Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2015	N°attribué par la bibliothèque

#### **THESE**

#### Pour obtenir le grade de

#### DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Ecologie et Evolution

Présentée et soutenue publiquement par

#### **Gaël DENYS**

Le 16 décembre 2015

# Taxonomie intégrative des poissons d'eau douce de France métropolitaine

Sous la direction de : Professeur Philippe KEITH et du Docteur Agnès DETTAI

JURY :

M. Feunteun Eric	Professeur, Muséum national d'Histoire naturelle, Dinard	Président
M. Brito Paulo	Professeur, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brésil	Rapporteur
M. Laffaille Pascal	Professeur des Universités, Institut National Polytechnique de Toulouse	Rapporteur
M. Persat Henri	Chargé de recherche, CNRS, Lyon	Examinateur
M. Poulet Nicolas	Chargé de mission, ONEMA, Toulouse	Examinateur
M. Keith Philippe	Professeur, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris	Directeur de thèse
Mme Dettai Agnès	Maître de conférence, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris	Directrice de thèse

#### Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, Paolo Brito, Pascal Laffaille, Eric Feunteun, Henri Persat et Nicolas Poulet pour le temps et l'attention qu'ils ont consacrés à l'examen de mes travaux. Merci également à Jean Allardi et Georges Carrel, membres de mon comité de thèse, pour m'avoir orienté dans mes recherches et prodigué de nombreux conseils.

Je remercie Guy Duhamel de m'avoir accueilli au sein du Département Milieux et Peuplements Aquatiques (DMPA), et Sylvie Dufour de m'avoir accepté à l'UMR Borea pour que je puisse y préparer ma thèse. Je remercie le Muséum national d'Histoire naturelle et l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA), m'ont permis d'obtenir un financement, ainsi que les projets SPEED-ID, Bibliothèque du Vivant, et l'ATM Génomique et collections qui m'ont permis d'effectuer mes analyses génétiques.

Eric Pasquet a accepté que j'effectue toutes les manipulations de génétique au sein du Servie de Systématique Moléculaire (SSM). Merci à lui et bien entendu à toute l'équipe de cette plateforme qui ont apporté de précieux conseils, pour leur gentillesse, et de m'avoir formé au séquençage nouvelle génération (NGS): Marie-Catherine Boisselier-Dubayle, Régis Debruyne, Céline Bonillo, Benoît Gangloff, Delphine Gey (poney de l'espace!), Josie Lambourdière, et José Utge. La hote aspirante en panne, ce n'est pas moi!

Mes remerciements les plus chaleureux vont à mes deux directeurs de thèse qui m'ont permis de donner cette chance de travailler sur un sujet aussi passionnant pour moi, passionné de poissons et de pêche à la ligne depuis plus de 20 ans. Un grand merci à Philippe Keith, d'une part de m'avoir accueilli au sein de l'équipe depuis 2008, de m'avoir donné cette opportunité de travailler sur les poissons d'eau douce de France depuis 2010, d'avoir défendu mon travail et soutenu lors des différentes réunions avec l'Onema ce qui m'a permis d'obtenir des contrats et l'opportunité pour ma thèse, de ses conseils, de sa gentillesse, de sa disponibilité, d'avoir bien voulu relire tous mes écrits (rapports, articles, etc...) dans le train. Un immense merci à Agnès Dettai, qui est plus qu'une directrice de thèse, mais aussi une amie sur qui on peut compter 7 jours sur 7 et 24 heures sur 24. Elle a

été d'un soutien dans tous les domaines au cours de cette thèse : dans les manipulations génétiques en me formant aux PCRs et nettoyages de séquences mais aussi au NGS, au point qu'il y est arrivé de faire des manipulations pour moi lorsque je manquais de temps, sa maitrise de l'écriture et de l'anglais fut d'un grand recours et m'a permis de progresser considérablement dans la rédaction, sa philosphie de « la nuit c'est fait pour corriger les articles », et son soutien psychologique n'hésitant pas à complimenter lorsque le travail était bien fait. J'associe à ces remerciements tous les autres membres de l'équipe (même ceux des collections): Alexis, Carole, Charlotte, Céline, Claude, Coco, Fabien, Fabienne, François, Fred, Gérard, Jocelyne, Justine, Laure, Maëva, Marc, Mémé (Ola! Héhéhéhé, avec qui j'ai organisé des missions pêche à la ligne), Nadia, Nicolas, Patrice, Pernelle, Philippe, Romain C., Romain S., Salomé, Valentin et Zora. Mention spéciale pour Clara et Hélène qui ont toujours été précieuses lors des moments plus difficiles, et surtout pour celle qui a partagé mon bureau pendant 2 ans, qui a apporté bonne humeur, dynamisme, soutien, et beaucoup d'échanges de vacheries en toute complicité, Marion. Enfin j'ai une pensée pour Noémie à qui moi et toute l'équipe lui apportont notre soutien.

Je remercie également Guillaume Lecointre et son équipe (Bruno, Cyril, Donald, Mario) pour leur soutien, et pour avoir organisé des réunions et d'avoir permis de travailler mon oral, avec une attention toute particulière pour Nalani et sa maîtrise naturelle de la langue de Goethe qui m'a été d'une grande aide.

Cette thèse n'aurait pu se faire sans toute la logistique qu'a apporté l'Onema et ses agents que j'ai pu rencontrer lors de mes nombreux déplacements et qui ont été chaleureux et accueillant: Katia Banyik, Jean-Pierre Bernier, Laurence Blanc, Sadek Boubekeur, Julien Bouchard, Sylvain Charbonnier, Pascal Compagnat, Patrick Fleith, Michel Goillon, Lucien Jaunard, Fabrice Laval, Francis Lorieau, Sébastien Manné, Raphaël Martin, René Martin, Sébastien Mougenez, Sandro Parussatti, Gaël Olivier, Jean-Claude Reverdi, Nicolas Roset, Michaël Sadot, Martial Thiret, Frédéric Villette (et les autres agents que j'aurais oubliés ou dont leurs noms m'est inconnu). Je remercie les fédérations de pêche du Pas-de-Calais, de la Charente, de la Gironde et des Pyrénées-Atlantique, qui m'ont permis d'obtenir du matériel et des données. Je remercie ceux qui avec qui on a partagé des moments inoubliables en me permettant de découvrir le terrain et la pêche électrique Henri Persat (la pêche dans l'Aude sous la neige), Frédéric Melki et Benjemin Adam de Biotope qui ont réalisé de superbes photos de poissons. Enfin je remercie le poissonnier du lac du

Bourget Pêcherie Parpillon qui m'a donné des carcasses de brochet gratuitement, mais aussi Bubulle et Clochette qui m'ont accueilli deux fois lors de mes missions et permis d'observer mon premier brochet aquitain.

Tous les résultats n'auraient pu se faire également sans toutes mes collaborations en France (Henri Persat (Université Lyon 1, Lyon), Damien Hinsinger (Université Paris Sud), Caroline Costedoat et Vincent Dubut (Université de Provence, Marseille)), et européenne grâce au programme FREDIE (www.fredie.eu) (Jörg Freyhof (IGB, Berlin), Matthias Geiger et Simon Walter (ZFMK, Bonn), Giovanni Delmastro (Museo Civico di Storia Naturale, Carmagnola), Ignacio Doadrio et Silvia Perea (MNCN, Madrid). De même je remercie les différents musées et leurs gestionnaires de collections qui m'ont prêté des spécimens et envoyé des photos : Université de Lyon 1 Claude Bernard (UCBLZ), Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN) de Madrid, British Museum of Natural History (BMNH) de Londres, Linnean Society of London (LINN), Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig (ZFMK) de Bonn, Fischsammlung Jörg Freyhof (FSJF) de Berlin, Naturhistoriska riksmuseet (NRM) de Stockholm, Royal Ontario Museum (ROM) de Toronto, Národní Museum (NM) de Prague, Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences (ZIN) de Saint-Petersbourg, Université de Washington (UW).

Parce qu'il est bon de temps en temps à penser à autre chose que la thèse, et ceci n'a été possible sans les amis : Alexandre, Arnaud, Catheline, Céline, Christelle, Clémence, Damien, David D., David. G., Emilia, Emilie, Gaël, Gregory, Guillaume, Lara, Laurent, Lucile, Marion, Maxime, Nathalie, Pauline, Sébastien, Thomas, Victoria, Yann.

Enfin il serait impossible de ne pas penser à la famille qui a été présente du début à la fin, et qui doit être fière que je réussisse à faire de ma passion mon métier.

A mon arrière grand-mère, mes grands-parents Pierre et Denize, mes oncles Marcel et Jackie et Jacques

### Sommaire

Liste des figures et tableaux	13
Avant-Propos	17
INTRODUCTION	21
INTRODUCTION	
Historique des différents inventaires ichtyofaunistiques en France métropolitair	
De l'Antiquité à la Renaissance : La découverte de l'ichtyologie	
1758-1850 : Un siècle des Lumières en taxonomie	
1860-1890 : Les Trente Glorieuses en ichtyologie	
Spillmann: La Restauration.	23
Années 2000 : Révolution taxonomique et redécouverte de notre	
ichtyofaune	
Contexte biogéographique des bassins versants français	
L'Oligocène (-33,9 à -23,3 Ma) : les fondations	
Le Miocène (-23 à -5,3 Ma) : mise en place de l'ichtyofaune actuelle	
Le Pliocène (-5,3 à -2,5 Ma) : Mise en place de l'isolation des bassins	
Le Pléistocène (-2,5 Ma à -12 000 ans) : l'Âge de Glace	
L'Holocène (12 000 a à aujourd'hui) : et l'Homme arriva	
Les provinces biogéographiques	
La théorie des îles ou « The Island Theory »	
La notion d'espèce	
Plusieurs définitions de l'espèce	
Le concept biologique	
Le concept écologique	
Le concept évolutif	
Le concept phénotypique	
Le concept phylogénétique	49
Le concept phénétique	
Le concept génotypique	50
Quelle définition choisir ?	50
La taxonomie intégrative	54
Les objectifs de la thèse	56
CHAPITRE 1: STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE ET METHODOLOGIE	
Taxons d'étude	
Le chevesne (Squalius cephalus sensu Keith & Allardi, 2001)	
Le vairon ( <i>Phoxinus phoxinus sensu</i> Keith & Allardi, 2001)	
Le goujon (Gobio gobio sensu Keith & Allardi, 2001)	
Le brochet (Esox lucius sensu Keith & Allardi, 2001)	
L'épinoche (Gasterosteus aculeatus sensu Keith & Allardi, 2001)	
Echantillonnage	
La pêche électrique.	
La pêche à la ligne	
Conservation	
Gestion des données.	
Taxonomie intégrative	79

Morphologie	80
Génétique	.82
Les marqueurs employés	82
L'extraction d'ADN	
Amplification des fragments de gène à partir de l'ADN génomique	ıe
Séquençages	86
, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	
	88
	0.1
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Connaissances naturalistes	95
CHAPITRE 2 · CONFIRMATION D'ESPECES DECRITES RECEMMENT · LE C	' <i>A.</i> S
total Séquençages	
CHAPITRE 3 : DE L'UTILITE DES DONNEES MOLECULAIRES : LE CAS DES	!
EPINOCHES GASTEROSTEUS SPP1	09
Préambule1	10
Invalidité de Gasterosteus gymnurus (Cuvier, 1829) (Actinopterygii,	
Gasterosteidae) confirmée par la taxonomie intégrative1	.12
Discussion.	118
Conclusion.	121
	100
	124
1 10 /	126
<u>.</u>	
Molecular study	
Results	
Morphological variability among French pikes	
Molecular evidence of a new species of pike in the South West of	
France	
Molecular confirmation of Esox cisalpinus in France in the 19th	1 ) /
century	140
OUILUI Y	140

Diagnostic description of the Aquitanian pike Esox aquitanicus sp. nov	
Types and comparative material	141
Diagnosis	.143
Description	144
Comparison with closely related species	
Color in life	
Color in preservation	
Ecology and notes on biology	
Distribution	
Etymology	
Molecular reference.	
Discussion	
Evidence for three species of pike in France	
Hybridization with the Northern pike	
Biogeography and conservation	
Conclusion	
CHAPITRE 5 : DE L'UTILITE DES ROBES NUPTIALES : LE CAS DES VAIRO	NS
PHOXINUS SPP	159
Préambule	160
Révision taxonomique des vairons de France Phoxinus spp. (Actinopterygii,	
Cyprinidae) selon une approche de taxonomie intégrative : évidence d'une	
spéciation par sélection sexuelle?	163
Introduction	.164
Matériels et méthodes	167
Echantillonnage	167
Génétique	
Résultats	170
Identifications morphologiques	170
Taxonomie moléculaire	
Comparaison des robes nuptiales	174
Discussion	
L'apport des données moléculaires	183
Variabilité des robes nuptiales	
Six espèces de vairons en France	
Conclusion.	
CHAPITRE 6 : DE L'UTILITE DE L'ECOLOGIE : LE CAS DES GOUJONS GO	BIO
SPP	
Préambule	192
Intégrer les récentes découvertes taxonomiques dans les études en écologie, un	e
évidence ; l'exemple des goujons de France Gobio spp. (Actinopterygii,	
Cyprinidae)	195
Introduction	
Matériel et méthodes	198
Echantillonnage	198
Analyses génétiques	
Etude préliminaire des niches écologiques	
Résultats	
	203

