s (0,73-3,41) 15	1,15 ± 0,50 s (0,59-2,37) 15	2,02 ± 3,40 s (1,71-6,55) 17
	FD	4151 ± 26 Hz (4092-4217) 16	4151 ± 26 Hz (4092-4217) 16			FD	3615 ± 16 Hz (3588-3639) 16	3418 ± 29 Hz (3353-3446) 16	5740 ± 53 Hz (5595-5809) 18
matouba	chant	375 ± 15 ms (352-404) 16	350 ± 29 ms (312-401) 24		Savanne à mulet	chant		441 ± 30 ms (311-407) 16	178 ± 08 ms (164-192) 20
	silence	1,62 ± 0,99 s (0,86-4,15) 15	1,11 ± 1,01 s (0,53-5,04) 23			silence		1,09 ± 1,28 s (0,49-4,91) 16	4,99 ± 4,52 s (1,18-23,17) 19
	FD	3603 ± 6 Hz (3592-3611) 16	3260 ± 134 Hz (3110-3530) 25			FD		3418 ± 29 Hz (3353-3446) 16	4117 ± 58 Hz (4019-4213) 20
bois malher	chant		314 ± 11 ms (292-332) 17		deux mamelles	chant			159 ± 11 ms (143-170) 10
	silence		0,82 ± 0,53 s (0,46-2,53) 16			silence			0,62 ± 0,08 s (0,51-0,75) 9
	FD		3764 ± 127 Hz (3632-4093) 17			FD			4399 ± 36 Hz (4338-4446) 10

Tableau 1 : Tableau synthétique des mesures des chants des trois Hylodes de Basse Terre par localité. FD = fréquence dominante du chant (maximum d'intensité).

Le chant d'appel d'*E. pinchoni* se distingue des autres espèces guadeloupéennes par tous ses paramètres, en particulier parce qu'il ne comporte qu'une seule note de fréquence très aigüe. La séquence d'appel est une répétition de chants identiques et chaque chant dure en moyenne 167 ± 8 ms (N = 66). Les silences entre les chants sont d'environ $3,55 \pm 2,09$ s (N = 61). Un oscillogramme n'indique pas de motif périodique de modulation d'amplitude (MA). En ce qui concerne les caractéristiques spectrales, une transformation de Fourier rapide

indique que le signal est pur, avec une fréquence dominante moyenne de 4850 ± 652 Hz (N = 66). La modulation fréquence (MF) est absente.

Les variations de la fréquence en fonction de l'altitude ont été synthétisées dans les figures 4,5,6 et 8 et le tableau 1. On observe une augmentation linéaire entre la hauteur de la fréquence dominante et l'altitude : plus la fréquence est élevée plus l'altitude est basse. On observe que, pour toutes les espèces, les fréquences du chant entre les populations de la savane à Mulet et des deux Mamelles sont proches. On constate également une augmentation de la fréquence en forêt de Bains Jaunes chez *E. martinicensis* et *E. Pinchoni*. Est-ce lié à l'environnement (savane versus forêt) ou à l'altitude ?

Nos observations de terrain ont permis d'effectuer dans de très bonnes conditions des enregistrements vocaux des chants de trois des espèces (environ 300 individus ont été vus et enregistrés) : *E. pinchoni*, *E. johnstonei*, et *E. martinicensis*. Sur l'ensemble des sites prospectés, nous avons enregistré le chant d'appel sexuel mais aussi dans certains cas le cri de défense du territoire d'un minimum de dix individus par population. Nous avons aussi mesuré à l'aide d'un sonomètre (Bruel et Kjaër) l'intensité des émissions vocales de ces mêmes individus.



Figure 7 : Exemple de photographies au rapport 1/1 d'*E. pinchoni* (à gauche et en bas à droite) et d'*E. johnstonei* (en haut à droite) permettant d'effectuer des mesures morphométriques.

Afin de compléter nos observations, chaque individu a été photographié. Ceci permet d'avoir des données sur la morphologie et les patrons de colorations dorsaux. (Figure 3, et Figure 7). Ceci nous permettra également d'extraire des données morphométriques. Le traitement des données moléculaires est dans une phase de test sur les tissus d'un individu d'*E. martinicensis* de la Soufrière. Nos collègues du Génomole à Evry (Dr. Nicolas Pollet) vont tenter d'extraire le génome afin de développer une méthodologie non invasive sur les animaux.

