

# L'ADN environnemental peut-il remplacer les suivis acoustiques pour étudier la phénologie de reproduction des amphibiens ? Le cas de la Rainette faux-grillon dans l'Est du Canada.

Par **Orianne Tournayre**  
orienne.tournayre@gmail.com

Etude dont cet article est issu :

**CHEN Ying, TOURNAYRE Orianne, TIAN Hao-lun, LOUGHEED Stephen Charles (2023).**

Assessing the breeding phenology of a threatened frog species using eDNA and automatic acoustic monitoring. *PeerJ*, 11, e14679.

**Mots clés :** phénologie, amphibien, acoustique, ADN environnemental.

## Résumé

En raison du changement climatique certains amphibiens présentent des modifications de leur phénologie, telles qu'une saison de reproduction précoce ou tardive. Ce décalage peut entraîner des conséquences sur la survie et la reproduction des individus et potentiellement participer au déclin des populations. Cependant, le suivi de la phénologie des amphibiens peut être difficile en raison de leur nature cryptique et certains groupes d'amphibiens, tels que les salamandres, ne vocalisent pas et ne peuvent donc pas être suivis par des méthodes acoustiques. Notre but était donc de tester l'efficacité d'une méthode récente non-invasive basée sur l'ADN environnemental (ADNe) dans l'eau comme alternative à la surveillance acoustique pour étudier la phénologie de reproduction des amphibiens. Pour



© Stephen C. Loughheed

La Rainette faux-grillon de l'Ouest (*Pseudacris triseriata*) est une petite espèce de rainette dont les populations en Ontario et au Québec sont en déclin (COSEPAC, 2008). Sa taxonomie est controversée en grande partie par de nouvelles études de génétique qui suggèrent une histoire évolutive complexe avec hybridation et introgression (Lemmon et al., 2007; Loughheed et al., 2020) : les génomes nucléaires des populations d'Ontario et du Québec sont semblables, mais il existe deux génomes mitochondriaux profondément divergents. L'un ressemble à celui de la Rainette faux-grillon de l'Ouest (*P. triseriata*) et l'autre à celui de la Rainette faux-grillon boréale (*P. maculata*). Le nom légal actuel des populations est la Rainette faux-grillon de l'Ouest (*P. triseriata*), avec deux unités désignables correspondant aux deux types de génomes mitochondriaux (mitotypes) : i) la population carolinienne avec le mitotype *P. triseriata*; et ii) la population des Grands Lacs / Saint-Laurent et Bouclier canadien avec le mitotype de *P. maculata* (COSEPAC, 2008).

Encadré :

Une taxonomie controversée.

**cela nous avons mené simultanément un suivi acoustique et ADNe avant et pendant la saison de reproduction de la Rainette faux-grillon dans l'Est de l'Ontario (Canada). Nous avons enregistré le premier chant de mâle le 31 Mars alors que le marais était encore largement gelé. L'ADNe de la Rainette faux-grillon a été détecté dans l'eau six jours après le premier enregistrement de mâle actif. Par la suite, des signaux d'ADNe ont été détectés à plusieurs endroits du marais et les concentrations ont augmenté à mesure que davantage de mâles participaient au chœur, suggérant que l'ADNe pourrait être un indicateur raisonnable de la taille du chœur de mâles. Nos résultats montrent donc que les suivis acoustiques restent préférables pour détecter le tout début de la saison de reproduction (i.e. premier(s) individu(s) actif(s)) mais l'ADNe peut être relativement efficace et non invasif pour les amphibiens qui ne vocalisent pas.**

## Introduction

Le changement climatique impacte négativement la biodiversité et notamment la phénologie des espèces. Les changements de phénologie se manifestent par un décalage des périodes du cycle de vie associées aux saisons, telles que la migration (VAN BUSKIRK, MULVIHILL & LEBERMAN, 2009), la floraison (CARADONNA, ILER & INOUE, 2014), ou la saison de reproduction (KLAUS & LOUGHEED, 2013 ; LYNCH *et al.*, 2016). Les changements de phénologie peuvent entraîner des conséquences de l'individu à la population (STILLMAN, 2019). Par exemple, la naissance

des Mésanges charbonnières (*Parus major*) est synchronisée avec un pic d'abondance de chenilles qui est la nourriture principale des oisillons. Une date de ponte trop tardive peut entraîner un décalage temporel entre l'éclosion des oisillons et le pic de ressources alimentaires nécessaires à leur bon développement et survie (VISSER *et al.*, 2006).