ANNEXES	287
GLOSSAIRE	283
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	249
Impacts sur la conservation.	241
Etat actuel de nos connaissances sur l'ichtyofaune française	
Un taxon vicariant : l'épinoche	
Un taxon secondaire: les brochets	
Les vairons.	
Les goujons	
Les chevesnes.	
Les taxons primaires.	232
De la taxonomie à l'explication phylogéographique	232
de France	
Application de l'approche de taxonomie intégrative pour les poissons d'eau de	
CHAPITRE 7 : SYNTHESE ET CONCLUSION	227
Conclusion.	226
Impact sur l'écologie et la conservation des goujons en France.	
Validation de trois espèces de goujons <i>Gobio</i> spp en France	
Etude préliminaire des niches écologiques	
Identifications des goujons Gobio spp en France	
Discussion	
Etude préliminaire des niches écologiques	213
Identification moléculaire	204

## Liste des figures et tableaux

II	VTRODUCTION	
	Figure 1 : Evolution du nombre d'espèces inventoriées de poissons d'eau douce de	
	France au cours du temps	24
	Tableau 1 : Liste des changements taxonomiques apportés par Kottelat & Freyhof	
	(2007) par rapport à Keith & Allardi (2001).	26
	Figure 2 : Le bassin de la Seine comprenant le fleuve Seine et ses principaux	
	affluents	29
	Figure 3 : Les 8 principaux bassins versants de France métropolitaine auxquels	
	s'ajoutent l'Aude et la Têt	30
	Figure 4 : L'Europe à l'Oligocène	32
	Figure 5 : La France au Miocène	34
	Figure 6 : Le réseau hydrographique principal au début du Pliocène	37
	Figure 7 : Réseau hydrographique français au cours des glaciations du Pléistocène	
	Figure 8 : Les provinces biogéographiques des poissons d'eau douce français	42
	Figure 9 : Représentation des bassins versants français sous la forme «d'îles »	
	rassemblées en « archipels »	45
	Figure 10 : Représentation schématique des congruences observées en taxonomie	
	intégrative	55
$C_{I}$	HAPITRE 1 : STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE ET METHODOLOGIE	
	Figure 1.1 : Le chevesne.	
	Figure 1.2 : Carte de répartition du chevesne.	
	Figure 1.3 : Le vairon.	
	Figure 1.4 : Carte de répartition du vairon.	
	Figure 1.5 : Le goujon.	
	Figure 1.6 : Carte de répartition du goujon.	
	Figure 1.7 : Le brochet.	
	Figure 1.8 : Carte de répartition du brochet.	
	Figure 1.9: L'épinoche.	
	Figure 1.10 : Carte de répartition de l'épinoche	
	Figure 1.11 : Localisations des stations d'échantillonnages	
	Figure 1.12 : Scène de pêche électrique organisée par l'Onema dans le Beuvron	
	Figure 1.13 : Brochet capturé à la ligne dans la Boutonne	'/4
	Figure 1.14: Mise en place du chantier pour photographier les vairons en robe	-
	nuptiale	/(
	Tableau 1.1 : Synthèse de la quantité de données générées en morphologie et en	
	génétique sur les 5 genres d'étude	
	Figure 1.15 : Schéma expliquant les relations entre la base de données NEWSP avec	
	base de donnée du Barcode of Life BOLD et celle des collections d'ichtyologie d	
		77
	Figure 1.16 : Schéma des relations entre les différentes tables de la base de données	70
	NEWSP créée pour gérer les données.	/8
	Figure 1.17 : Schéma protocolaire de l'approche de taxonomie intégrative par	70
	congruence.	79
	Figure 1.18 : Principales mesures et comptes d'écailles effectués lors des analyses	0.1
	marna_mericuales	Ω1

Tableau 1.2 : Amorces utilisées pour l'amplification des marqueurs	
CHAPITRE 2 : CONFIRMATION D'ESPECES DECRITES RECEMMENT : LE CAS	S
DES CHEVESNES SQUALIUS SPP	
Figure 2.1: le chevesne catalan <i>Squalius laietanus</i> 9	-
Figure 2.2: Bouche subterminale du S. laietanus, bouche terminale du S. cephalus9	
Figure 2.3: Pigmentation des écailles du flanc chez S. laietanus, et chez S. cephalus99	9
Figure 2.4: Location of the 32 sampling sites, showing the presence of <i>Squalius</i>	
cephalus haplotype and S. laietanus	4
Figure 2.5: Bayesian tree of the cytochrome c oxidase subunit I	5
CHAPITRE 3 : DE L'UTILITE DES DONNEES MOLECULAIRES : LE CAS DES	
EPINOCHES GASTEROSTEUS SPP	
Figure 3.1: Distribution des différentes formes d'épinoches européennes11	1
Figure 3.2: Geographical distribution of the vouchers used in the analysis in polar view	5
Figure 3.3: Line drawings of Gasterosteus aculeatus and G. gymnurus	
Figure 3.4: Bayesian tree of the cytochrome c oxidase subunit I for 194 individuals of	
Gasterosteus spp and other gasterosteids	7
CHAPITRE 4 : DE L'UTILITE DES COLLECTIONS : LE CAS DES BROCHETS	
ESOX SPP	
Figure 4.1: Esox cisalpinus à la robe vermiculée de la gravière Escosa (a), avec des	
bandes longitudinales de la gravièe Fontane (b); Esox lucius du Rhône avec une rob	
tachetée (c)12	.5
Figure 4.2 : Arbre de Neighbor-joining basé sur les distances génétiques de Cavalli-	
Sforza sur des marqueurs microsatellites entre différentes populations de brochet	_
françaises et européennes	25
Table 4.1: Sampling sites and GenBank accession numbers for COI and Plag12	
sequences of the French individuals	
Table 4.2: Samples from historical collections selected for molecular work	
Figure 4.3: a) Bayesian tree of the cytochrome c oxidase subunit I for 140 individuals of	)[
Esox lucius and other esocids; b) Bayesian tree of the pleiomorphic adenoma gene-	
like 2 alleles for 53 French esocids.	8
Table 4.3: Diagnostic sites and probable hybrids for the Pleiomorphic adenoma gene-	Λ
like 2 sequences of the 52 individuals of French pikes	
Figure 4.4: Barcoding NJ K2P tree of 131 bp of the COI marker on 136 individuals of	
Esox lucius and other esocids, including 5 from historical collections	
Figure 4.5: Holotype of <i>Esox aquitanicus</i> alive (a), and after fixation in formalin (b).14	
Figure 4.6: Head profile showing the difference in snout size of two juveniles caught in	
July of their birth year at one day interval	
Figure 4.7: Boxplot representing the total number of scales on lateral line of <i>Esox</i>	IJ
aquitanicus, E. cisalpinus, and E. lucius14	6
Figure 4.8: Occurences of Esox aquitanicus and E. lucius in the South West of	
France14	19
Table 4.5: DNA sequences of COI and Plagl2 and vouchers characterizing Esox	
aquitanicus15	0

	Figure 4.9: Arbre phylogénétique par inference bayésienne de génomes mitochondriaux
	de brochets, incluant 16 E. lucius, 6 E. aquitanicus et 4 E. cisalpinus, avec datation
	moléculaire calibrée avec des fossiles
	UADITDE 5. DE L'HITH ITE DEC DADEC MUDTIALEC. LE CAC DEC VAIDANC
U	HAPITRE 5 : DE L'UTILITE DES ROBES NUPTIALES : LE CAS DES VAIRONS PHOXINUS SPP
	Figure 5.1 : <i>Phoxinus bigerri</i> (a), <i>Phoxinus septimaniae</i> (b), <i>Phoxinus phoxinus</i> (c)161
	Figure 5.2 : Profil de tête avec un museau busqué caractéristique de <i>Phoxinus bigerri</i>
	(a), alors que chez <i>P. phoxinus</i> et <i>P. septimaniae</i> le museau est droit (b)
	Figure 5.3 : Nageoire anale convexe caractéristique de <i>Phoxinus bigerri</i> (a), alors que
	chez P. phoxinus et P. septimaniae leur nageoire anale est droite voire concave
	(b)
	Figure 5.4 : Plastron écailleux sous la gorge entre les nageoires pectorales
	caractéristique de <i>Phoxinus septimaniae</i> (a), alors que <i>P. phoxinus</i> et <i>P. bigerri</i>
	présentent 2 blocs d'écailles à l'insertion des nageoires pectorales (b)
	Tableau 5.1 : Quelques descriptions de robes nuptiales de vairons trouvées dans la
	littérature, regroupées par bassin
	Figure 5.5 : Stations d'échantillonnage de vairons <i>Phoxinus</i> spp
	Tableau 5.2 : Matrice de p-distances entre les différents groupes d'haplotypes de
	<i>Phoxinus</i> spp
	Figure 5.6 : Arbre phylogénétique par inférence bayésienne avec le marqueur du
	cytochrome c oxidase sous-unité I pour 212 haplotypes de vairons européens
	Phoxinus spp selon un modèle de substitution GTR+I+G
	Figure 5.7 : Robes nuptiales de vairons du bassin du Rhin
	Figure 5.8 : Robes nuptiales de vairons du bassin de la Seine
	Figure 5.9 : Robes nuptiales de vairons des bassins du Rhône et méditerranéens178
	Figure 5.10 : Robes nuptiales de vairons des bassins de la Loire et de la Charente179
	Figure 5.11 : Robes nuptiales de vairons des bassins de la Garonne et de la
	Dordogne
	Figure 5.12 : Robes nuptiales de vairons du bassin de l'Adour
	Tableau 5.3 : Liste des états de caractères liés aux robes nuptiales des 6 espèces de vairons
	Figure 5.13 : Carte de répartition des populations natives des 6 espèces de vairons
	Phoxinus spp en France métropolitaine
	Thomas spp on Trance metropoliume
Cl	HAPITRE 6 : DE L'UTILITE DE L'ECOLOGIE : LE CAS DES GOUJONS GOBIO
	SPP
	Figure 6.1 : Gobio gobio (a), Gobio alverniae (b), Gobio lozanoi (c), Gobio occitaniae
	(d)194
	Figure 6.2 : Diagramme illustrant la proportion de publications traitant d'écologie,
	d'écotoxicologie ou de parasitologie de goujons français et la prise en compte ou non
	les travaux de taxonomie de Kottelat et Persat (2005)
	Figure 6.3 : Stations d'échantillonnage de goujons
	Figure 6.4 : Arbre phylogénétique par inférence bayésienne avec le marqueur du
	cytochrome c oxidase sous-unité I pour 144 individus de goujons <i>Gobio</i> spp selon un
	modèle de substitution GTR+I+G
	Tableau 6.1 : Alignement des haplotypes et les bases diagnostiques de séquences de
	rhodopsine représentatifs des différents taxons appartenant au genre Gobio206

	de la Rhodopsine pour 116 allèles représentant 165 individus de goujons <i>Gobio</i> spp
	selon un modèle de substitution GTR+I+G207
	Figure 6.6 : Arbre phylogénétique par inférence bayésienne avec le marqueur de la
	protéine ribosomale S7 pour 165 individus de goujons Gobio spp selon un modèle de
	substitution HKY
	Tableau 6.2 : Alignement des haplotypes de séquences de S7 représentatifs des
	différents taxons appartenant au genre <i>Gobio</i>
	Figure 6.7 : Les deux premiers axes de l'analyse OMI et les pondérations canoniques
	des variables environnementales considérées
	Figure 6.8 : Distribution des 152 stations dans une espace bidimensionnel défini par
	1'analyse OMI215
	Figure 6.9 : Distribution des 48 taxons dans une espace bidimensionnel défini par
	l'analyse OMI. Les points gris représentent les stations
	Tableau 6.3 : Composition, nombre de sites et paramètres d'analyse outilying mean
	index pour les 4 espèces de goujons de Kottelat et Persat (2005) recensées sur 152
	stations Onema en France
	Figure 6.10 : Diagramme représentant les niches occupées par les 4 espèces de goujons
	de Kottelat et Persat (2005)218
	Figure 6.11 : Schéma illustrant les identifications morphologiques et moléculaires des
	goujons observés sur le bassin de la Loire
CE	HAPITRE 7: SYNTHESE ET CONCLUSION
	Tableau 7.1 : Liste des changements taxonomiques apportés par cette thèse par rapport à
	l'Atlas des poissons d'eau douce de France de Keith & Allardi (2001) et au catalogue
	des poissons d'eau douce européens de Kottelat et Freyhof (2007)
	Figure 7.1 : Cartes de répartition des populations natives des 5 genres étudiés lors de
	cette thèse237
	Figure 7.3 : Histogrammes représentant le nombre d'espèces de poissons d'eau douce
	présentes dans les différents bassins et sous-bassins de France métropolitaine (a),
	ainsi que les pourcentages en espèces natives (b), et les pourcentages en espèces
	endémiques françaises par rapport aux natives (c)
	Tableau 7.2 : Tableau listant les différentes espèces de poissons d'eau de France avec
	leurs distributions suivant les données de Keith et al. (2011a) et de cette thèse245

#### **Avant-Propos**

L'ensemble des travaux a été réalisé grâce à une convention 2013-2015 entre l'Office National de l'Eau et de Milieux Aquatiques (ONEMA) et le Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN). Il a été soutenu par le MNHN et l'UMR 7208 Borea.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont été valorisés ou sont en cours de valorisation par des publications scientifiques, et ont fait l'objet de diverses présentations orales et posters lors de congrès nationaux et internationaux. J'ai aussi participé à l'encadrement d'étudiants.