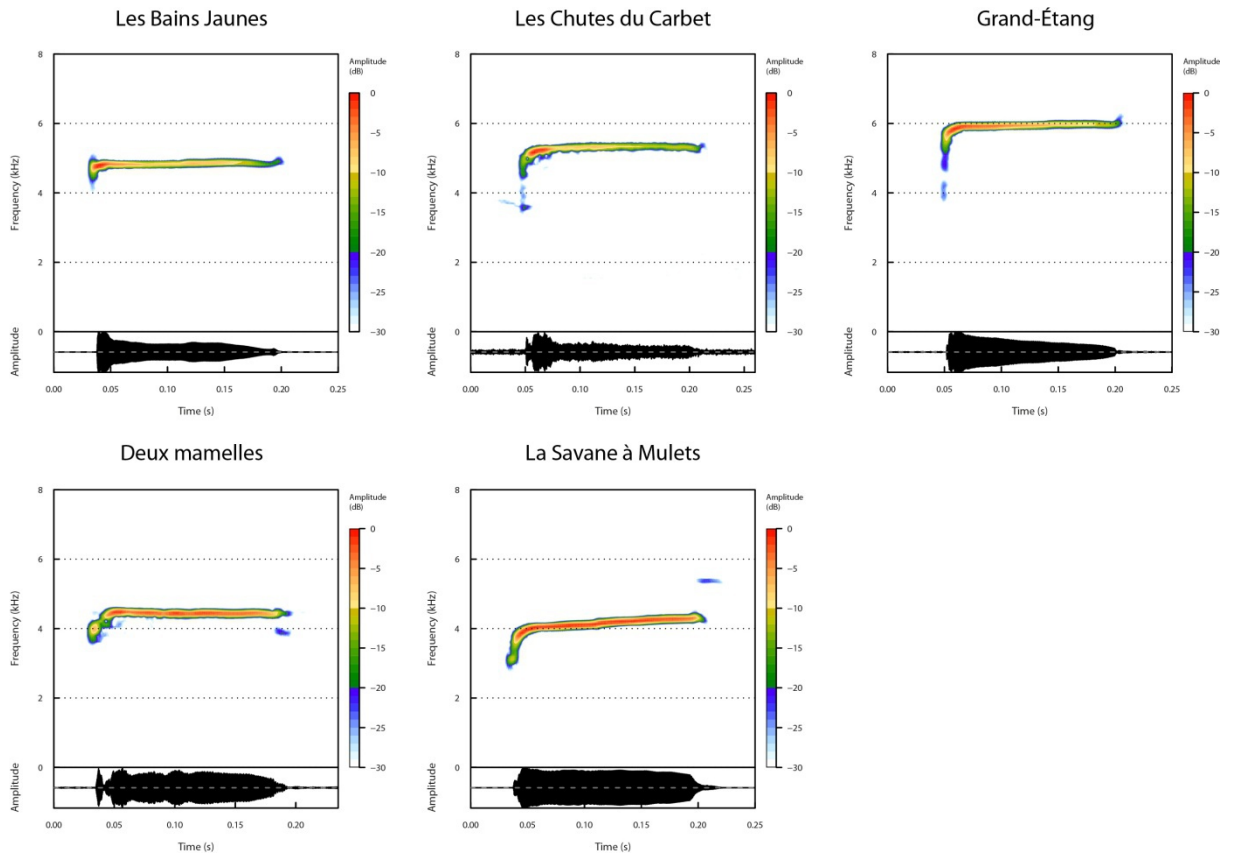


Figure 6 : Illustration de la variation du chant d'*E. pinchoni* en fonction de la localité. Le sonagramme et l'oscillogramme représentent le chant enregistré dans 5 localités. On observe des variations de durée des notes ainsi que de la hauteur des fréquences du chant.

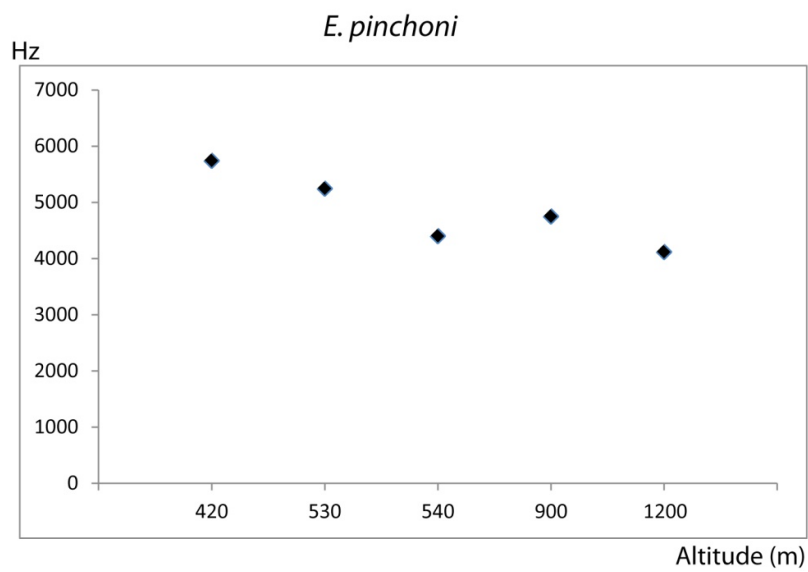
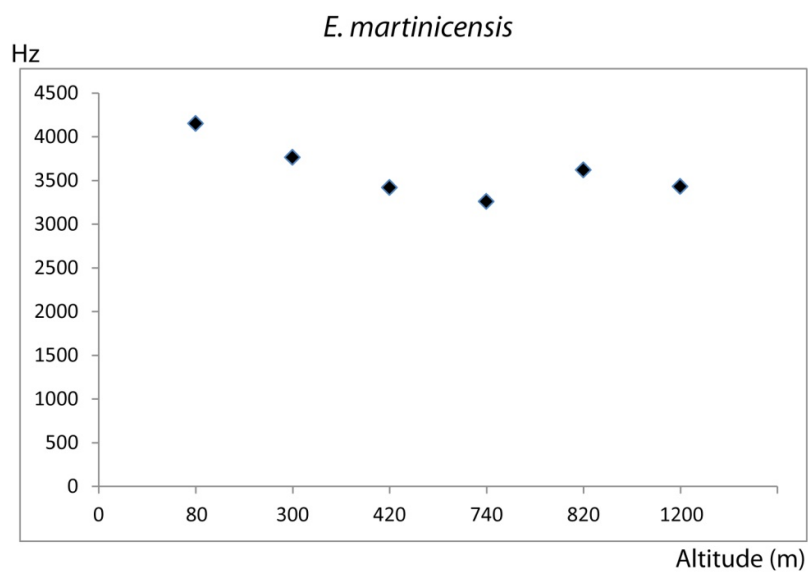
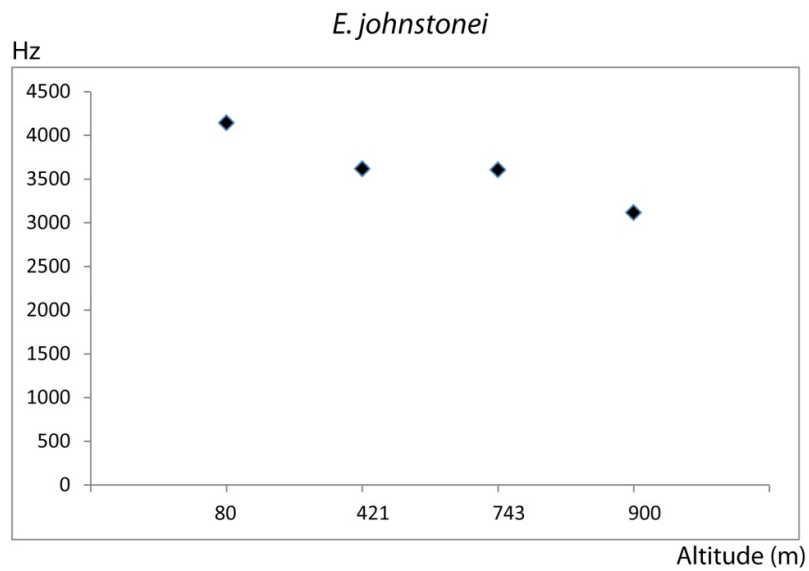