Les amphibiens font partie des vertébrés les plus menacés au monde et répondent de manière hétérogène au changement climatique (FICETOLA & MAIORANO, 2016) : certains ne montrent pas de changement phénologique, tandis que d'autres se reproduisent plus tôt ou plus tard. Les raisons d'une telle disparité ne sont pas toutes clairement établies, mais les indices environnementaux déclenchant le début de la saison de reproduction sont probablement différents selon les espèces : par exemple, la température (OSPINA *et al.*, 2013), les précipitations (SAENZ *et al.*, 2006), la photopériode (SCHALK & SAENZ, 2015), ou le cycle lunaire (GRANT, CHADWICK & HALLIDAY, 2009). Il existe différentes méthodes de suivi des amphibiens : les méthodes dites « invasives » qui requièrent de capturer les individus (capture à la main, à l'aide de pièges ou de barrières) et les méthodes « non invasives » telles que les prospections visuelles ou les suivis acoustiques. L'ADN environnemental (ADNe) offre une méthode de suivi non invasive alternative. L'ADN environnemental est l'ADN libéré dans l'environnement (eau, air, sol, fèces) par les êtres vivants au travers de l'urine, gamètes, mucus, salive, cellules de la peau, etc. Il permet donc d'identifier les organismes présents dans un site sans avoir à repérer visuellement/auditivement ou capturer les individus au préalable.

Dans cette étude réalisée dans l'Est de l'Ontario au Canada, nous avons conçu et validé une méthode pour détecter

l'ADNe de la Rainette faux-grillon de l'Ouest (*Pseudacris triseriata*, **Encadré p. 131**) à partir d'échantillons d'eau. Nous avons ensuite comparé l'efficacité du suivi par ADNe et du suivi acoustique à révéler la phénologie de reproduction de cette espèce.

## Matériels et méthode

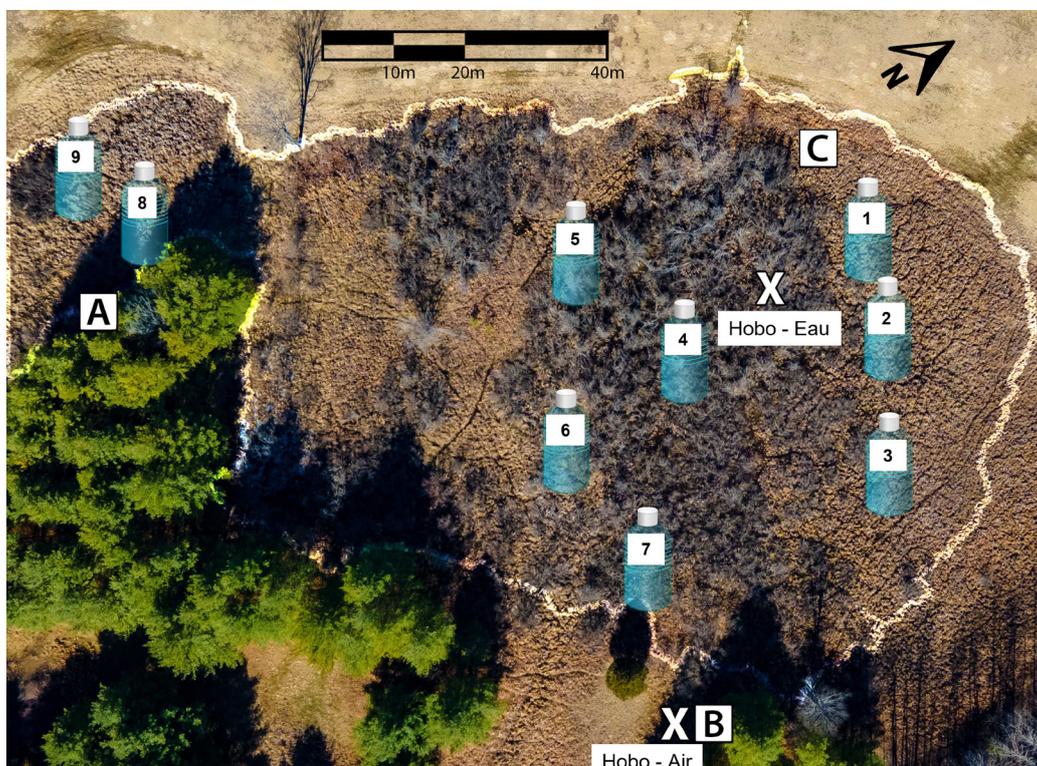
### La rainette faux-grillon

La Rainette faux-grillon de l'Ouest passe la majeure partie de sa vie sous la litière des feuilles et débris ligneux dans les zones boisées (WHITAKER, 1971). Elle survit à l'hiver grâce à un cryoprotecteur qui réduit la probabilité de geler lorsque les températures sont inférieures à zéro (HIGGINS & SWANSON, 2013) et ne se manifeste que pendant la saison de reproduction, lorsque les mâles se positionnent à la

surface de l'eau dans les milieux humides temporaires et peu profonds. Ils émettent alors des cris d'appel jours et nuits dans le but d'attirer les femelles (WHITAKER, 1971). Les Rainettes faux-grillon de l'Ouest sont notoirement difficiles à trouver et à capturer, le moyen de suivi de cette espèce le plus efficace est donc de cibler les mâles par suivi acoustique pendant la saison de reproduction (BUCKLEY *et al.*, 2021).