#### **Publications**

- HINSINGER D.D., DEBRUYNE R., THOMAS M., **DENYS G.P.J.**, MENNESSON M., UTGE J. & DETTAI A., 2015. Fishing for barcodes in the Torrent: from COI to complete mitogenomes on NGS platforms. *DNA Barcodes*, 3: 170-186.
- **DENYS G.P.J.**, GEIGER M.F., PERSAT H., KEITH P. & DETTAI A., 2015. Invalidity of *Gasterosteus gymnurus* (Cuvier, 1829) (Actinopterygii, Gasterosteidae) according to integrative taxonomy. *Cybium*, 39: 37-45.
- **DENYS G.P.J.**, DETTAI A., PERSAT H., HAUTECŒUR M. & KEITH P., 2014. Morphological and molecular evidence of three species of pikes *Esox* spp. (Actinopterygii, Esocidae) in France, including the description of a new species. *C. R. Biol.*, 337: 521-534.
- GEIGER M.F., HERDER F., MONAGHAN M.T., ALMADA V., BARBIERI R., BARICHE M., BERREBI P., BOHLEN J., CASAL-LOPEZ M., DELMASTRO G., **DENYS G.P.J.**, DETTAI A., DOADRIO J.I., KALOGIANNI E., KÄRST H., KOTTELAT M., KOVACIC M., LAPORTE M., LORENZONI M., MARČIĆ Z., ÖZULUG M., PERDICES A., PEREA S., PERSAT H., PORCELOTTI S., PUZZI C., ROBALO J., SANDA R., SCHNEIDER M., ŠLECHTOVÁ V., STUMBOUDI M., WALTER S. & FREYHOF J., 2014. Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Mol. Ecol. Res.*, 14: 1210-1221.
- **DENYS G.P.J.**, DETTAI A., PERSAT H., DOADRIO I., CRUAUD C. & KEITH P., 2013. Status of the Catalan chub *Squalius laietanus* (Actinopterygii, Cyprinidae) in France: input from morphological and molecular data. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.*, 408 (4): 1-14.

#### Publications en cours de préparation

- **DENYS G.P.J.**, DETTAI A., PERSAT H., POULET N., CRUAUD C. & KEITH P., *in prep.* Should recent taxonomical discoveries be not included into ecological studies? An example with French gudgeons *Gobio* spp (Actinopterygii, Cyprinidae).
- **DENYS G.P.J.**, DETTAI A., GEIGER M.F., WALTER S., PERSAT H., DELMASTRO G.B., HAUTECŒUR M. & KEITH P., *in prep.* Taxonomical review of French minnows *Phoxinus* spp (Actinopterygii, Cyprinidae) according to integrative taxonomy: Is there a speciation by sexual selection?
- HINSINGER D.D., **DENYS G.P.J.**, DAVESNE D., DEBRUYNE R., DELMASTRO G.B., KEITH P., PERSAT H., UTGE J. & DETTAI A., 2015. West pike story: a

dated phylogeography of European *Esox* spp (Actinopterygii, Esocidae). DNA Barcodes

#### **Communications orales**

- **DENYS G.P.J.**, DETTAI A., PERSAT H., HAUTETCOEUR M. & KEITH P., 2015. Un brochet en France peut en cacher deux autres. 116e Journées annuelles de la Société Zoologique de France. 16-17 septembre 2015, Bordeaux.
- DETTAI A., HINSINGER D.D., AUVINET J., **DENYS G.P.J.**, GALLUT C. & DEBRUYNE R., 2015. What mitogenomics brings for antarctic fish systematics and evolution. XV European congress of ichthyology. 7-11 septembre 2015, Porto.
- **DENYS G.P.J.**, HINSINGER D.D., DAVESNE D., DEBRUYNE R., DELMASTRO G.B., KEITH P., PERSAT H., UTGE J. & DETTAI A., 2015. West Pike's Story: a dated phylogeography of Esox spp. (Actinopterygii, Esocidae). XV European congress of ichthyology. 7-11 septembre 2015, Porto.
- PERSAT H., **DENYS G.P.J.**, DETTAI A. & KEITH P., 2015. The freshwater fish fauna history between Rhine and Ebro: general considerations and comments from on-going developments in fish taxonomy. XV European congress of ichthyology. 7-11 septembre 2015, Porto.
- **DENYS G.P.J.**, HINSINGER D.D., DAVESNE D., DEBRUYNE R., DELMASTRO G.B., KEITH P., PERSAT H., UTGE J. & DETTAI A., 2015. La « West Pike Story » des brochets de France Esox spp. (Actinopterygii, Esocidae) apportée par la mitogénomique. 6èmes Rencontres de l'Ichtyologie en France. 24-27 mars 2015, Paris
- DETTAI A., **DENYS G.**, HINSINGER D., THOMAS M., MENNESSON M., GALLUT C., UTGE J., KEITH P., LECOINTRE G. & DEBRUYNE R., 2014. Mitogénomique et multiplexage individual sur le PGM. Journée scientifique ATM Génomique & Collections. 17 novembre 2014, Paris.
- **DENYS G.**, DETTAI A. & PERSAT H., 2012. Révision des Cyprinidae de France: morphologie versus taxonomie moléculaire. 5èmes Rencontres de l'Ichtyologie en France. 27-30 mars 2012, Paris.

#### **Posters**

- BONILLO C., LAMBOURDIERE J., GEY D., **DENYS G.P.J.**, MENNESSON M., THOMAS M., HINSINGER D., DETTAI A. & DEBRUYNE R., 2015. Optimisation opérationnelle et économique du multiplexage en NGS par une approche de double parallélisation. 3<sup>ème</sup> Colloque de Génomique Environnementale. 26-28 octobre 2015, Montpellier.
- **DENYS G.P.J.**, DETTAI A., PERSAT H., DOADRIO I. & KEITH P., 2013. Le statut du chevesne catalan *Squalius laietanus* (Actinopterygii, Cyprinidae) en France: apport des données morphologiques et moléculaires. Assemblée générale de la Société Française d'Ichtyologie. 14-15 mai 2013, Perpignan.
- **DENYS G.P.J.**, DETTAI A., PERSAT H., DOADRIO I. & KEITH P., 2013. Le statut du chevesne catalan *Squalius laietanus* (Actinopterygii, Cyprinidae) en France: apport des données morphologiques et moléculaires. Colloque de Génomique Environnementale. 4-6 novembre 2013, Rennes.

#### **Encadrement**

Pendant ma première année de thèse, j'ai co-encadré un lycéen en 1ère S (stage d'une semaine), avec Clara Lord. Je lui ai montré comment on pouvait réaliser des mesures morpho-méristiques sur des brochets. Durant ma troisième année de thèse, j'ai encadré une stagiaire en 1ère année de master « Systématique, Evolution et Paléontologie », Justine Fesquet, sur la variabilité morphologique des épinochettes de France *Pungitius* spp. grâce à la méthode de morphométrie géométrique. Je participe également à la formation en génétique et en taxonomie des autres doctorants de l'équipe.

# **INTRODUCTION**

# Historique des différents inventaires ichtyofaunistiques en France métropolitaine

« La connaissance des poissons, née de l'habitude de s'en nourrir, a dû être l'une des premières qu'acquirent les hommes », c'est ainsi que Cuvier et Valenciennes (1828) expliquèrent la naissance de l'ichtyologie. Ce fut le philosophe grec Aristote (383-322 avant J.C.), passionné de zoologie, qui écrivit les premiers textes sur les poissons en consacrant trois ouvrages à la faune aquatique, et donna naissance à l'ichtyologie européenne (Kottelat, 1998).

L'histoire des inventaires des poissons d'eau douce de France a connu plusieurs phases et évènements marquants.

#### De l'Antiquité à la Renaissance : La découverte de l'ichtyologie

Le premier inventaire remonte à l'Antiquité, avec le poète latin Ausonius (310-333) qui décrit 15 espèces de poissons de la Moselle comme le barbeau ou la truite. Puis il faut attendre la Renaissance avant d'avoir deux nouveaux inventaires de Belon (1555) et de Rondelet (1558) décrivant chacun une trentaine d'espèces de nos eaux douces françaises et donnant des informations sur leurs distributions. Baldner (1666) a fourni une des premières listes exhaustives de l'ichtyofaune du Rhin à Strasbourg (Reiber, 1888; Allgayer, 1991). Néanmoins ces descriptions, comme toutes celles réalisées par les naturalistes de l'époque dans le reste de la zoologie, étaient peu précises et parfois ambigües.

#### 1758-1850 : Un siècle des Lumières en taxonomie

Afin d'améliorer ceci, un code de nomenclature universel établissant les règles de la taxonomie (ou taxinomie) fut instauré par Linnaeus (1758). Chaque espèce porte un nom binomial latin, et dont la description fait référence à un (ou plusieurs) spécimen(s) appelé(s) « type(s) porte-nom » et déposé(s) en collection dans les musées (Ride *et al.*, 1999). Ainsi, Linnaeus (1758), puis Cuvier et Valenciennes (1828-1849) ont décrit à eux seuls au cours du XVIIIème et XIXème siècle, 51 espèces de poissons peuplant les rivières

françaises. Durant cette période, d'autres naturalistes décrivirent également d'autres espèces en France tels que la lamproie de Planer, le spirlin, la bouvière (Bloch, 1785-1797), l'athérine, le barbeau méridional, le blageon et quatre autres espèces de mulet (Risso, 1810; 1826) ou le toxostome (Vallot, 1837).

#### 1860-1890 : Les Trente Glorieuses en ichtyologie

La seconde moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle et la première moitié du XXème ont été marquées par les premiers inventaires faunistiques précis (Desvaux, 1851; Blanchard, 1866; Gervais & Boulard, 1876-1877; 1897; Moreau 1881-1891; 1892; Acloque, 1896-1900; Raveret-Wattel, 1900; Roule, 1925; Perrier, 1934; Angel, 1948; Dottrens, 1951-1952; Duborgel, 1955). Durant cette période, de nombreuses espèces non natives telles que la truite arc-en-ciel, l'omble de fontaine, les saumons du Pacifique, le black-bass, divers espèces de corégones, le crapet de roche, le sandre ou la gambusie ont été introduites pour la pêche de loisir, l'aquaculture ou la curiosité scientifique (Keith *et al.*, 1992; Keith & Allardi, 2001; Persat & Keith, 2011). Autre point important, à cette époque, certains naturalistes interprétaient les variations morphologiques entre les individus comme des espèces différentes, décrivant ainsi plusieurs espèces de brèmes, de vandoises, de truites, d'épinoches ou d'épinochettes; leurs inventaires dénombraient entre 80 et 98 espèces (Desvaux, 1851; Blanchard, 1866; Gervais & Boulard, 1876-1877; 1897).

#### Spillmann : La Restauration

La seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle a été marquée par l'œuvre de Spillmann (1961). Ce dernier a réalisé une révision exhaustive des espèces présentes à cette époque, et a relevé notamment plusieurs problèmes taxonomiques. Comme Roule (1925), Spillmann considérait la truite de rivière, la truite de mer et la truite de lac comme une seule et même espèce très polymorphe *Salmo trutta* Linnaeus 1758, mais les distinguait comme des sous-espèces. De même, il a observé les différentes formes régionales de corégones, chevesnes et vandoises. Reconnaissant le polymorphisme de ces taxons, il ne valide que trois espèces de corégones, une de chevesne *Leuciscus cephalus* (Linnaeus, 1758) et une de vandoise

Leuciscus leuciscus (Linnaeus, 1758). Il réduisit ainsi à 55 le nombre d'espèces de poissons d'eau douce en France.

Trente ans plus tard, Allardi et Keith (1991) puis Keith et Allardi (2001), ayant l'ambition de cartographier de façon précise la répartition des espèces à travers toute la France, entreprirent l'élaboration de l'Atlas des poissons d'eau douce de France (voir aussi Allardi *et al.*, 1997). Ils intégrèrent les espèces natives limitées par Spillmann (1961) ainsi que des espèces non natives (par exemple le silure, le pseudorasbora ou l'aspe). Ils élevèrent le nombre d'espèces dans la faune ichtyologique dulçaquicole française à 73, puis à 83 dans les années 2000, en incluant également une espèce nouvelle, le chabot du Lez *Cottus petiti* Bacescu & Bacescu-Mester, 1964 (Billard, 1997; Keith et Allardi, 2001).

L'ensemble de ces événements sont figurés sur la Figure 1.

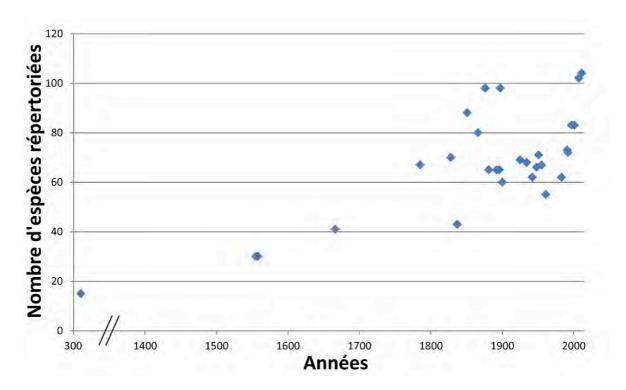


Figure 1: Evolution du nombre d'espèces inventoriées de poissons d'eau douce de France au cours du temps. Sources: Ausonius (310-333), Belon (1555), Rondelet (1558), Baldner (1666), Bloch (1785-1797), Cuvier et Valenciennes (1828-1849), Vallot (1837), Desvaux (1851), Blanchard (1866), Gervais et Boulard (1876-1877; 1897), Moreau (1881-1891; 1892), Acloque (1896-1900), Raveret-Wattel (1900), Roule (1925), Perrier (1934), Kreitmann (1942), Angel (1948), Dottrens (1951-1952), Duborgel (1955), Spillmann (1961), Grégoire (1983), Allardi et Keith (1991), Maurin et Duquet (1992), Billard (1997), Keith et Allardi (2001), Kottelat et Freyhof (2007), Keith et al. (2011a).