Figure 8 : Graphique de la variation de la fréquence dominante du chant d'*E. johnstonei*, *E. martinicensis* et *E. pinchoni* en fonction de l'altitude.

Expériences de propagation.

Au cours de nos missions, nous avons essayé de caractériser l'environnement acoustique des Hylodes. Pour ce faire nous avons réalisé des expériences de diffusion à l'aide d'une chaîne d'émission (magnétophone – amplificateur - haut-parleur) et de réception (microphone – magnétophone). Des sons artificiels de calage temporel, suivis des chants de référence des espèces *E. pinchoni*, *E. johnstonei* et *E. martinicensis* ont été diffusés dans deux milieux représentatifs : forêt (milieu fermé) et savane (milieu ouvert).

Les expériences de propagation ont été réalisées dans deux buts : 1) déterminer l'effet de l'environnement sur la communication acoustique et 2) déterminer la distance de captation des enregistreurs autonomes. Les résultats ont été rassemblés dans les figures 9 et 10

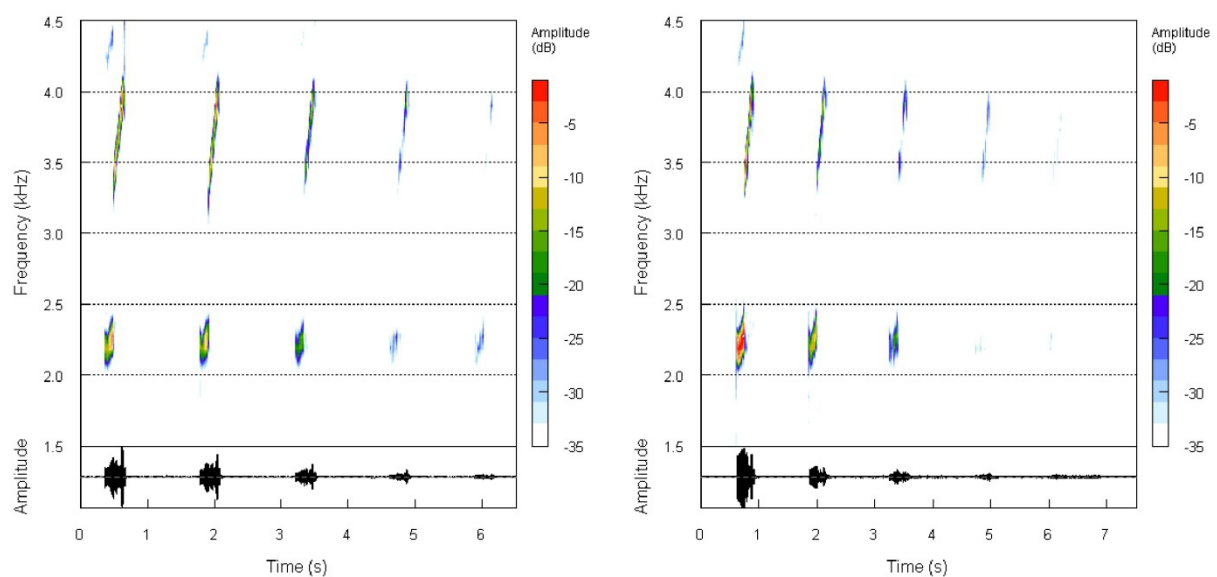


Figure 9 : Exemple de propagation en forêt (ici de Bains Jaunes) du chant d'*E. martinicensis* de forêt. Le sonagramme et l'oscillogramme représente le chant enregistré à 1m, 2m, 4m, 8m et 16m diffusé par un haut-parleur. A gauche, au-dessus du sol (1m) et à droite au sol.