### Site d'étude et données environnementales

Notre site d'étude (Round Field Marsh) est un marais peu profond à la Station Biologique de l'Université Queen's (QUBS) dans l'Est de l'Ontario au Canada (44.5175° N, 76.3883° O). Du 8 mars au 25 juillet 2022, nous avons enregistré pour chaque heure l'humidité et la température de l'air à l'aide d'un enregistreur HOBO



**Figure 1.**

Photo du site d'échantillonnage. La ligne blanche représente la délimitation du marais. « A », « B » et « C » indiquent les enregistreurs correspondants. Les « X » indiquent la localisation des sondes mesurant la température de l'eau et de l'air respectivement. Les bouteilles numérotées de 1 à 9 indiquent où les échantillons d'eau ont été collectés.

MX2303 ainsi que la température de l'eau à l'aide d'un enregistreur HOBO UA-001-08 (**Figure 1**). Nous avons téléchargé des données sur les précipitations et la vitesse du vent d'une station météorologique AcuRite Atlas située à 10 km du site d'étude. Un drone DJI Mavic 2 Air a été déployé à chaque séance d'échantillonnage d'ADNe pour caractériser la couverture de glace et neige du site au cours de la saison.

### Suivi acoustique automatique

Nous avons placé trois enregistreurs acoustiques passifs (Song Meters SM4, Wildlife Acoustics) de part et d'autre du marais le 8 mars 2022 (A, B et C : voir emplacements sur la **Figure 1**), avant le début de la saison de reproduction alors que le marais était encore gelé et recouvert de neige. Nous avons enregistré les trois premières minutes de chaque heure et récupéré les données après la fin de la saison de reproduction (juillet 2022). L'enregistreur C a produit des enregistrements discontinus et de nombreuses données manquantes et a donc été utilisé seulement pour compléter l'information données par les deux autres enregistreurs. Nous avons écouté et inspecté visuellement les spectrogrammes sur Kaleidoscope Pro 5.4.6 (Wildlife Acoustics Inc) pour estimer le nombre de mâles émettant des cris d'appel. Les Rainettes faux-grillon ont des cris avec pulsations distinctifs et une fréquence dominante à environ 3,5 kHz (BEE et al., 2010; NITYANANDA & BEE, 2011). Lorsque nous avons estimé un nombre différent de mâles entre les deux enregistreurs A et B (en raison du bruit de fond et/ou de la distance entre les mâles chantants et les enregistreurs), nous avons utilisé la valeur des deux la plus élevée.

Nous avons transformé l'activité acoustique

en variable binaire pour chaque heure (1 : cri(s) enregistré(s) pendant l'heure ; 0 : pas de cris pendant l'heure) de minuit le 31 mars à 23 h le 12 avril lorsque l'échantillonnage de l'ADNe a pris fin (plateau d'activité du chœur des mâles). À l'aide d'un modèle linéaire généralisé (GLM, famille quasibinomiale) nous avons exploré le lien entre les variables environnementales et l'activité acoustique horaire : température de l'eau (°C), humidité relative (%), taux de précipitations (mm/h), vitesse du vent (km/h) et activité au cours de l'heure précédente (1 : cri(s) enregistré(s), 0 : pas de cris) pour tenir compte de la potentielle non-indépendance des données. Nous n'avons pas inclus la température de l'air dans le modèle parce que la température de l'air était fortement corrélée à celle de l'eau (corrélation de Spearman = 0,7) et les rainettes faux-grillon mâles appellent généralement à la surface de l'eau.

### Suivi par ADN environnemental

#### Conception et validation.

Nous avons conçu et validé une méthode par ADNe ddPCR pour cibler la Rainette faux-grillon de l'Ouest présentant le mitotype *P. maculata* (**Encadré p. 131**). Notre couple d'amorces et sonde TaqMan ciblent une code-barre ADN de 196 paires de bases du gène cytochrome b. Ce court fragment nous permet de distinguer la Rainette faux-grillon des autres espèces d'amphibiens mais également de distinguer les deux mitotypes de Rainette faux-grillon (*P. triseriata* et *P. maculata*). Nous avons validé notre approche i) *in silico* en utilisant les séquences d'amphibiens présentes dans les bases de données publiques, ii) *in vitro* en utilisant de l'ADN des espèces d'amphibiens co-occurentes et du mitotype *P. triseriata*, et iii) *in vivo* en utilisant des échantillons d'eau prélevés dans neuf sites où la présence/absence

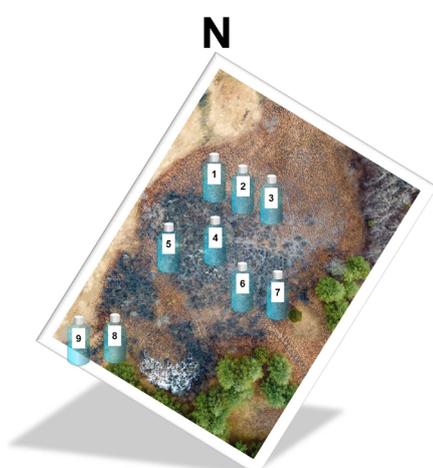
de la Rainette faux-grillon présentant le mitotype *P. maculata* est connue. Enfin, nous avons déterminé la limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ), c'est-à-dire la concentration d'ADNe la plus faible que l'on puisse respectivement détecter et quantifier avec confiance (KLYMUS et al. 2020, BRYS et al. 2021).