Mais alors que l'on croyait la taxonomie des poissons d'eau douce français ou européens connue et stabilisée, les années 2000 ont bouleversé les connaissances sur notre ichtyofaune.

# Années 2000 : Révolution taxonomique et redécouverte de notre ichtyofaune

La fin des années 90 et les années 2000 ont été marquées par le développement d'outils qui ont révolutionné le travail du chercheur, à commencer par l'informatique. En effet, avec le temps, les ordinateurs sont devenus de plus en plus performants, et de plus en plus accessibles. Ainsi, des données plus importantes peuvent être stockées, traitées et soumises à des analyses complexes. De même, des images, vidéos et autres supports ont pu être exploitées comme données numérisées, offrant ainsi d'autres possibilités pour les analyses morphologiques comme la morphométrie géométrique (Bookstein, 1991; Rohlf & Marcus, 1993).

Mais l'outil qui a révolutionné la systématique fut la génétique et l'analyse des séquences d'ADN (e.g. Avise, 1994) qui a supplanté l'étude de différences des allozymes (Avise, 1975). La taxonomie moléculaire a ouvert de nouvelles perspectives (Tautz *et al.*, 2003).

En plus de jeux de données générés lors d'études diverses, de grands programmes en ichtyologie, comme FishTrace (Sevilla *et al.*, 2007) et surtout FISH-BOL (Ward *et al.*, 2005, 2009) ont constitué des bases de référence moléculaire permettant de réaliser des identifications moléculaires : le barcoding. Des projets spécifiques de la faune d'eau douce européenne (FREDDIE ; Geiger *et al.*, 2014) ont trouvé leur place au sein des projets plus larges comme le Barcode of Life (Hebert *et al.*, 2003). Si ces outils avaient pour vocation première l'identification, les jeux de données assemblés, d'une ampleur et d'une précision sans précédent, ont après réanalyse permis de ré-évaluer les connaissances sur la taxonomie des groupes. Désormais l'outil génétique est un outil complémentaire indispensable en systématique.

Kottelat et Freyhof (2007), dans la continuité du travail de Kottelat (1997), ont synthétisé tous les travaux réalisés en morphologie et en génétique pour établir une révision complète de tous les taxons de poissons d'eau douce européens, en tenant compte

de la biogéographie des bassins versants, et en suivant le concept évolutif de l'espèce (détaillé plus loin; Wiley & Mayden, 2000). Ainsi, les sous-espèces valides et des lignées génétiques ont été élevées au rang spécifique (*i.e. Gambusia affinis holbrooki* devient *Gambusia holbrooki* Girard, 1859; la truite de lignée méditerranéenne devient *Salmo rhodanensis* Fowler, 1974). Pour d'autres taxons comme l'épinoche ou l'épinochette, ils ont changé le nom d'espèce (voir précisions dans le chapitre 3). Les résultats ont été synthétisés dans un catalogue d'espèces avec diagnoses, biologies et répartitions. Vingt et une espèces natives supplémentaires pour la France dont 11 endémiques ont été ajoutées, notamment dans le groupe de la loche franche, du goujon, de la vandoise, du vairon, du chevesne, de la truite, du corégone et du chabot (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste des changements taxonomiques apportés par Kottelat & Freyhof (2007) par rapport à Keith & Allardi (2001).

	Keith & Allardi, 2001	Kottelat & Freyhof, 2007
Loche franche	Barbatula barbatula (Linnaeus,	Barbatula barbatula (Linnaeus, 1758)
Locile francile	1766)	Barbatula quignardi Bacescu-Mester, 1967
		Gobio gobio (Linnaeus, 1758)
Goujon	Gobio gobio (Linnaeus, 1766)	Gobio alverniae Kottelat & Persat, 2005
Goujon	Gooto gooto (Emmacus, 1700)	Gobio occitaniae Kottelat & Persat, 2005
		Gobio lozanoi Doadrio & Madeira, 2004
		Leuciscus leuciscus (Linnaeus, 1758)
Vandoise	Leuciscus leuciscus (Linnaeus, 1758)	Leuciscus bearnensis (Blanchard, 1866)
, 01100150	,	Leuciscus burdigalensis Valenciennes, 1844
		Leuciscus oxyrrhis (La Blanchère, 1873)
<b>37</b> ·	DI : 17.00	Phoxinus phoxinus (Linnaeus, 1758)
Vairon	Phoxinus phoxinus (Linnaeus, 1766)	Phoxinus bigerri Kottelat, 2007
		Phoxinus septimaniae Kottelat, 2007
Chevesne	Leuciscus cephalus (Linnaeus, 1766)	Squalius cephalus (Linnaeus, 1758)
	1	Squalius laietanus Doadrio et al., 2007
Epinoche	Gasterosteus aculeatus Linnaeus, 1766	Gasterosteus gymnurus Cuvier, 1829
Epinochette	Pungitius pungitius (Linnaeus, 1758)	Pungitius laevis (Cuvier, 1829)
	Salmo trutta Linnaeus, 1758	Salmo trutta Linnaeus, 1758
Truite		Salmo rhodanensis Fowler, 1974
		Salmo cetii Rafinesque, 1810
	Coregonus laveretus (Linnaeus, 1758)	Coregonus bezola Fatio, 1888
~ .		Coregonus fera Jurine, 1825
Corégone		Coregonus hiemalis Jurine, 1825
		Coregonus laveretus (Linnaeus, 1758)
		Coregonus palaea Cuvier, 1829
		Cottus gobio Linnaeus, 1758
		Cottus petiti Bacescu & Bacescu-Mester, 1964
		Cottus hispaniolensis Bacescu & Bacescu-
C1 1 4	Cottus gobio Linnaeus, 1758	Mester, 1964
Chabot	Cottus petiti Bacescu & Bacescu-	Cottus aturi Freyhof et al., 2005
	Mester, 1964	Cottus duranii Freyhof et al., 2005
		Cottus perifretum Freyhof et al., 2005
		Cottus rhenanus Freyhof et al., 2005
		Cottus rondeleti Freyhof et al., 2005

Suite à l'onde de choc provoquée par cet ouvrage dans la communauté scientifique, Keith *et al.* (2011a) mirent à jour leur Atlas des poissons d'eau douce de France intégrant une partie des résultats de Kottelat et Freyhof (2007) notamment sur les goujons, les vairons, les chevesnes et les chabots.

Néanmoins, ces auteurs ne valident pas tous les corégones, car ils ne considèrent qu'une seule espèce Coregonus lavaretus (Linnaeux, 1758) polymorphe, en s'appuyant sur des travaux en génétique (Østbye et al., 2005). Quant à la truite rhodanienne Salmo rhodanensis, elle n'est pas considérée et appartient à la même lignée évolutive que la truite de rivière Salmo trutta qui s'est différenciée de la lignée atlantique il y a 10 000 – 15 000 ans (Hamilton et al., 1989; García-Marín et al., 1999; Bernatchez, 2001). Ils s'accordent sur le fait que la truite corse, appelée Salmo cettii Rafinesque, 1810 par Kottelat et Freyhof (2007), appartient à une lignée évolutive différente de S. trutta. Pour les vandoises, des analyses génétiques ont confirmé l'existence de lignées évolutives distinctes (Chappaz et al., 1998; Costedoat et al., 2006; Denys, données non publiées), mais seules 2 espèces avaient été retenues : L. leuciscus (bassins du Rhône, Rhin et Seine), et L. burdigalensis (bassins de la Loire, Garonne, Adour, et Languedoc-Roussillon). De même, pour les loches franches, des analyses génétiques préliminaires ont montré qu'il s'agirait d'un complexe d'espèces à l'intérieur de Barbatula barbatula (Denys, données non publiées). Keith et al. (2011a) n'avaient par ailleurs pas intégré le chabot de Savoie Cottus sabaudicus Sideleva, 2009, car les données génétiques et la biogéographie de la région ne permettent pas de soutenir l'hypothèse d'une spéciation (Persat, comm. pers.).

Enfin, 5 espèces exotiques et invasives récemment capturées dans le bassin du Rhin ont été incorporées dans leur ouvrage : la brème du Danube *Ballerus sapa* (Pallas, 1814), le goujon d'Ukraine *Romanogobio belingi* (Slastenenko, 1934), le gobie demi-lune *Proterorhinus semilunaris* (Heckel, 1837), le gobie à tache noire *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) et le gobie de Kessler *N. kessleri* (Günther, 1861) (Bischoff *et al.*, 1998 ; Freyhof *et al.*, 2000 ; Manné & Poulet, 2008 ; Borcherding *et al.*, 2011).

Ce dernier inventaire publié comporte par conséquent 103 espèces dont 71 natives et 12 endémiques. Ces données ont été intégrées dans le référentiel taxonomique piscicole du réseau hydrographique français (Gargominy *et al.*, 2011).

Mais cette liste est loin d'être figée, tout n'a pas été résolu et de récentes études moléculaires sur l'ensemble des bassins européens ont montré l'existence d'espèces non

repérées par les études précédentes, voire d'espèces cryptiques dans différents genres. Ces découvertes prouvent que l'ichtyofaune européenne reste encore mal connue, y compris en Europe occidentale (e.g. Geiger et al., 2014<sup>1</sup>; Knebelsberger et al., 2015). De nouveaux outils, comme les nouvelles technologies de séquençages (NGS; Shendure & Ji, 2008), pourraient donner des éléments de réponses à certaines questions ichtyologiques jusque-là irrésolues, par le changement d'échelle qu'elles permettent dans l'acquisition des données, avec ainsi des conclusions plus solides que ce qu'apportent les outils traditionnels (Pompanon & Samadi, 2015). Ces outils peuvent également élargir le champs des inventaires via le « métabarcoding » ou la « métagénomique » (e.g. Tringe et al., 2005; Taberlet et al., 2012).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Cet article, fourni en Annexe 1, est le résultat d'une collaboration à l'échelle européenne à laquelle le doctorant a fait parti.

GEIGER M.F., HERDER F., MONAGHAN M.T., ALMADA V., BARBIERI R., BARICHE M., BERREBI P., BOHLEN J., CASAL-LOPEZ M., DELMASTRO G.B., **DENYS G.P.J.**, DETTAI A., DOADRIO I., KALOGIANNI E., KÄRST H., KOTTELAT M., KOVAČIĆ M., LAPORTE M., LORENZONI M., MARČIĆ Z., ÖZULUĞ M., PERDICES A., PEREA S., PERSAT H., PORCELOTTI S., PUZZI C., ROBALO J., ŠANDA R., SCHNEIDER M., ŠLECHTOVÁ, STOUMBOUDI M., WALTER S. & FREYHOF J., 2014 – Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Mol. Ecol. Res.*, 14: 1210-1221.

### Contexte biogéographique des bassins versants français

Pour discuter de l'évolution des espèces nouvellement identifiées, il est important de rappeler le contexte biogéographique des bassins versants de France.

Un bassin versant est un réseau composé d'affluents qui se rejoignent à un autre et se réunissent tous ensembles pour ne former qu'un fleuve (Hynes, 1970). Une illustration du bassin de la Seine et de ses principaux affluents est donnée en Figure 2 en guise d'exemple.

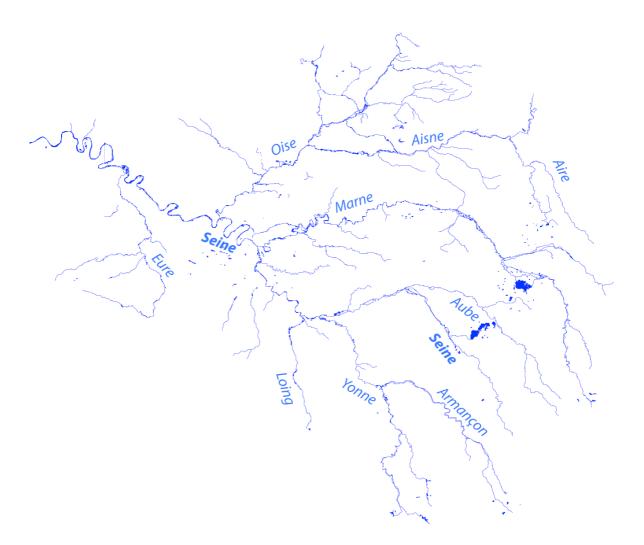


Figure 2: Le bassin de la Seine comprenant le fleuve Seine et ses principaux affluents.

Le réseau hydrographique français comprend 8 bassins versants majeurs pour leur histoire biogéographique (Fig. 3) :

- Mer du Nord : Rhin, Meuse ;

- Manche: Seine;

- Atlantique : Loire, Dordogne, Garonne, Adour ;

- Méditerranée : Rhône, d'autres bassins côtiers comme l'Aude ou la Têt.