Les sons émis ont été ré-enregistrés à 1 m (référence sans effet de propagation) et aux distances de 2 m, 4 m, 8 m, 16 m (mesurée au laser) et à deux hauteurs représentatives (au sol et 1 m). Le signal enregistré à 1 m du haut-parleur est utilisé afin d'éliminer les artefacts dus à la chaîne électroacoustique de diffusion. Les autres signaux enregistrés aux différentes distances seront tous comparés à ce signal de référence enregistré à 1 m.

L'intensité des signaux émis correspond à celle des signaux naturels des taxons. Une série de propagations a été effectuée en sous-bois de la forêt de bains jaunes et une autre série sur la savane à Mulet au pied de la Soufrière (1200 m alt.). Des mesures du bruit ambiant ont également été réalisées pendant et hors de l'activité acoustique des hylodes afin de déterminer, l'intensité, le contenu spectral et temporel du bruit.

Les premiers résultats indiquent une modification progressive et accentuée de l'enveloppe du signal. On note une dégradation plus rapide de la modulation d'amplitude (MA) au sol, à la savane à Mulet. Bien souvent les données à 16 m n'ont pu être mesurées, le rapport signal-bruit étant trop faible.

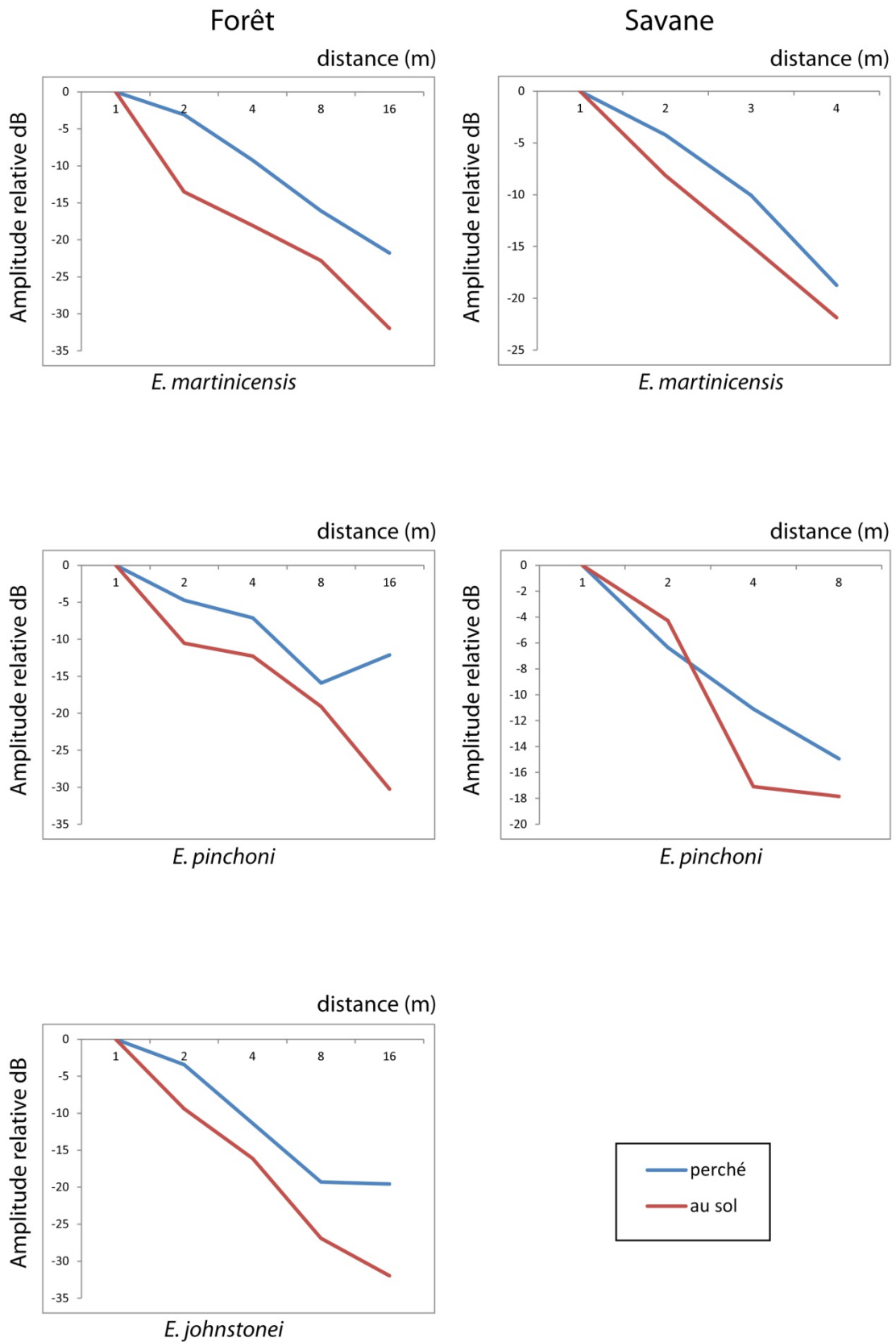


Figure 10 : Atténuation des chants des trois espèces d’hylodes au cours de la propagation en forêt (ici de Bains Jaunes) et à la savane à mulet du chant d’*E. martinicensis* de forêt. Les graphiques illustrent la variation de l’amplitude maximale des chants enregistrés à 1m, 2m,

4m, 8m et 16m diffusé par un haut-parleur perché ou au sol. A gauche, en forêt de Bains Jaunes et à droite à la savane à Mulet.