### Echantillonnage d'eau, filtration et laboratoire.

Le protocole utilisé pour détecter l'ADNe de la Rainette faux-grillon à partir des échantillons d'eau est composé de quatre

étapes principales (Figure 2) :

- 1) l'échantillonnage tous les deux jours d'entre trois et neuf échantillons de 1L d'eau à chaque session d'échantillonnage (nombre d'échantillons environ proportionnel à la surface du marais exempte de glace) pour un total de 56 échantillons ;
- 2) la filtration de l'eau ;
- 3) l'extraction de l'ADN à partir des filtres ;
- 4) l'amplification du code-barre par PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) en triple répliquats indépendants.



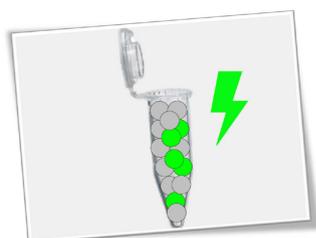
**1. Echantillonnage.** Nous avons collecté de 3 à 9 échantillons d'eau tous les deux jours du 23 mars au 12 avril dans ce marais. Aucun échantillon n'a été prélevé les 29 et 31 mars lorsque la surface de l'eau a gelé de nouveau en raison d'une chute des températures en dessous de 0°C. Tout l'équipement a été décontaminé avant et après l'échantillonnage avec une solution d'eau de Javel à 10 % puis de l'eau distillée. Les gants stériles ont été changés entre chaque échantillons d'eau. Les échantillons ont été stockés individuellement dans des sacs de congélation et transportés au frais dans une glacière jusqu'au laboratoire pour filtration.



**2. Filtration.** Les échantillons d'eau ont été filtrés dans les 6 heures suivant l'échantillonnage à l'aide d'une pompe péristaltique. Tout l'équipement de filtration a été décontaminé avant et après chaque échantillon pour éviter les contaminations.



**3. Extraction ADN.** L'ADN a été extrait de chaque filtre dans une hotte décontaminée au préalable avec une solution de javel et une exposition de 20min aux UV. L'ADN a ensuite été stocké à -20°C jusqu'à la prochaine étape.



**4. ddPCR.** La ddPCR est une technologie récente qui permet une quantification absolue de l'ADN dans un échantillon. Chaque échantillon est fractionné en environ 20 000 gouttelettes de tailles et volumes uniformes. Lors de l'amplification par PCR dans chaque gouttelette, le code-barre va émettre de la fluorescence (représenté en vert sur la figure) grâce à une sonde. Après la PCR, un logiciel quantifie la proportion de gouttelettes positives à l'ADN de la Rainette faux-grillon (i.e. gouttelettes qui émettent de la fluorescence) ce qui permet d'estimer la concentration initiale de l'ADNe dans l'échantillon.

**Figure 2.**

Protocole d'analyse de l'ADNe dans les échantillons d'eau : 1) échantillonnage du site. Le « N » indique le Nord et les bouteilles numérotées de 1 à 9 indiquent où les échantillons d'eau ont été collectés ; 2) filtration de l'eau à l'aide d'une pompe péristaltique ; 3) extraction de l'ADN ; 4) ddPCR : amplification du code-barre et quantification de la concentration de l'ADNe. Chaque disque représente une gouttelette : les gouttelettes grises sont négatives (pas d'ADN de la Rainette faux-grillon) et les gouttelettes vertes émettant de la fluorescence sont positives. L'éclair vert illustre l'émission de fluorescence.