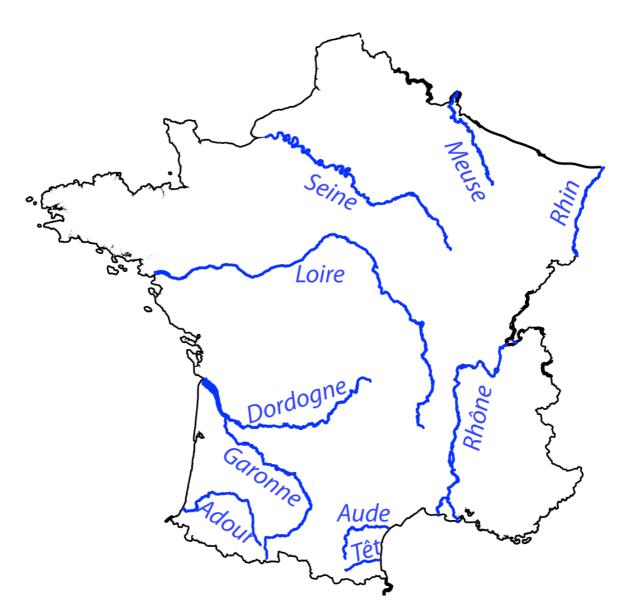


Figure 3: Les 8 principaux bassins versants de France métropolitaine auxquels s'ajoutent l'Aude et la Têt.

La carte du réseau hydrographique français a beaucoup changé au cours du temps, tout comme l'ichtyofaune (voir Persat & Keith, 2011). Dans la suite de ce chapitre,

j'emploie volontairement des noms vernaculaires au lieu des noms scientifiques pour caractériser les communautés ichtyologiques. Ceci permet de relier la description qui suit aux publications précédentes de manière générale

#### L'Oligocène (-33,9 à -23,3 Ma) : les fondations

L'Europe occidentale s'est séparée de l'Amérique par l'ouverture de l'Atlantique Nord durant le début de l'Eocène (-56 à -33,9 Ma) (Persat & Keith, 2011).

Durant l'Oligocène, l'Europe occidentale et méridionale ressemblait davantage à un archipel d'îles aux contours très variables et peu propices à l'établissement de réseaux hydrographique pérennes de grandes dimensions (Fig. 4). L'actuelle Manche n'était pas encore formée, il ne s'agissait que d'une bande de terre reliant le nord de la France à l'Angleterre, l'Artois. Les transgressions marines sur la façade Manche-Atlantique ont immergés le bassin d'Aquitaine donnant le Golfe Bordelais, ainsi que les vallées actuelles de la Seine et de la Loire formant le Golfe Parisien, et laissant émergées deux îles correspondant à la Bretagne et à la Normandie. Sur la façade alpine, un sillon péri-alpin était composé de lacs et de lagunes dans la vallée du Rhône et le bassin d'Aix. Ce dernier s'élargissait dans la plaine suisse et communiquait avec le fossé alsacien. Sur la façade « méditerranéenne », la Corse et la Sardaigne formaient un Massif « corso-sarde » relié au continent.

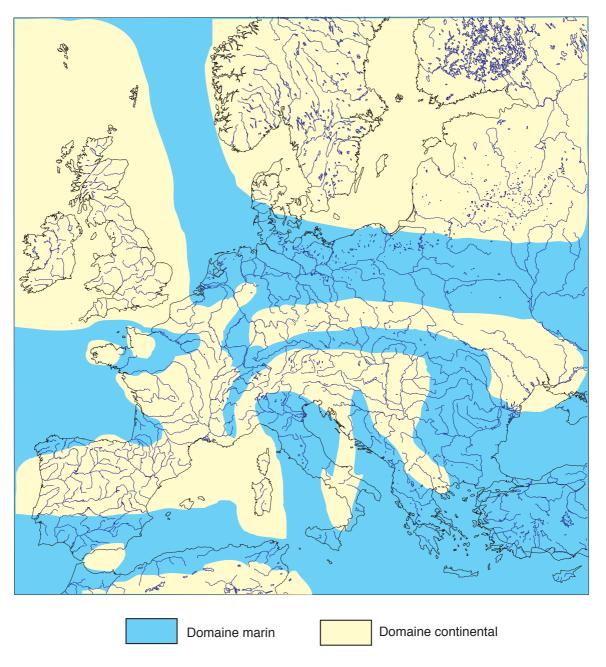


Figure 4: L'Europe à l'Oligocène (à partir de Keith *et al.*, 2011a et adapté de Pomerol, 1973, 1982 et Bănărescu, 1990); les tracés des continents en noirs et des cours d'eau en bleu représentent la carte actuelle.

Cependant, la péninsule ibérique va s'ancrer sur le reste du continent avec l'orogénèse des Pyrénées. C'est le premier évènement majeur qui va structurer la mise en place du réseau hydrographique que l'on connaît actuellement. En effet, en provoquant le basculement du Massif Central, des fossés d'effondrement seront mis en place d'orientation nord-sud correspondant aux Limagnes (ensemble Loire-Allier), à la Bresse (Saône) et à l'Alsace (Rhin) (Michon *et al.*, 2003 ; Dèzes *et al.*, 2004).

L'ensemble Loire-Allier s'écoulait en direction du bassin parisien par la vallée du Loing et confluait avec la Seine pour rejoindre un golfe préfigurant la Manche au large d'Etretat (Larue, 2003 ; Etienne & Larue, 2011). Cet ensemble faisait probablement partie du bassin de la Meuse qui était, à l'origine, un fleuve très important rejoignant la Somme par l'intermédiaire de l'Oise (Tricart, 1949 ; Pissart, 1974).

C'est durant l'Oligocène moyen qu'en France apparaissent les premiers Cyprinidae (Gaudant, 1977; 1979a; Gaudant & Rousset, 1979). L'ichtyofaune étaient ainsi composée de plusieurs sous-familles de Cyprinidae, à savoir de Leuciscinae †*Paleoleuciscus*, †*Paleorutilus papyraceus* et les premiers *Phoxinus* (Gaudant, 1984; 1988; Reichenbacher & Weidmann 1992), de Tincinae †*Tarsichthys (Paleotinca) macrurus* (Gaudant, 1988), et de Gobioninae †*Varhostichthys sp.* (Gaudant, 1984). Des Esocidae †*Esox papyraceus* et †*Esox primaevus* (Troschel, 1854; Gaudant, 1978), et un Osmeridae †*Osmerus solitarius* Troschel (Gaudant, 1988) ont également été découverts.

#### Le Miocène (-23 à -5,3 Ma) : mise en place de l'ichtyofaune actuelle

Le Miocène est marqué par le plissement alpin dû au glissement de la plaque africaine sous la plaque eurasiatique (Persat & Keith, 2011). Ainsi, les mers épicontinentales commencent à être repoussées permettant la création de rivières pérennes telle que la Garonne ou encore un fleuve parent de la Seine et de la Loire. Le sillon périalpin se prolonge dans le fossé bressant. Sur la façade Atlantique la Bretagne demeure isolée, et les bassins de Rennes, de Nantes et les plaines d'Aquitaine restent encore immergés (Fig. 5).

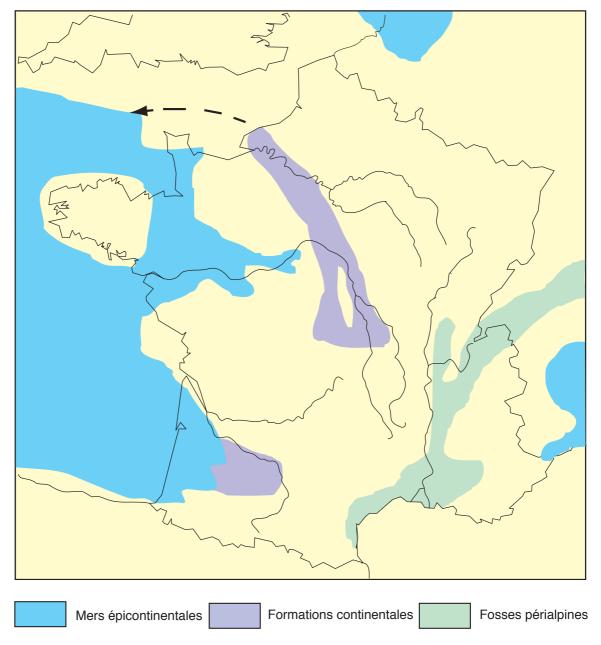


Figure 5 : La France au Miocène (à partir de Keith *et al.*, 2011a et adapté de Pomerol, 1973, 1982 et Banarescu, 1990).

Durant cette période, par le soulèvement de la Lorraine et l'enfoncement du bassin parisien, la Meuse se fait détourner vers le nord par la Meuse ardennaise perdant successivement ses affluents de rive gauche au profit de la Seine (Pissart, 1961; Pissart *et al.*, 1997).

Par ailleurs, les bassins cis-pyrénéens atlantiques (qui vont donner la Garonne et l'Adour) semblent s'être définitivement isolés du versant ibérique (Gabert, 1962 ; Bomer, 1979).

Sur la façade méditerranéenne, l'ouverture du Golfe du Lion et dérive vers l'Est du bloc Corso-Sarde ont provoqué une distension dans les Pyrénées orientales (Argand, 1924; Alvarez *et al.*, 1974; Rosenbaum *et al.*, 2002). Cela a conduit à la formation d'une série de bassins d'effondrements (Cerdagne, Conflent, Roussillon) constituant de potentielles connexions entre les bassins du Sègre et de la Têt. Parallèlement, le sillon périalpin se ferme au Miocène moyen (-15 Ma). Ainsi, le bassin marin est remplacé progressivement par un bassin fluvial (Berger *et al.*, 2005; Kuhlemann, 2007).

Concernant le climat, le Miocène moyen correspond à l'optimum du réchauffement climatique avec une température moyenne plus élevée de 3°C qu'actuellement (You *et al.*, 2009). De très longues et intenses périodes de précipitations ont même été observées à la fin du Miocène en Europe (Böhme *et al.*, 2008).

La fin du Miocène (-5,6 à -5,33 Ma) est marquée par un évènement géologique majeur : la crise Messinienne qui correspond à l'assèchement de la Méditerranée (Hsü *et al.*, 1973 ; Clauzon *et al.*, 1996). Le glissement de la plaque africaine sous la plaque eurasiatique a interrompu progressivement la communication de l'Atlantique avec la Méditerranée, conduisant à l'assèchement de cette dernière. Puis, l'effondrement de l'isthme continental ainsi formé entre l'Europe et l'Afrique (Loget & Van den Driessche, 2006) et la remontée du niveau marin mondial de plus de 70 m qui ont suivi, ont donné naissance au détroit de Gibraltar. La mer a ainsi rempli la cuvette méditerranéene et remonté la vallée du Rhône jusqu'en plaine de Saône (Clauzon, 1999).

Concernant la diversité ichtyologique, le Miocène a été une période durant laquelle les températures étaient plutôt chaudes et les événements géologiques ont favorisé la dispersion et la diversification de la faune d'eau douce (Persat & Keith, 2011).

Des genres actuels ou apparentés à ceux que l'on connaît actuellement en Cyprinidae (Alburnoides, Abramis, Alburnus, Paleoleuciscus, Paleocarassius, Rutilus, Scardinius et Tinca), Anguillidae, Esocidae, Umbridae, Cobitidae et Gobiidae ont été recensés dans les gisements allemands ou suisses (Agassiz, 1833-1844; Gaudant, 1980, 1989; Reichenbacher & Weidmann, 1992; Böhme et Ilg, 2003; Sach et al., 2003). Un Salmonidae †Salvelinus oliveroi retrouvé dans des dépôts lagunaires du Piémont italien laisse suggèrer un refroidissement climatique à la fin du Miocène (Cavalo & Gaudant, 1987).

En France, le genre *Paleotinca* a été signalé en Provence (Reichenbacher, 2004) et dans la vallée du Rhin au début du Miocène. Alors que des *Leuciscus*, *Barbus* et de gros

Silurus ont été découverts dans la moyenne vallée du Rhône à la fin du Miocène (Mein et al., 1983).

En définitive, à la fin du Miocène, les Cyprinidae se sont diversifiés et ont donné naissance aux genres actuels en Europe (Weiler, 1933 ; Berg, 1949 ; Rutte, 1962 ; Bănărescu, 1990). La crise messinienne et l'assèchement de la Méditerranée ont favorisé la dispersion de l'ichtyofaune (Bianco, 1995) avant que la trangression marine au Pliocène n'isole les différents bassins versants, amorçant par conséquent des spéciations allopatriques.

#### Le Pliocène (-5,3 à -2,5 Ma) : Mise en place de l'isolation des bassins

A partir du Pliocène, le soulèvement des Alpes ainsi que de l'ensemble Jura-Vosges-Forêt noire ont modifié les connexions entre trois fleuves et leurs sens d'écoulement: le Danube, le Rhône valaisan et le Rhin alpin (Clauzon, 1999).

Sur la façade atlantique, le bassin de la Garonne formait un bassin important avec la Dordogne grâce à l'émergence des plaines aquitaines. L'Aude était à cette époque un affluent de la Garonne. Des petites connexions avec les bassins de l'Adour (Persat & Keith, 2011) et de la Loire existaient il y a environ 4,5 millions d'années (Glangeaud, 1922; De Goer & Burg, 1990; Dupis & Choquier, 1999). De même, qu'il existait une connexion entre la Vienne et les bassins charentais et aquitains (Passerat, 1911; Bichot, 2004) durant le Mio-Pliocène.

Enfin, au Pliocène supérieur, un évènement tectonique entre les collines du Perche au Morvan a provoqué la déviation de la Loire vers l'Atlantique, l'isolant ainsi de la Seine (Larue, 2003; Etienne & Larue, 2011). A partir de ce moment-là, les bassins côtiers comme la Vienne et l'Indre se joignent à celui de la Loire (Fig. 6).