Figure 11: Sites choisis pour les expériences de propagation des sons et matériel de diffusion des vocalisations. a) Savane à Mulet Soufrière ; b) Appareils automatiques permettant la diffusion programmable des vocalisations. C) forêt des Bains Jaunes (sous-bois).

Expériences de playback.

Au vu de nos observations préliminaires, des différences acoustiques et morphométriques entre les populations au sein d'une même espèce d'hylode semblent exister. Il nous est apparu intéressant de confronter ces données morphologiques et acoustiques aux données comportementales. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de playback avec un amplificateur- haut-parleur autonome télécommandé (figure 4). Les hylodes d'une population forestière basse altitude (Grand Etang), haute altitude (Bains Jaunes) ou de savane (Savane à Mulet) ont été soumises à des signaux d'un individu soit de la population de forêt soit de la population de savane. L'ordre de diffusion était aléatoire pour éviter un phénomène de réponse au premier signal. Les réponses aux signaux ont été évaluées suivant une échelle éthologique prenant en compte les comportements suivants : orientation par rapport à la source sonore (temps de latence (s) par rapport à la 1^{ère} émission, durée (s), distance d'approche de la source sonore (m), nombre de chants et de cris). Ces réponses ont été notées pendant la diffusion et les 2 min suivant la fin de diffusion. Elles ont été comparées à la période de 2 min précédant la diffusion. Nous avons déjà pu tester plus d'une vingtaine de *E. pinchoni* de forêt ainsi qu'une vingtaine de la savane à Mulet (table 2). Les tests des populations *E. martinicensis* ont également été réalisés à Matouba, Bains Jaunes, Grand Etang et à la Savane à Mulet. Au total, plus d'une centaine d'hylodes ont été testées (table 2). L'intensité de leur chant a été mesurée lors de ces expériences. Les animaux répondent très bien aux expériences et il semblerait que des différences importantes dans les réponses comportementales existent entre ces populations, en particulier pour l'espèce *E. pinchoni*. Des

résultats préliminaires indiquent en effet que chez cette espèce, les individus des deux populations testées (Savane et forêt) répondent uniquement, et de façon marquée, aux signaux d'individus de la population dont ils proviennent.

Lieux des tests	Savane à Mulet Soufrière	Savane à Mulet Soufrière	Forêt bain jaune et Matouba	Grand Etang	Grand Etang
tests	Sav & For	Sav & GE	For & Sav	GE & Sav	GE & For
<i>E. martinicensis</i>	10	8	14	12	
<i>E. pinchoni</i>	23	2	26	12	8

Table 2 : lieux et nombre d'expériences de playback effectuées (Sav = savane à mulets, For= forêt de Bains Jaunes, GE= Grand-Etang).