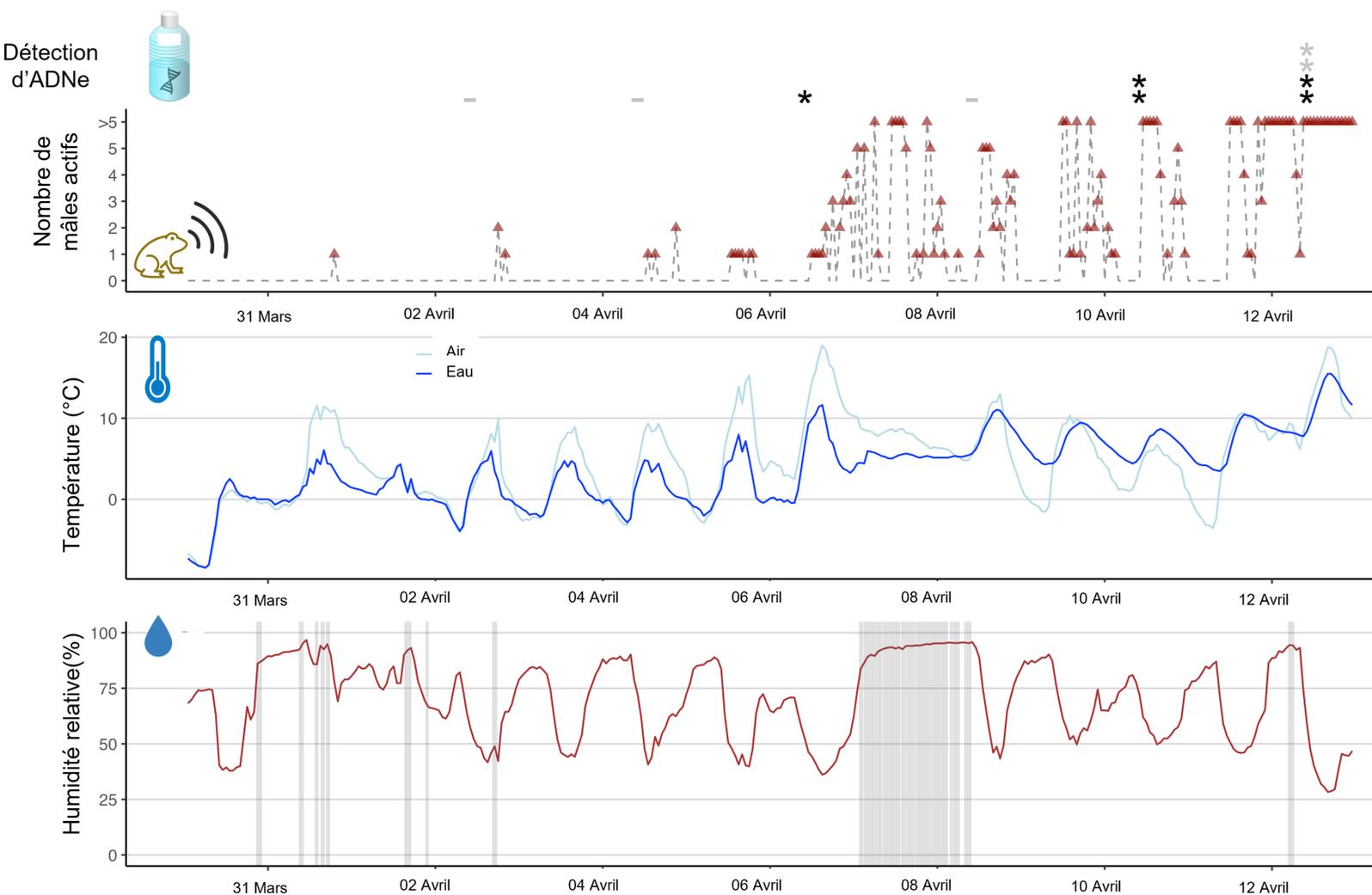
## Résultats et discussion

Bien que plus de 90 % du marais soit encore recouvert de glace (Figure 3), nous avons enregistré le premier mâle actif le 31 mars à 19h à la suite d'un après-midi pluvieux et des températures se rapprochant des 10°C (Figure 4). Les cris du mâle étaient évidents sur l'enregistreur B mais pas A ce qui suggère que le mâle a chanté près du côté Est du marais où l'eau a dégelé en premier. Aucun autre chant n'a été entendu jusqu'au 2 avril

(deux mâles enregistrés à 18h et un mâle à 20h) qui a montré des conditions météorologiques assez similaires au 31 mars (Figure 4). L'activité des mâles a ensuite été intermittente jusqu'au 12 avril à partir duquel le chœur est resté continu jours et nuits (Figure 4). Le nombre de créneaux horaires pour lesquels des cris ont été enregistrés a augmenté avec la température de l'eau ( $p < 0,001$ ) mais n'a pas été affectée par l'humidité ( $p = 0,801$ ), les précipitations ( $p = 0,236$ ) ni la vitesse du vent ( $p = 0,067$ ).



**Figure 3.** Evolution de la couverture neigeuse du site le 15 Mars, 31 Mars, 06 Avril et 12 Avril. Les photos ont été prise le matin (entre 10h et 12h) à 200m d'altitude à l'aide d'un drone.



**Figure 4.** Représentation des données ADNe (tous les deux jours en début de matinée lors de l'échantillonnage), acoustiques (toutes les heures et tous les jours) et environnementales (toutes les heures et tous les jours) du 31 mars 2022 au 12 avril 2022. « Détection d'ADNe » : un blanc indique qu'aucun échantillon d'eau n'a été collecté (31 mars - marais encore gelé), un tiret gris indique qu'aucun des échantillons d'eau n'a révélé d'ADNe de Rainette faux-grillon, une étoile noire indique un échantillon positif avec certitude et une étoile grise indique un échantillon positif avec incertitude (non concluant). « Nombre de mâles actifs » : les triangles rouges représentent le nombre de mâle actifs chaque heure. « Température (°C) » : le bleu clair représente la température de l'air et le bleu foncé la température de l'eau pour chaque heure. « Humidité relative (%) » : le rouge représente l'humidité relative pour chaque heure et les barres verticales grises indiquent les précipitations.