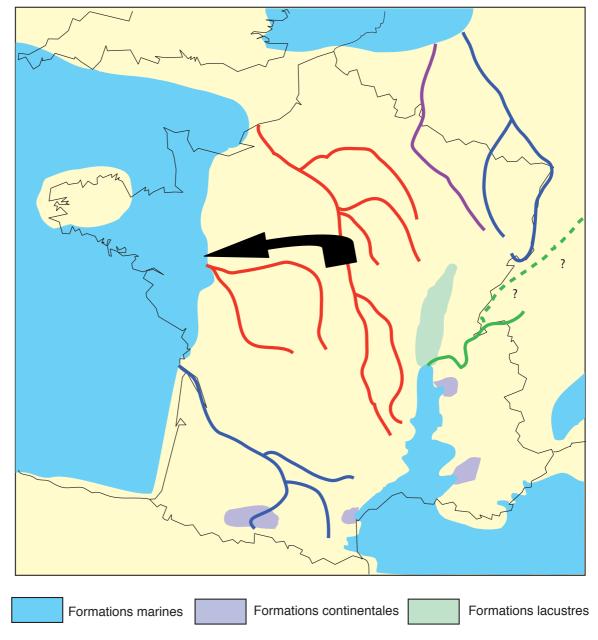


Figure 6 : Le réseau hydrographique principal au début du Pliocène (à partir de Keith *et al.*, 2011a et adapté de Pomerol, 1973, 1982 et Banarescu, 1990) ; la flèche noire indique la déviation de la Loire vers l'Atlantique à la fin de Pliocène.

L'ichtyofaune pliocène est moins riche en fossiles que celle des autres strates. Néanmoins, des faunes très proches de celles de l'actuel ont été décrites par Gaudant (1976, 1987) avec loche de rivière, brochet, carassin, tanche, gardon, rotengle, silure et perche.

Le Pliocène est la dernière époque géologique de l'ère tertiaire. La transition tertiaire-quaternaire est caractérisée par un refroidissement global de la température, entrainant plusieurs épisodes glaciaires ou glaciations.

# Le Pléistocène (-2,5 Ma à -12 000 ans) : l'Âge de Glace

Les glaciations du quaternaire représentent le principal événement géologique récent à l'échelle de l'Europe ayant eu un impact sur les communautés piscicoles. Il y en eut plusieurs dès le début du Pléistocène (1,8 Ma) dont 4 majeures sur les derniers 500 000 ans.

Durant cette période, le climat en Europe était très froid, les inter-glaciaires n'étant que des intermèdes de relativement courte durée. Toute l'Europe moyenne, y compris la France, était alors recouverte par la Toundra, la partie méridionale (au sud de la Loire) conservant quant à elle un climat tempéré avec notamment des forêts, et servant de refuge pour la faune et la flore.

Lors des maximums glaciaires, la calotte glaciaire recouvrait les pays baltiques, ainsi qu'une grande partie du Royaume-Uni (Gibbard *et al.*, 1988). Des glaciers alpins s'étaient aussi formés. Ceci a considérablement abaissé le niveau marin. Ainsi, des connexions entre des bassins ont pu être réalisées (*i.e.* la Loire avec la Vilaine, La Garonne avec la Dordogne et les bassins charentais, les bassins des Pyrénées orientales avec le Sègre). Le sud de la mer du Nord était occupé par un vaste lac d'eau douce qui se déversait *via* le bassin de la Manche dans l'Atlantique (Gibbard *et al.*, 1988; Antoine *et al.*, 2003). La Manche était alors un puissant fleuve qui comptait pour affluents l'Oder, l'Elbe, la Weser, le Rhin, la Meuse, la Tamise et la Seine (Hantke, 1993); elle est également appelée Méga-Vistule (Fig. 7).



Figure 7: Réseau hydrographique français au cours des glaciations du Pléistocène (adaptée de Persat & Keith 2011); Bassins: Garonne (orange), Loire (bleu), Seine (vert), Rhône (violet), Rhin (rouge), Meuse (rose), Tamise (bleu ciel), Vistule + Elbe (vert clair), Danube + Volga (ocre); calotte glacière + glaciers (blancs), délimitation du permafrost (pointillés), possibilités d'échanges spécifiques entre les bassins (flèches).

Ailleurs, l'abaissement du niveau de base a pu favoriser une érosion régressive susceptible d'avoir entrainé certaines captures à faible altitude. C'est la cas de l'Adour qui s'est séparé de la Garonne (Persat & Keith, 2011), de l'Aude qui a été dévié en Méditerranée (Gottis *et al.*, 1972), ainsi que la perte de l'Aisne pour la Seine (Blache, 1943; Pissart *et al.*, 1997) et de la haute Moselle pour la Meurthe au détriment de la Meuse (Cordier et al., 2006).

Les différentes vagues de froid ont donc eu un impact important sur la faune et la flore européenne. Les zones méridionales ont servi de refuge (Hewitt, 2000). Les espèces les plus cryophiles venant des bassins de l'Europe septentrionale, et profitant des crues entre les différents épisodes glaciaires (Craw *et al.*, 2006), ont pu coloniser les affluents de la Méga-Vistule (Bănărescu, 1992 ; Le Gall, 2010).

La faune méridionale était donc déjà présente avant les épisodes glaciaires.

L'ichtyofaune du début du Pléistocène en Europe septentrionale était composée d'espèces ressemblant aux actuelles pour le brochet, la perche, le sandre, la grémille,

l'épinoche, le gardon, le rotengle, la brème, l'ablette, la tanche, le carassin, le vairon, le goujon, le chevesne et la loche de rivière (Gaudant, 1979b).

# L'Holocène (12 000 a à aujourd'hui) : et l'Homme arriva

L'Holocène débute avec la fin des glaciations. La calotte glaciaire et les glaciers ont diminué permettant à la mer d'atteindre le niveau actuel en isolant de nouveau les bassins versant, pour former ainsi la carte du réseau hydrographique que l'on connait aujourd'hui.

Des connexions rhéno-danubiennes avec les bassins de la Seine, Loire, Meuse et Rhône ont pu se réaliser durant cette période avec la fonte des glaciers (Persat & Keith, 2011).

L'Holocène et la fin du Pléistocène forment également la période où les humains se sont implantés en Europe. Grâce à la pêche, les données archéoichtyologiques sont nombreuses, et ces informations sont primordiales pour évaluer si les genres sont natifs d'un bassin ou non. Le Gall (2008) a fait une synthèse de l'évolution de la faune de l'Europe de l'Ouest après les glaciations. On y trouvait ainsi de l'ombre dans le bassin de la Loire et dans le bassin rhodanien (y compris la Saône et le Doubs) jusqu'aux fleuves côtiers du Languedoc et du Roussillon, de l'alose et du barbeau dans le Lot. Le brochet est omniprésent.

En Aquitaine, il y a -17 000 à -12 000 ans, on trouvait du chevesne, de la vandoise, de l'ablette, de l'anguille, de la truite, du saumon et du brochet. Alors que dans l'Ain, on y trouvait de la truite, de l'ombre, de la vandoise, du brochet, de la tanche, et de l'alose (Le Gall, 1984).

Un gisement situé à Lyon et datant de l'époque romaine a permis de trouver de l'anguille, de la perche, de la truite et des Cyprinidés (tels que du chevesne, de la tanche et du toxostome), ainsi que de la lote, de l'alose et de l'esturgeon (Piquès *et al.*, 2008).

Dans tous ces gisements anciens, l'absence de la plupart des Cyprinidés thermophiles ou limnophiles telle que la brème est remarquable (Persat & Keith, 2011).

A partir du Moyen-âge la pisciculture a été développée, participant ainsi à la propagation des espèces commerciales (carpes, brèmes, tanches, brochets, perche, rotengle) (Persat & Keith, 2011).

Des canaux artificiels ont été également construits à partir du XVIIème siècle pour faciliter la navigation fluviale. Dès le milieu du XIXème siècle, un grand nombre de canaux ont été mis en place, multipliant les voies de passages potentielles entre les trois grands bassins du Nord-Est de la France, Rhin-Meuse, Seine et Rhône-Saône (Pinon, 1995). Dans le même temps, de multiples déversements et alevinages (en truites, carnassiers et Cypinidae) d'origines variées et généralement inconnues sont réalisés entre autres par les associations de pêche récréative. Dès lors, on s'attend à ce que la majorité de l'ichtyofaune ait été homogénéisée d'un bassin à un autre sur les deux tiers du territoire métropolitain, à l'exception des plus rhéophiles ne pouvant séjourner dans les eaux lentiques des canaux. Seule la grande ligne de partage des eaux entre la Loire et le Sud-Ouest (Charente, et Dordogne-Garonne) n'a pas encore été interrompue.

# Les provinces biogéographiques

Les événements géologiques et climatiques ont donc énormément influé sur la composition des ichtyofaunes, et ceci ne peut être négligé par la communauté scientifique (Griffiths, 2006; Hugueny *et al.*, 2010). Dès lors, les ichtyologues tels que Berg (1933; 1949) ou Bănărescu (1960; 1990) ont tenté de regrouper les assemblages faunistiques homogènes pour former des provinces biogéographiques. Qu'elles soient issues d'observations naturalistes (Bănărescu, 1990), ou d'une analyse statistique (Reyjol *et al.*, 2007), les différentes cartes des provinces proposées s'accordent sur l'existence d'une partition nord-sud en deux grandes régions: une province centre-européenne ou danubienne, et une autre méditerranéenne plus riche en endémicité. Néanmoins, ces cartes incluent tous les bassins français dans une même région biogéographique.

Persat et Keith (2011), en tenant compte des évènements biogéographiques en France, ont dessiné 3 domaines biogéographiques (Fig. 8) :

- Le domaine rhéno-danubien (comprenant les bassins de la Seine, de la Meuse et du Rhin) peuplé d'espèces dont l'origine serait essentiellement la période glaciaire du Pléistocène, avec la colonisation de ces bassins *via* la Méga-Vistule.
- Le domaine atlantique (comprenant les bassins de la Loire, la Garonne et l'Adour) composé d'espèces déjà présentes avant la période glaciaire du Pléistocène. Le bassin de la Loire a été fortement impacté par les communications naturelles avec la Seine durant l'Holocène, réduisant fortement son taux d'endémicité.

- Le domaine méditerrannéen (comprenant les bassins du Rhône et les côtiers Domaine rhéno-méditerranéen dans le Languedoc-Roussillon et avec des espèces dont l'origine daterait de la crise Messinienne, à la fin du Miocène. La tête du bassin du Rhône comprend des espèces dont l'origine pourrait être attribuée aux diffusions avec le Rhin et le Danube au Pliocène, mais a également été fortement impactée par les colonisations naturelles durant l'Holocène via le Rhin.

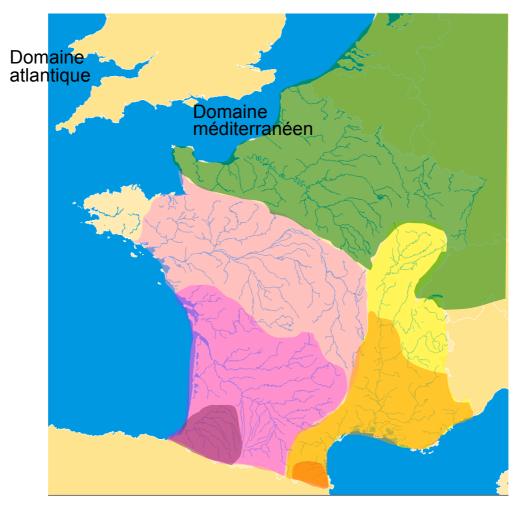


Figure 8 : Les provinces biogéographiques des poissons d'eau douce français d'après Persat & Keith (2011) ; les intensités de couleur expriment les degrés d'endémisme ou de richesses spécifiques selon les régions.

Si cette hypothèse permet de comprendre pourquoi on trouve les genres *Rhodeus* et *Misgurnus* d'origine d'Europe centrale dans le domaine rhéno-danubien, et les genres *Salaria*, *Telestes*, *Aphanius* et *Valencia* dans le domaine méditerranéen comme dans la plupart des bassins méditerranéens occidentaux, elle ne suffit pas pour expliquer pourquoi certains genres ne sont représentés que dans certains bassins. Elle est également

insuffisante pour représenter la diversité intragénérique potentielle de l'ichtyofaune française à l'intérieur de chaque bassin versant.

# La théorie des îles ou « The Island Theory »

Pour préciser ces éléments, il faut associer aux éléments de biogéographie la façon dont peuvent évoluer les bassins versants. Un des éléments clés est que ces bassins peuvent être comparés à des « îles » d'eau douce entourées de terre et de mer (Hugueny *et al.*, 2010; Oberdorff *et al.*, 2011). En effet, contrairement aux mammifères, oiseaux et lissamphibiens qui peuvent effectuer des migrations terrestres pour gagner d'autres cours d'eaux, la plupart des poissons actinoptérygiens (à l'exception de l'anguille) ne peuvent circuler qu'à l'intérieur du bassin versant (Keith, 1998). Ainsi, si nous prenons l'exemple de l'Allier (bassin de la Loire) à Saint Christophe d'Allier et de la Truyère (bassin de la Dordogne) à Saint-Léger-du-Malzieu, un animal terrestre souhaitant aller de l'un à l'autre parcourera au plus court 31 km, tandis qu'un animal purement aquatique devra dévaler environ 1000 km de cours d'eau sur le bassin de la Loire jusqu'à l'estuaire, longer environ 300 km de côtes, et remonter encore sur 350 kilomètres de rivière. Or la plupart des poissons d'eau douce sont des poissons « primaires », c'est-à-dire qu'ils sont intolérants aux eaux salés (Myers, 1938; Bănărescu, 1990), rendant le passage en eau de mer impossible.