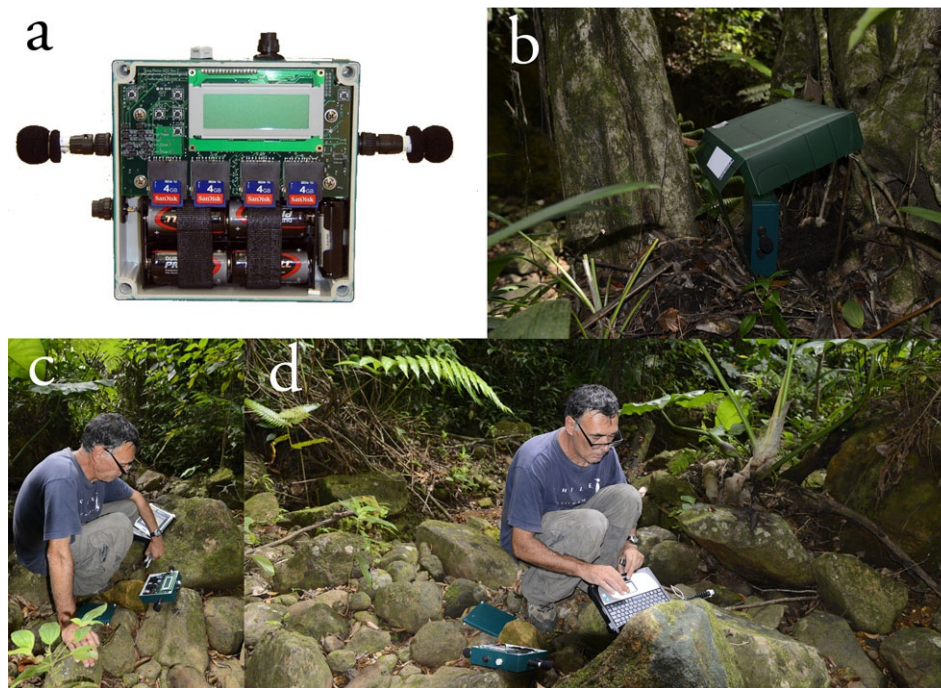


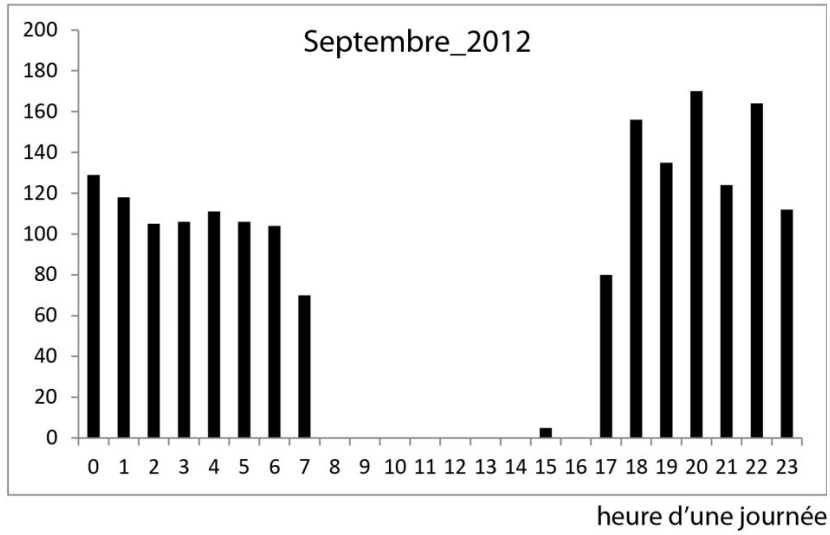
Figure 12 : Enregistreur autonome permettant a) l'enregistrement programmable (vue interne) ; b) enregistreur automatique *in situ* (Matouba) ; c) programmation de l'appareil ; d) sauvegarde et contrôle des données sur ordinateur.

Suivi acoustique automatique dans différents milieux.

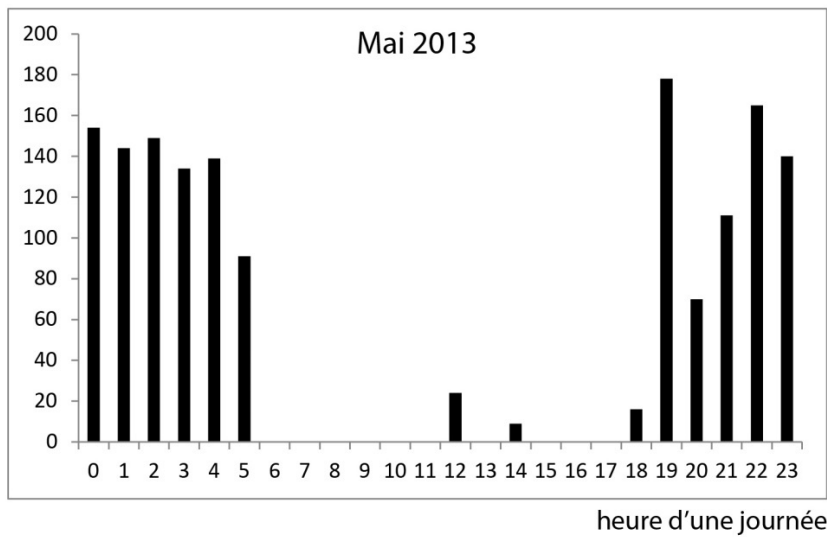
Dans un quatrième volet de notre mission, qui a débuté très rapidement après repérage des sites, nous avons installé quatre enregistreurs automatiques SongMeters (Wildlife Acoustics S.A., figure 5) dans des biotopes bien différenciés : deux zones forestières (Matouba et forêt des Bains Jaunes) et deux zones de Savane (au pied de la Soufrière). L'enregistreur de Matouba a été installé près d'un cours d'eau (figure 5), afin d'augmenter nos chances d'enregistrer *E. barlagnei* (toujours non identifiée). Un second enregistreur a été installé en sous-bois en pleine forêt de bain Jaune, où *E. martinicensis* et *E. pinchoni* étaient entendues. Les deux derniers enregistreurs ont été installés dans deux zones distinctes afin de suivre l'activité soit d'*E. pinchoni* soit d'*E. martinicensis*. Les boîtes d'enregistrements ont fait l'objet de contrôles afin d'obtenir des données comparatives entre sites. Des problèmes d'amplification ou de protection de microphones ont été rencontrés la première semaine de la première mission. Nous avons solutionné ces problèmes par la suite. Les coordonnées GPS ont été introduites dans le logiciel des enregistreurs autonomes ainsi que les relevés de températures. Un programme d'enregistrement a été défini pour déclencher les enregistreurs au même moment. Afin d'avoir une image fidèle des activités nyctémérales des Hylodes, nous avons réalisé des prises de données de 1 min par heure durant 13 jours en Septembre 2012, 12 jours en Mai 2013 et 10 jours en Janvier 2014. Nous avons enregistré une bande de fréquences entre 20 et 20 000 Hz.

Au total, nous avons enregistré 32 Go de données acoustiques sur les hylodes. Ces données sont conservées par chaque participant à l'étude et seront déposées au MNHN de Paris (responsable Laure Desutter) et au Museo Nacional de Ciencia Naturales de Madrid (responsable Rafael Marquez).