La première détection positive d'ADNe a eu lieu le 6 avril, soit six jours après que le tout premier mâle actif ait été enregistré par suivi acoustique (Figure 4). Ce décalage temporel entre les deux méthodes n'est pas inattendu : le premier mâle a chanté dès que le marais a commencé à dégeler et on pourrait s'attendre à ce qu'il faille du temps pour que des quantités suffisantes

d'ADN soient relâchées dans l'eau. Ceci est d'autant plus probable que la quantité d'ADNe est initialement limitée par la petite masse corporelle de cette espèce (< 1g), son comportement (utilisation de la végétation flottante), un nombre initial faible d'individus actifs dans l'eau avec des températures qui varient autour de 0°C (gel/dégel de la surface de l'eau). Les

anoures et les salamandres se reproduisant plus tard dans l'année, et/ou ayant une plus grande masse corporelle auraient probablement des taux de détection d'ADNe plus élevés (PILLIOD, GOLDBERG, ARKLE ET WAITS, 2014; GOLDBERG *et al.*, 2016; GOLDBERG, STRICKLER & FREMIER, 2018).

Le nombre d'échantillons positifs et la concentration de l'ADNe ont ensuite augmenté avec l'activité des mâles, suggérant que globalement à l'échelle du site l'ADNe pourrait être un indicateur raisonnable de la taille et de l'emplacement des mâles, et potentiellement des femelles qui ne vocalisent pas (EVERT *et al.*, 2021). Nos données d'ADNe ont également révélé des patrons spatiaux fins intéressants qui peuvent être plus difficiles à obtenir avec des enregistrements acoustiques à cause du vent ou du chevauchement des cris de mâles. Par exemple, nous avons détecté deux fois la Rainette faux-grillon du côté Est du marais (localités 3 et 5) alors qu'aux localités 1, 2, 6 et 7, aucun échantillon n'a été positif au cours de cette étude. Cette hétérogénéité au sein du site pourrait s'expliquer par une différence dans le nombre d'individus actifs (plus d'ADNe excrété dans certains localités que d'autres). Cela pourrait également s'expliquer par les propriétés lenticules du site et notamment la végétation qui peut grandement limiter la circulation de l'eau et donc d'une part réduire la dispersion de l'ADNe et d'autre part créer des différences physico-chimiques qui impacteraient la persistance de l'ADNe dans l'eau (GOLDBERG, STRICKLER & FREMIER, 2018; SHACKLETON *et al.*, 2019). Un échantillonnage spatial et temporel intensif de l'ADNe est donc nécessaire pour effectuer des relevés précis des espèces, notamment lorsque les abondances sont faibles (GOLDBERG *et al.*, 2016; GOLDBERG, STRICKLER & FREMIER, 2018).

Il est cependant important de noter que la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'eau a potentiellement mené à de faux négatifs (échantillons négatifs à la Rainette faux-grillon alors qu'elle est présente) et à une sous-estimation des concentrations d'ADNe. Les inhibiteurs de PCR, tels que les acides humiques naturellement présents dans l'eau du marais, peuvent limiter l'amplification du code-barre et/ou l'émission de fluorescence lors de la ddPCR. Les conditions météorologiques peuvent également influencer le succès de détection. Par exemple, les activités de reproduction chez certaines espèces d'amphibiens sont déclenchées par les précipitations mais nos données suggèrent que les précipitations peuvent également diluer l'ADNe et réduire les probabilités de détection. En effet, aucun ADNe de Rainette faux-grillon n'a été détecté le 8 avril, malgré une activité du chœur de mâles dans le marais la veille et un échantillon positif le 6 avril (**Figure 4**). La pluie intense de la journée et soirée de la veille pourrait avoir dilué l'ADNe déjà présent en faible quantité dans l'eau, le rendant indétectable. Ainsi, l'échantillonnage répété au fil des jours et la collecte de variables abiotiques telles que les précipitations sont importants pour interpréter les résultats (BUXTON *et al.*, 2017; AKRE *et al.*, 2019).

## Conclusion

Les suivis acoustique et d'ADNe ont montré que la saison de reproduction de la Rainette faux-grillon a commencé au tout début du printemps, lorsque la température de l'air était basse et que le marais commençait tout juste à dégeler (WHITAKER, 1971). L'approche ADNe ddPCR s'est avérée efficace pour détecter

la Rainette faux-grillon à faible abondance dans un marais peu profond, même lorsque seuls quelques mâles chantaient. Cependant, la surveillance acoustique reste la méthode la plus efficace pour étudier la phénologie de cette espèce : l'ADNe n'a pas pu révéler la présence de la Rainette faux-grillon avant ou en même temps que les enregistrements acoustiques pour de multiples potentielles raisons : faible biomasse de l'espèce, eau du marais majoritairement gelée, système lentique fragmenté par la végétation, inhibiteurs de PCR (ex. acides humiques provenant des plantes). Nos résultats impliquent cependant qu'avec une couverture d'échantillonnage spatiale suffisante, l'ADNe peut être une approche

efficace pour détecter la Rainette faux-grillon avant la ponte et l'émergence des têtards (BYLEMANS *et al.* 2016; Buxton *et al.*, 2017; DUNN *et al.*, 2017; EVERTS *et al.*, 2021) et serait une alternative intéressante pour des espèces d'amphibiens qui ne vocalisent pas ou dont les cris sont à peine perceptibles (par exemple, la Grenouille à griffes africaine *Xenopus laevis*).