Un bassin versant possède aussi une structure physique arborescente, de manière longitudinale suivant un fort gradient de pente et de caractérisiques physico-chimiques : on trouvera des eaux lotiques (à forte vitesse de courant) froides et fortement oxygénées près de la source, alors qu'en aval elle seront lentiques (faible vitesse de courant) et aux températures variables (Laffaille *et al.*, 2011). S'il existe des espèces, comme le barbeau, le goujon ou le vairon, pouvant supporter un large éventail de contraintes physiques, d'autres comme l'ombre ou la grémille sont beaucoup plus sensibles à la température ou la vélocité (Tales *et al.*, 2004). Ainsi, les assemblages d'espèces sont structurés selon un gradient longitudinal. La zonation de Huet (1959) étant la plus connue avec les zones à truite, ombre, barbeau et brème. Ceci a été confirmé pour les bassins de la Seine (Oberdorff *et al.*, 1993), de la Loire (Lasne *et al.*, 2007), de la Garonne (Ibarra *et al.*, 2005; Santoul *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006), du Rhône supérieur (Persat *et al.*, 1994). Par conséquent, une espèce rhéophile (aimant les courants ou les torrents) ne pourra pas forcément survivre aux

conditions lentiques en aval du bassin. Des migrations d'un bassin à un autre par la voie longitudinale peuvent donc s'avérer difficiles voire impossibles.

Ces « îles » bassins versants sont également isolées les unes des autres depuis plus ou moins longtemps, favorisant ainsi l'endémisme. La Figure 9 reprend le schéma de la Figure 8 en faisant apparaître la période de connexion entre les bassins. Ainsi, on a un « archipel danubien» composé de la Meuse, du Rhin, du Rhône, de la Seine, et de la Loire pour lesquels les dernières connexions remontent à l'Holocène. Les bassins de la Garonne, de la Dordogne, de la Charente, de la Sèvre Niortaise, de l'Adour et de l'Aude forment un « archipel atlantique », dont les connexions se sont interrompues au Pléistocène. Enfin, le dernier «archipel », méditerranéen est, quant à lui, hétérogène, car si le domaine méditerranéen est isolé des autres depuis le Miocène, les dernières connexions du Pléistocène et de l'Holocène ont du créer des transferts de l'ichtyofaune. L'ichtyofaune méditerranéenne originelle a dû être envahie par celle de la Garonne en raison de la déviation de l'Aude qui a du servir de carrefour migratoire, de même que les bassins des Pyrénées Orientales ont été connectés au bassin de l'Ebre, et que la Saône et le Léman ont été connecté au Rhin après les glaciations.

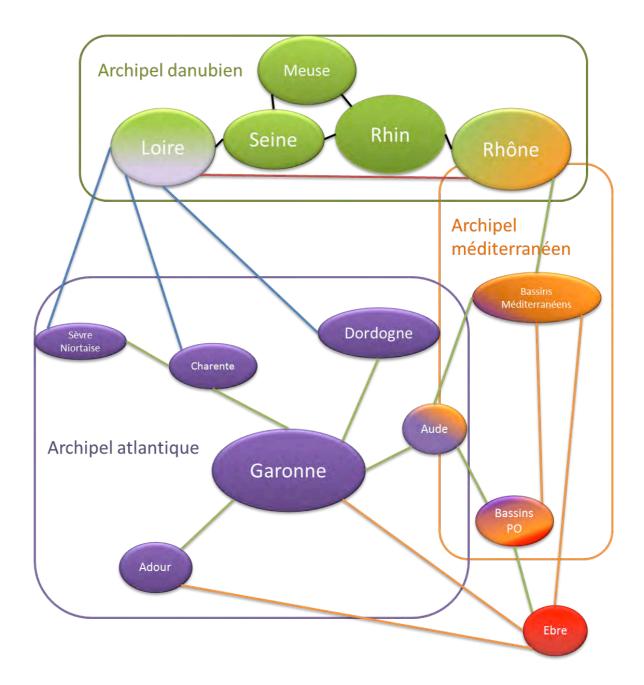


Figure 9 : Représentation des bassins versants français sous la forme «d'îles » rassemblées en « archipels » (vert : archipel danubien, violet : archipel atlantique, orange : archipel méditerranéen) ; les liaisons entre les bassins sont colorées en fonction de l'époque de la dernière connexion naturelle (rouge : Oligocène, orange : Miocène, bleu : Pliocène, vert : Pléistocène, noir : Holocène) ; PO : Pyrénées Orientales.

Ces archipels sont isolés les uns des autres depuis au moins le Pliocène (-5,3 à -2,5 Ma) pour l'archipel danubien et l'archipel atlantique, et le Miocène (-23 à -5,3 Ma) pour les autres connexions.

Le taux d'évolution du marqueur mitochondrial de la sous-unité 1 du cytochrome oxydase (COI) a une divergence estimée entre 0,5 et 2% par million d'années chez les

Téléostéens (Bermingham *et al.*, 1997; Knowlton & Weigt, 1998; Webb *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005; Keith *et al.*, 2011b). Les genres communs entre les archipels auraient ainsi au minimum entre 1,3 et 5% de divergence. Or les études réalisées avec ce marqueur du COI sur les espèces de téléostéens d'eau douce tchèques, allemandes et de Méditerranée ont révélé une divergence interspécifique moyenne respectivement de 2,7%, 7,59% et 4,1% (Mendel *et al.*, 2012; Geiger *et al.*, 2014, Knebelsberger *et al.*, 2015). Une divergence supérieure à 2% entre des individus attribués à la même espèce soulève la possibilité que le nombre d'espèces est plus important que celui qui est accepté, laissant présager des espèces cryptiques (Hubert *et al.*, 2008; April *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011; Mendel *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013; Geiger *et al.*, 2014; Knebelsberger *et al.*, 2015).

Nos bassins versants pourraient avoir par conséquent des taux d'endémicité plus élevés, voire comparables à ceux observés dans les îles (Chen & He, 2009; Kier *et al.*, 2009), et ce grâce à des mécanismes de spéciations *in situ* (Darwin, 1859; Grant, 1998; Whittaker, 1998). Ainsi, les genres jusqu'à présent supposés monospécifiques communs à plusieurs archipels (voir Persat & Keith, 1997) auraient une grande variabilité intragénérique, et les archipels abriteraient donc des espèces endémiques non identifiés voire cryptiques. Les nombreuses espèces (de chabots, de goujons, de vairons et de chevesnes) décrites en France durant ces dix dernières années (Freyhof *et al.*, 2005; Kottelat & Persat, 2005; Doadrio *et al.*, 2007, Kottelat, 2007; Kottelat & Freyhof, 2007) vont dans le sens de la reconnaissance de cette diversité.

Mais pour les non-taxonomistes, ces taxons nouvellement décrits se distinguent sur des caractères difficilement observables (Poulet, comm. pers.). Certains pensent que ce ne sont que des lignées, ou sous-espèces, et que rien ne justifie le fait de les considérer comme des espèces à part entière (Gerdeaux, comm. pers.; Miaud, comm. pers.). Il est par conséquent important de rappeler la notion d'espèce.

# La notion d'espèce

L'homme a toujours eu besoin de nommer les êtres vivants observés. Naturellement, il a commencé par désigner du même nom les individus qui se ressemblent. Seulement, avec la diversité des langues, une même espèce peut avoir plusieurs noms vernaculaires différents, et inversement, un nom vernaculaire peut désigner plusieurs espèces (exemple : le poisson-chat). Pour cela, Linnaeus (1758) a proposé une nomenclature universelle binominale en latin, en classant les êtres vivant selon une hiérarchie (Règne, Classe, Ordre, Famille, Genre et Espèce) ; de là, naquit une nouvelle discipline en biologie : la taxonomie.

L'un des domaines de la taxonomie consiste à étudier les espèces, il s'agit de l'alphataxonomie (Davis & Heywood, 1963) ou microtaxonomie (Mayr, 1982). Il existe également de nombreuses interrogations sur ce qu'est une espèce (l'éidonomie; Dubois, 2008).

# Plusieurs définitions de l'espèce

L'émergence des travaux sur l'évolution a remplacé la notion d'espèce basée sur une essence, transposition concrète de la pensée d'un créateur surnaturel et liée à une vision fixiste de la diversité du vivant, par des continuités et interruptions dans un arbre du vivant où tous les êtres vivants ont un ancêtre commun (Bocquet *et al.*, 1976).

Ainsi, au XVIIIème siècle, les biologistes regroupaient les organismes dans une même espèce en fonction de leur ressemblance et si l'accouplement donnait lieu à une descendance (Bocquet *et al.*, 1976). Dans le cas des Téléostéens seule la ressemblance était prise en compte, car ni aquarium ni élevage n'existaient pour permettre d'observer l'interfécondité des individus (Daget & Bauchot, 1976). Mais au fur et à mesure que les connaissances en biologie se sont accrues, les naturalistes se sont heurtés aux cas de polymorphismes (coexistence dans une même population d'individus pouvant être d'aspect différent), de polytypisme (existence de caractères différentiels repérables entre populations ou groupes de populations différents de l'espèce), et même des alternances de générations (exemple des cnidaires avec la forme polype et la forme méduse) (Bocquet *et al.*, 1976).

Tous ces problèmes ont conduit les naturalistes à réfléchir sur la notion et le concept d'espèce, et à essayer de trouver une définition satisfaisante permettant de proposer des hypothèses de délimitation entre espèces. Une multitude de concepts et de variantes de concept d'espèce ont été formulées (voir par exemple Mayden, 1997; De Queiroz, 2007), et aucun n'est satisfaisant pour donner une définition précise de la notion d'espèce qui convienne à la plupart des groupes (Gollmann, 1996; Lherminier & Solignac, 2006).

L'objectif ici n'est pas de lister tous les concepts d'espèces qui ont été évoqués dans la littérature. Néanmoins, il est important de rappeler les principaux et de leurs variantes cités par De Queiroz (2007) afin de poser le cadre dans lequel s'insèrent ces travaux.

#### Le concept biologique

Le plus connu est le concept biologique. Il se base sur l'interfécondité des populations ; ainsi appartiennent à une même espèce deux populations dont la reproduction naturelle donne une descendance viable et fertile (Wright, 1940; Mayr, 1942; Dobzhansky, 1950). Mayr (1942) et Dobzhansky (1970) affinent ce concept en intégrant l'isolement reproductif intrinsèque, c'est-à-dire que deux espèces sont différentes s'il y a absence d'interfécondité liée à des propriétés intrinsèques, et non extrinsèques comme les barrières géographiques. Enfin, d'autres insistent sur la reconnaissance des gamètes donnant lieu à la fertilisation de l'ovocyte comme critère pour définir une espèce (Paterson, 1985; Masters *et al.*, 1987; Lambert & Spencer, 1995).

#### Le concept écologique

L'intégration des connaissances en écologie donna lieu au concept « écologique » : les populations n'occupant pas une même niche écologique ou vivent dans des environnements différents, ne peuvent appartenir à une même espèce (Van Valen, 1976 ; Andersson, 1990).

#### Le concept évolutif

Dans ce concept, une espèce est une entité composée d'organismes qui maintient son identité par rapport aux autres dans le temps et dans l'espace, avec son propre passé évolutif ainsi que son propre destin ; il s'agit du concept « évolutif » (Simpson, 1951 ; Wiley, 1978 ; Mayden, 1997). Cependant, l'herpétologue Grismer (1999, 2001) constate que ce concept d'espèce tel quel ne s'appuyait sur aucun critère taxonomique, et impose que l'on fixe des caractères diagnostiques afin de définir les lignées, provoquant ainsi la disparition de la notion de sous-espèce.

#### Le concept phénotypique

Templeton (1989, 1998) a, quant à lui, une vision de généticien des populations et pense qu'une espèce se définit sur la cohésion phénotypique entre les individus avec des échanges génétiques et démographiques.

# Le concept phylogénétique

Le concept « phylogénétique » de l'espèce connaît plusieurs variantes (au moins 4 variantes). La première d'entre elles, le concept phylogénétique Hennigien, stipule que l'ancêtre commun entre deux espèces devient éteint lorsque les deux lignées se séparent (Henning, 1966; Ridley, 1989; Meier & Willmann, 2000). D'autres systématiciens insistent sur la nécessité qu'une espèce soit monophylétique, c'est-à-dire que tous les individus ont un même ancêtre commun et possèdent des états de caractères dérivés qui leur sont propres (Rosen, 1979; Donoghue, 1985; Mishler, 1985). Alors que Baum et Shaw (1995) partent du principe que tous les allèles d'un gène donné proviennent d'un allèle ancestral commun non partagé avec les autres espèces; il s'agit du concept phylogénétique généalogique (voir aussi Avise & Baum, 1990). Enfin, la dernière variante définit l'espèce comme le plus petit groupe d'individus qu'il est possible de distinguer à partir de caractères distinctifs partagés dans une même lignée évolutive (Nelson & Platnick, 1981; Cracraft, 1989; Nixon & Wheeler, 1990).