Chant/min



Chant/min



Chant/min

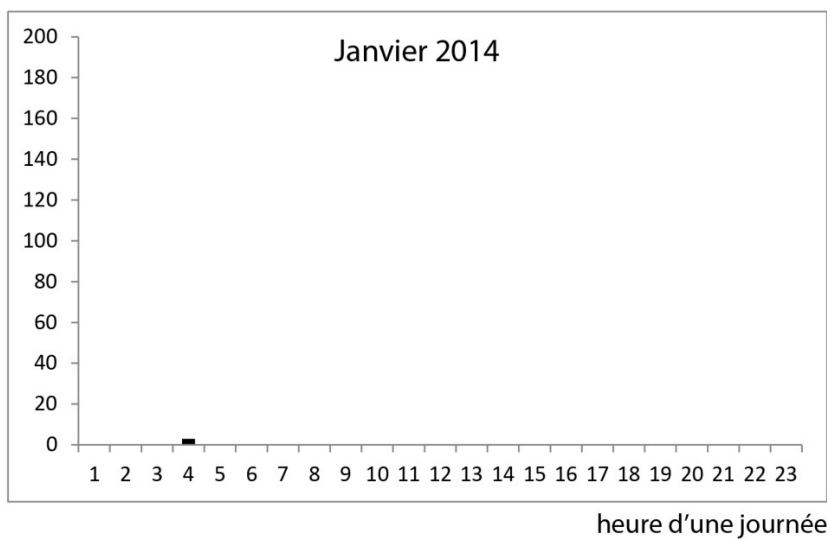


Figure 13 : Trois exemples de d'activité vocale nycthémérale en forêt de Bains Jaunes. Ils illustrent la variation de l'intensité de l'activité vocale au cours d'une journée à trois périodes de l'année (en saison des pluies puis en saison sèche). Le nombre de chants par minute a été évalué. L'activité vocale est principalement due à *E. martinicensis*.

Etudes génétiques

Une soixantaine d'échantillons ont été obtenus par grattage de l'épiderme des hylodes en vue d'une caractérisation génétique. L'étape d'analyse génétique au laboratoire a nécessité d'attendre l'obtention de l'ensemble des échantillons. En effet il est techniquement préférable de réaliser un traitement simultané des échantillons. L'ADN va être extrait des écouvillons puis être utilisé pour une amplification par PCR de plusieurs marqueurs. Afin de maximiser l'impact de notre étude génétique nous avons choisi des marqueurs précédemment employés sur différentes espèces d'hylodes (Heinicke et al. 2007). Nous utiliserons en premier lieu un marqueur mitochondrial (fragment de la région contrôle) ainsi qu'un marqueur de l'ADN nucléaire (contenant l'intron du gène de la cristalline beta). Les produits de PCR seront purifiés puis séquencés. Les séquences obtenues seront ensuite analysées pour reconstruire les relations phylogénétiques, en incluant les séquences d'échantillons déjà disponibles dans les banques de séquence. En fonction de l'informativité de ces marqueurs sur nos échantillons, nous collecterons des séquences sur davantage de marqueurs tant mitochondriaux que nucléaires.

En plus des échantillons obtenus par grattage, nous disposons d'échantillons plus importants à partir desquels nous allons pouvoir obtenir de plus grandes quantités d'ADN génomique et de meilleure qualité. Cet ADN sera utilisé pour réaliser un séquençage génomique plus important à l'aide des méthodes de séquençage massivement parallèle.

Conclusion

Les résultats encourageants obtenus montrent la faisabilité d'un tel protocole. Durant cette campagne un large échantillonnage d'hylodes (≈ 300 individus) a pu être réalisé. Malgré cela *E. barlagnei* n'a pu être observé. Au vu du caractère endémique de cette espèce, il serait important de mettre en place de nouvelles campagnes d'exploration couplant étude de terrain (à différentes périodes de l'année et du nycthémère) et un suivi permanent par des enregistreurs autonomes répartis dans le PNG. Nous espérons à terme à l'aide d'algorithmes informatiques, automatiser l'analyse et ainsi prolonger le suivi de ces populations et la collaboration avec le PNG. La mise en place d'un protocole d'acquisition de données génétiques, acoustiques et morphologiques serait également souhaitable. Il serait également intéressant d'accéder à l'information provenant des spécimens de référence déposés en collection. Ceci permettrait de lever l'ambiguïté d'identification sur certains individus et de détecter d'éventuelles hybridations. Toutefois, nos données acoustiques ne suggèrent pas, jusqu'à présent, l'existence de tels cas. L'ensemble du protocole met en exergue des variations populationnelles qu'il serait souhaitable d'affiner par des analyses complémentaires sur un échantillonnage plus étendu, notamment au nord et à l'ouest du Parc. La possibilité de l'existence d'un complexe d'espèces va être testée grâce aux données morphologiques, génétiques et comportementales.

Références bibliographiques

Andreone F, Carpenter AI, Cox N, du Preez L, Freeman K *et al* 2008. The challenge of conserving amphibian megadiversity in Madagascar. *PLoS Biol* 6:e118

Balmford A, Crane P, Dobson A, Green RE, Mace GM 2005. The 2010 challenge: data availability, information needs and extraterrestrial insights. *Phil Trans R Soc B* 360: 221–228.

Bradbury JW, Vehrencamp SL 1998. Principles of animal communication. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Breuil M 2002. *Histoire naturelle des Amphibiens et Reptiles terrestres de l'archipel Guadeloupéen. Guadeloupe, Saint-Martin, Saint-Barthélemy*. Patrimoines Naturels, 54, Paris, SPN / IEGB / MNHN.