## Remerciements

Un très grand merci aux co-auteurs de cette étude : Ying Chen, Haolun Tian et Stephen C. Loughheed.

L'article scientifique est en accès libre en anglais sur le site du journal PeerJ.

L'étude a été financée par une subvention à la Découverte (Conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada) et une subvention Fonds Nouvelles frontières en recherche (Conseil de recherche en sciences humaines).

Toutes les photos de drone ont été prises par Haolun Tian.

Merci à la Station Biologique de l'Université Queen's (QUBS) pour l'accès au site d'étude, à Jacqueline Monaghan pour l'accès à une machine de PCR quantitative pour des tests préliminaires, et merci à Zhengxin Sun pour ses précieux conseils sur la biologie moléculaire.

Merci beaucoup également à l'équipe d'édition et de mise en page de Plume de naturalistes !

# Bibliographie

AKRE, T. S., PARKER, L. D., RUTHER, E., MALDONADO, J. E., LEMMON, L., & ROTZEL McINERNEY, N. (2019). Concurrent visual encounter sampling validates eDNA selectivity and sensitivity for the endangered wood turtle (*Glyptemys insculpta*). *PLoS ONE*, 14(4), e0215586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215586>

BEE, M. A., COOK, J. M., LOVE, E. K., O'BRYAN, L. R., PETTITT, B. A., SCHRODE, K., & VÉLEZ, A. (2010). Assessing acoustic signal variability and the potential for sexual selection and social recognition in boreal chorus frogs (*Pseudacris maculata*). *Ethology*, 116(6), 564-576. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2010.01773.x>

BRYN, R., HALFMAERTEN, D., NEYRINCK, S., MAUVISSEAU, Q., AUWERX, J., SWEET, M., & MERGEAY, J. (2021). Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). *Journal of Fish Biology*, 98(2), 399-414. <https://doi.org/10.1111/jfb.14315>

BUXTON, A. S., GROOMBRIDGE, J. J., ZAKARIA, N. B., & GRIFFITHS, R. A. (2017). Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific reports*, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep46294>.

BYLEMANS, J., FURLAN, E. M., HARDY, C. M., MCGUFFIE, P., LINTERMANS, M., & GLEESON, D. M. (2016). An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: A case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 646-655. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12709>

CARADONNA, P. J., ILER, A. M., & INOUE, D. W. (2014). Shifts in flowering phenology reshape a subalpine plant community. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(13), 4916-4921. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323073111>

COSEPAC. (2008). COSEWIC assessment and update status report on the Western Chorus Frog *Pseudacris triseriata* Carolinian population and Great Lakes/St. Lawrence – Canadian Shield population in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. vii + 47 pp. ([www.sararegistry.gc.ca/status/status\\_e.cfm](http://www.sararegistry.gc.ca/status/status_e.cfm)).

DUNN, N., PRIESTLEY, V., HERRAIZ, A., ARNOLD, R., & SAVOLAINEN, V. (2017). Behavior and season affect crayfish detection and density inference using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 7(19), 7777-7785. <https://doi.org/10.1002/ece3.3316>.

ETHIER, J. P., FAYARD, A., SOROYE, P., CHOI, D., MAZEROLLE, M. J., & TRUDEAU, V. L. (2021). Life history traits and reproductive ecology of North American chorus frogs of the genus *Pseudacris* (Hylidae). *Frontiers In Zoology*, 18(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12983-021-00425-w>.

EVERTS, T., HALFMAERTEN, D., NEYRINCK, S., DE REGGE, N., JACQUEMYN, H., & BRYN, R. (2021). Accurate detection and quantification of seasonal abundance of American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) using ddPCR eDNA assays. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90771-w>.

FICETOLA, G. F., & MAIORANO, L. (2016). Contrasting effects of temperature and precipitation change on amphibian phenology, abundance and performance. *Oecologia*, 181(3), 683-693. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3610-9>.

GOLDBERG, C. S., TURNER, C. R., DEINER, K., KLYMUS, K. E., THOMSEN, P. F., MURPHY, M. A., SPEAR, S. F., MCKEE, A., OYLER-McCANCE, S. J., CORNMAN, R. S., LARAMIE, M. B., MAHON, A. R., LANCE, R. F., PILLIOD, D. S., STRICKLER, K. M., WAITS, L. P., FREMIER, A., K., TAKAHARA, T., HERDER, J. E., & TABERLET, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods In Ecology and Evolution*, 7(11), 1299-1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>

GOLDBERG, C. S., STRICKLER, K., & FREMIER, A. K. (2018). Degradation and dispersion limit environmental DNA detection of rare amphibians in wetlands: Increasing efficacy of sampling design. *Science of the Total Environment*, 633, 695-703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.295>

GRANT, R. A., CHADWICK, E. A., & HALLIDAY, T. (2009). The lunar cycle: A cue for amphibian reproductive phenology? *Animal Behavior*, 78(2), 349-357. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.05.007>

HIGGINS, S. A., & SWANSON, D. L. (2013). Urea is not a universal cryoprotectant among hibernating anurans: Evidence from the freeze-tolerant boreal chorus frog (*Pseudacris maculata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 164(2), 344-350. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.002>.