Breuil M, Guiougou F, Questel K, Ibéné B 2010 (2009). Modifications du peuplement herpétologique dans les Antilles françaises. Disparitions et espèces allochtones. 1ère partie : Historique-Amphibiens. *Le Courrier de la Nature*, 249: 30-37.

Crawford AJ 2003. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol Ecol* 12:2525–2540

Crawford AJ, Smith EN 2005. Cenozoic biogeography and evolution in direct-developing frogs of Central America (Leptodactylidae: Eleutherodactylus) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Mol Phylogenet Evol* 35:536–555

Dayrat B 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol J Linn Soc* 85:407–415

Elmer KR, Davila JA, Loughheed SC 2007. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC Evol Biol* 7:247

de Queiroz K (ed) 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In:

Howard DJ, Berlocher SH. Endless forms: species and speciation and speciation. Oxford University Press, Oxford, pp 57–75

de Queiroz K 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* 56:879–886

Endler, JA 1992. Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *American Naturalist* 139 (Supplement): s125-s153.

Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C, Blanc M, Gemmell NJ 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2:e1109

Hedges SB, Duellman WE, Heinicke MP 2008. New World directdeveloping frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa* 1737: 1–182

Hedges SB, Ibéné B, Breuil M, Powell R 2004a. – *Eleutherodactylus barlagnei*. In : *UICN 2010. 2010 UICN Redlist of Threatened Species*. <http://www.iucnredlist.org>.

Hedges SB, Ibéné B, Breuil M, Powell R 2004b. – *Eleutherodactylus pinchoni*. In : *UICN 2010. 2010 UICN Redlist of Threatened Species*. <http://www.iucnredlist.org>.

Hedges SB, Ibéné B, Breuil M, Powell R 2004c. – *Eleutherodactylus martinicensis*. In : *UICN 2010. 2010 UICN Redlist of Threatened Species*. <http://www.iucnredlist.org>.

Hedges SB, Ibéné B, Breuil M, Powell R 2004d. – *Eleutherodactylus johnstonei*. In : *UICN 2010. 2010 UICN Redlist of Threatened Species*. <http://www.iucnredlist.org>.

Heinicke MP, Duellman WE, Hedges SB. 2007 Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:10092-7.

IUCN (World Conservation Union) 2001. IUCN red list categories. Version 3.1. Species Survival Commission, IUCN, Cambridge

James H 1999. Why are there so many new amphibian species when amphibians are declining? *Trends Ecol Evol* 14:7–8

Kaiser H., Murdoch J. T., Boistel R., Breuil M. 2003. *Eleutherodactylus pinchoni*. Catalogue of Amphibians and Reptiles. 765: 1-4.

Kaiser H., Boistel, R., Breuil M. 2004. *Eleutherodactylus barlagnei*. Catalogue of Amphibians and Reptiles. 784: 1-3. -2003 : 1-2.

Köhler J, Vieites DR, Bonett RM, Garcí'a FH, Glaw F et al 2005. New amphibians and global conservation: a boost in species discoveries in a highly endangered vertebrate group. *Bioscience*

55:693–696

Mayr E 1948. the bearing of the new systematics on genetical problems: the nature of species, *adv. genet.* 2: 205-237.

Meenderink SW, Kits M, Narins PM. 2009. Frequency matching of vocalizations to inner-ear sensitivity along an altitudinal gradient in the coqui frog. *Biol Lett.* 2010 6(2):278-281.

Meegaskumbura M, Bossuyt F, Pethiyagoda R, Manamendra-Arachchi K, Bahir M et al (2002) Sri Lanka: an amphibian hot spot. *Science* 298:379

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GA, Kent J 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858

Otte D 1974. Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Annu Rev Ecol Syst* (1974) 5:385–417.

Padial, J. M., A. Miralles, I. de la Riva & M. Vences (2010): The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7: article 16.

Padial AA, De la Riva I 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zool J Linn Soc* 155:97–122

Rodriguez A, Vences M, Nevado B, Machordom A, Verheyen E 2010. Biogeographic origin and radiation of Cuban *Eleutherodactylus* frogs of the auriculatus species group, inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 54:179–186

Ryan MJ 1990. Signals, species, and sexual selection. *American Scientist* 78:46-52.

Shannon, Claude E. & Warren Weaver (1949): *A Mathematical Model of Communication*. Urbana, IL: University of Illinois Press.

Streicher JW, Crawford AJ, Edwards CW 2009. Multilocus molecular phylogenetic analysis of the montane *Craugastor podiciferus* species complex (Anura: Craugastoridae) in Isthmian Central

America. *Mol Phylogenet Evol* 53:620–630

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS *et al* 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306:1783–1786

Velo-Anton G, Burrowes PA, Joglar RL, Martinez-Solano I, Beard KH, Parra-Olea G (2007) Phylogenetic study of *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae) reveals deep genet fragmentation in Puerto Rico and pinpoints origins of Hawaiian populations. *Mol Phylogenet Evol* 45:716–728

Vences M, Wake DB 2007. Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. In: Heatwole H (ed) *Amphibian biology*, vol 7. Surrey Beatty & Sons PTY limited, Chipping

Norton, pp 2613–2671