KLAUS, S. P., & LOUGHEED, S. C. (2013). Changes in breeding phenology of eastern Ontario frogs over four decades. *Ecology and Evolution*, 3(4), 835-845. <https://doi.org/10.1002/ece3.501>

[org/10.1002/ece3.501](https://doi.org/10.1002/ece3.501)

KLYMUS, K. E., RUIZ RAMOS, D. V., THOMPSON, N. L., & RICHTER, C. A. (2020). Development and testing of species-specific quantitative PCR assays for environmental DNA applications. *Journal of Visualized Experiments*, 165, 1-25. <https://doi.org/10.3791/61825>

LEMMON, E. M., LEMMON, A. R., COLLINS, J. T., LEE-YAW, J. A., & CANNATELLA, D. C. (2007). Phylogeny-based delimitation of species boundaries and contact zones in the trilling chorus frogs (*Pseudacris*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(3), 1068-1082. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.04.010>

LOUGHEED, S. C., LI, P., CLEMENTE-CARVALHO, R. B., CHEN, Y., HICKOX, M. K., & CAIRNS, N. A. (2020). Using Next Generation Sequencing Data to Test for Distinctiveness of Disjunct Regional Populations of Western and Boreal Chorus Frogs in Canada. [Government Report to Environment and Climate Change Canada]

LYNCH, A. J., MYERS, B. J. E., CHU, C., EBY, L. A., FALKE, J. A., KOVACH, R. P., KRABBENHOFT, T. J., KWAK, T. J., LYONS, J., PAUKERT, C. P., & WHITNEY, J. E. (2016). Climate change effects on North American inland fish populations and assemblages. *Fisheries*, 41(7), 346-361. <https://doi.org/10.1080/03632415.2016.1186016>

NITYANANDA, V., & BEE, M. A. (2011). Finding your mate at a cocktail party: Frequency separation promotes auditory stream segregation of concurrent voices in multi-species frog choruses. *PLoS ONE*, 6(6), e21191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021191>

OSPINA, O. E., VILLANUEVA-RIVERA, L. J., CORRADA-BRAVO, C. J., & AIDE, T. M. (2013). Variable response of anuran calling activity to daily precipitation and

temperature: implications for climate change. *Ecosphere*, 4(4), 1-12. <https://doi.org/10.1890/ES12-00258.1>

PILLIOD, D. S., GOLDBERG, C. S., ARKLE, R. S., & WAITS, L. P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14(1):109-16. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159>

SAENZ, D., FITZGERALD, L. A., BAUM, K. A., & CONNER, R. N. (2006). Abiotic correlates of anuran calling phenology: the importance of rain, temperature and season. *Herpetological Monographs*, 20(1), 64-82. [https://doi.org/10.1655/0733-1347\(2007\)20\[64:A-COACP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1655/0733-1347(2007)20[64:A-COACP]2.0.CO;2)

SCHALK, C. M., & SAENZ, D. (2015). Environmental drivers of anuran calling phenology in a seasonal Neotropical ecosystem. *Austral Ecology*, 41, 16-27. <https://doi.org/10.1111/aec.12281>

SHACKLETON, M. E., REES, G. N., WATSON, G., CAMPBELL, C., & NIELSEN, D. (2019). Environmental DNA reveals landscape mosaic of wetland plant communities. *Global Ecology and Conservation*, 19, e00689. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00689>

STILLMAN, J. H. (2019). Heat waves, the new normal: summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. *Physiology*, 34(2), 86-100. <https://doi.org/10.1152/physiol.00040.2018>.

VAN BUSKIRK, J., MULVIHILL, R. S., & LEBERMAN, R. C. (2009). Variable shifts in spring and autumn migration phenology in North American songbirds associated with climate change. *Global Change Biology*, 15(3), 760-761. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01751.x>

VISSER, M.E., HOLLEMAN, L.J.M. & GIENAPP, P. SHIFTS in caterpillar biomass phenology

due to climate change and its impact on the breeding biology of an insectivorous bird. *Oecologia* 147, 164–172 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0299-6>

WHITAKER JR, J. O. (1971). A study of the western chorus frog, *Pseudacris triseriata*, in Vigo County, Indiana. *Journal of Herpetology*, 5, 127-150. <https://doi.org/10.2307/1562735>

## Pour citer cet article :

**TOURNAYRE, O. 2023.** L'ADN environnemental peut-il remplacer les suivis acoustiques pour étudier la phénologie de reproduction des amphibiens ? Le cas de la Rainette faux-grillon dans l'Est du Canada. *Plume de Naturalistes* 7 : 131-142.

ISSN 2607-0510

Pour télécharger tous les articles de Plume de Naturalistes : [www.plume-de-naturalistes.fr](http://www.plume-de-naturalistes.fr)