#### Le concept phénétique

Le concept phylogénétique suit le mouvement cladiste de la recontruction phylogénétique. Dans les années 1970, l'approche phénétique, une méthode de reconstruction se basant sur la distance entre les taxons, a également eu sa propre délimitation. Ainsi, selon le concept « phénétique », les individus appartenant à une même espèce forment un même cluster phénétique (Michener, 1970 ; Sokal & Corvello, 1970 ; Sneath & Sokal, 1973).

#### Le concept génotypique

Enfin, le dernier concept est celui du cluster géntoypique (Mallet, 1995). Ce dernier stipule que les individus appartenant à une même espèce forment un cluster génotypique, c'est-à-dire avec des déficits d'intermédiaires génétiques comme les hétérozygotes. Elle serait ainsi proche du concept Darwinien de l'espèce dans le sens où il n'y a pas de discontinuité délimitant spécifiquement les populations (Darwin, 1859; Turner, 1999)

Il est très difficile d'unifier ces nombreuses approches (De Queiroz, 2007; Dubois, 2011), d'autant plus que les concepts adoptés dépendent de la discipline sur laquelle le biologiste travaille (*i.e.* un taxonomiste travaillant sur la morphologie suivra davantage le concept évolutif, alors que le systématicien moléculaire aurait tendance à préférer le concept phylogénétique; De Queiroz, 2007), mais également du groupe taxonomique étudié (voir Bocquet *et al.*, 1976-1980), souvent en fonction des critères de délimitation accessibles. Le problème des différents concepts et concepts unifiés qui ont été proposés est qu'ils ont été définis par des biologistes spécialisés dans un groupe qui n'ont pas cherché à approfondir en fonction des particularités des autres.

# Quelle définition choisir?

Les Téléostéens ont certaines spécificités biologiques: une allométrie de croissance, des phases de métamorphose entre les formes juvéniles et les formes adultes (comme chez l'anguille avec la larve leptocéphale), des différences de comportements (si l'espèce vit en permanence en bancs cela n'aura pas la même incidence sur les flux de gènes que pour les

espèces solitaires), des variations non héréditaires ou liées à l'environnement comme la coloration, ou le polymorphisme (*i.e.* les corégones), des variations physiologiques (*i.e.* les parures nuptiales n'apparaissant qu'à une certaine époque de l'année) ou pathologiques, un dimorphisme sexuel, et des cas de polyploïdie (*i.e.* les différentes formes d'ornement chez le poisson rouge *Carassius auratus*) (Daget & Bauchot, 1976).

A partir de là, Daget et Bauchot (1976) affinent le concept biologique pour les Téléostéens en tenant compte des particularités génétiques, et donnent leur propre définition de l'espèce qui est « un groupe de populations réellement ou potentiellement interfécondes dans les conditions naturelles et isolées des autres groupes semblables ». Or, les interfécondités sont rarement testées ou même testables pour valider les espèces selon le concept biologique. Cela est d'autant plus problématique pour les populations allopatriques, et n'est généralement applicable qu'en cas de sympatrie (Turner, 1999; Kottelat & Freyhof, 2007; Keith *et al.*, 2011a). De même, il est difficile de l'appliquer dans le cas d'une existence de zone de contact entre des taxons différenciés (e.g. Costedoat *et al.*, 2007; Tancioni *et al.*, 2013) car de nombreux cas d'hybridations interspécifiques et intergénériques chez les poissons d'eau douce en milieu naturel donnant des descendances viables et fertiles sont connus, notamment chez les Cyprinidae (Yakovlev *et al.*, 2000; Scribner *et al.*, 2001); sans compter l'existence d'espèces auto-fécondes ou unisexuelles (Kottelat, 1997; Turner, 1999). Ces critiques s'appliquent également au concept de reconnaissance d'espèce *sensu* Paterson (1985).

Ainsi Turner (1999) estime que le concept biologique *sensu* Mayr (1942) ne serait qu'un cas particulier. Et que pour intégrer les autres cas tels que l'allopatrie ou l'unisexualité, il faut alors les considérer comme des discontinuités même si l'interfécondité reste possible en cas de remise en contact, et donc la définition de l'espèce doit s'apparenter davantage à celle de Darwin (1859) et de Mallet (1995). Cependant, cette perception fait que l'espèce ne se repose sur aucun critère diagnostique, et est par conséquent difficilement applicable en taxonomie.

D'autres ichtyologues systématiciens (e.g. Kottelat (1997)), utilisent le concept phylogénétique de l'espèce *sensu* Cracraft (1983, 1989), qui stipule qu'une espèce est le plus petit groupe dicernable des mêmes synapomorphies partagées par un ancêtre commun et les descendants. Or la biologie comparative s'appuyant sur une méthodologie systématique et expliquée par l'évolution, est le plus puissant des outils permettant de comprendre la biodiversité (Nelson & Platnick, 1981 ; Kullander, 1999). Ainsi, la validité

d'une espèce se teste sur un arbre phylogénétique avec une grande fiabilité (de Pinna, 1999), et à partir de caractères objectifs (Kottelat, 1997). Ce concept incluant des critères de reconnaissance a un impact sur la classification car la notion de sous-espèce n'existe plus, et est élevée au rang spécifique (Kottelat, 1997).

Les opposants à ce concept estiment qu'il est impossible de séparer les espèces sur le principe des dichotomies de l'arbre phylogénétique sans prendre en compte les différentes informations biologiques, écologiques, ou éthologiques sur les populations (Turner, 1999). De même qu'ils le jugent trop discriminant (Turner, 1999), ce qui peut avoir un impact sur la conservation car des espèces endémiques à des aires géographiques réduites peuvent être délimitées (Agapow *et al.*, 2004).

Dans le cadre d'une révision taxonomique, il est très difficile d'inclure des spécimens types d'espèces décrites durant le XVIIIème ou XIXème siècle dans les analyses phylogénétiques, et de tester par conséquent leur validité. Kullander (1999) a ainsi proposé d'abandonner l'utilisation du Code International de Nomenclature Zoologique (ICZN, Ride et al., 1999), tandis qu'une « nomenclature phylogénétique » a même été proposée (De Queiroz & Gauthier, 1990, 1994) qui sera appelée par la suite « PhyloCode » (Cantino & De Queiroz, 2007). Cette idée a suscité de multiples débats entre les phylogénéticiens et les taxonomistes (e.g. Dubois, 2005, 2007a, b, 2010; Laurin et al., 2005, 2006; Pickett 2005a, b; Kuntner & Agnarsson, 2006). Kuntner et Agnarsson (2006) précisent même qu'il n'est mentionné nulle part dans l'ICZN l'obligation de monophylie ni de synapomorphie pour valider une espèce.

Le dernier concept couramment utilisé est celui du concept évolutif *sensu* Wiley et Mayden (2000). Il intègre de façon étroitement liée la taxonomie, la phylogénie, la biogéographie et la biologie évolutive. La particularité est qu'une notion temporelle est incorporée. Selon ce concept, les espèces sont assimilées à des individus dans la nature, qui participent au processus naturels tels que la spéciation, et ont une origine ainsi qu'une fin (Mayden, 2002). Et en tant qu'individus, ces espèces peuvent être décrites et diagnosées, et des lignées évolutives peuvent être mis en évidence (Mayden, 2002; Kottelat & Freyhof, 2007).

Cependant il est critiqué par son manque d'objectivité sur la manière dont sont définies les lignées (Willmann, 1989; Mayr, 2000; Meier & Willmann, 2000), le manque de lien entre l'espèce et la spéciation (Meier & Willmann, 2000), et qu'il soit également trop discriminant (Kottelat, 1997; Mayr, 2000).

D'un point de vue méthodologique, contrairement au concept phylogénétique, la phylogénie et les outils moléculaires sont dans ce cas utilisés avec précaution. Ils ne mettent en évidence que des lignées évolutives. La validité des espèces n'est permise que s'il y a concordance avec d'autres jeux de données tels que la morphologie, l'éthologie, etc... (Wiley & Mayden, 2000 ; Kottelat & Freyhof, 2007).

Pour ces dernières raisons, nous appliquerons le concept évolutif de l'espèce dans le cadre de cette thèse, car c'est avec cette méthodologie que s'applique la taxonomie intégrative (Dayrat, 2005 ; Padial *et al.*, 2009 ; Padial & De la Riva, 2010).

# La taxonomie intégrative

La taxonomie, plus précisément l'alpha-taxonomie, est une discipline de la biologie qui identifie, décrit, classe et nomme les espèces et taxons actuels et fossiles (e.g. McKelvey, 1982; Quicke, 1993; Winston, 1999; Seberg *et al.*, 2003; Dayrat, 2005; Teletchea, 2010). La taxonomie parfois appelée « classique » (Kottelat, 1997, 1998) ou traditionnelle (e.g. Winston, 1999) utilise comme sources de données principales la morphologie, l'anatomie et l'éthologie en suivant les Codes Internationaux de Nomenclature (Teletchea, 2010). Ainsi, environ 1,7 millions d'espèces ont été décrites depuis 250 ans *via* la taxonomie « classique » (Wilson, 2000; Stoeckle, 2003; La Salle *et al.*, 2009). Depuis, des nouveaux outils sont apparus pour les systématiciens, notamment la génétique.

Avec le développement de la génétique, s'est développée la taxonomie moléculaire (sensu Tautz et al., 2003). Les individus sont regroupés en fonction de leurs séquences d'ADN pour un ou plusieurs gènes donnés, et les espèces sont délimitées par différentes approches à partir des topologies ou des distances. Il ne doit pas être confondu avec le Barcoding (sensu Hebert et al., 2003) qui est une méthode d'identification génétique uniquement sur le marqueur du COI (Teletchea, 2010). Les marqueurs moléculaires sont désormais utilisés pour compléter ou remettre en question les hypothèses basées uniquement sur la morphologie (Meier, 2009), ce qui a alimenté de vifs débats entre les systématiciens pro- et les anti- moléculaires (voir Teletchea, 2010; Pires & Marinoni, 2014).

Mais une nouvelle philosophie s'impose, celle de voir les données morphologiques et moléculaires comme complémentaires (e.g. Boero, 2010; Schlick-Steiner *et al.*, 2010; Boero & Bernardi, 2014), de ce fait il est plus judicieux de combiner ces deux jeux de données (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005; Meier, 2009; Pires & Marinoni, 2014). Tout comme il est intéressant d'employer d'autres sources de données complémentaires et indépendantes les unes des autres telles que la biogéographie, l'écologie, la cytogénétique, et les données liées à la reproduction ou au développement (Dayrat, 2005; DeSalle *et al.*, 2005; Padial *et al.*, 2009, 2010; Schlick-Steiner *et al.*, 2010; Pante *et al.*, 2015a). Cette approche est celle de la taxonomie intégrative (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005; Esselstyn, 2007; Padial *et al.*, 2009). Cette nouvelle approche de délimitation des espèces ne valide

ces dernières que si au moins deux jeux de données indépendants se corroborent mutuellement (Padial *et al.*, 2010; Schlick-Steiner *et al.*, 2010 ; Pante *et al.*, 2015a) (Fig. 10).

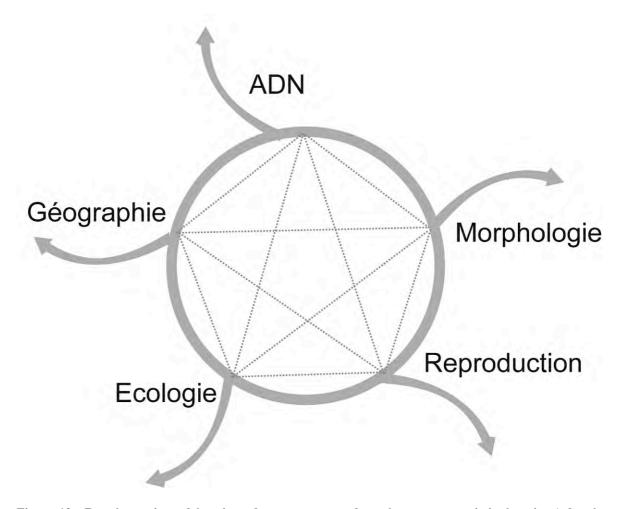


Figure 10 : Représentation schématique des congruences observées en taxonomie intégrative (adaptée de DeSalle *et al.*, 2005 et Padial *et al.*, 2010). Les lignes en pointillés relient les sources de données utilisées pour découvrir ou de soutenir des hypothèses d'espèce. La reconnaissance d'une espèce est considérée lorsque la congruence entre deux de ces sources permet de sortir du cercle (flèches).

Le nombre de publications traitant de taxonomie intégrative est en impressionnante croissance depuis une décennie (Pante *et al.*, 2015b), ce qui permet à certains taxonomistes de considérer cette approche comme le futur de la discipline (Padial *et al.*, 2010; Teletchea, 2010).

C'est avec cette approche que j'ai effectué mon travail de thèse.

# Les objectifs de la thèse

L'objectif de la thèse est de réaliser la révision taxonomique de 5 genres de poissons d'eau douce de France métropolitaine, selon une approche de taxonomie intégrative, et en valorisant les collections muséologiques à partir de spécimens enregistrés en collection et provenant de l'ensemble des bassins français.

Après avoir détaillé comment les données ont été acquises et exploitées dans le premier chapitre, nous montrerons dans un premier temps que notre ichtyofaune est mal connue en prenant l'exemple des chevesnes *Squalius* spp. Puis s'enchaîneront successivement, des exemples montrent l'importance de l'intégration des données génétiques, et en particulier de séquences avec l'exemple des épinoches *Gasterosteus* spp., l'apport des collections muséologiques avec les brochets *Esox* spp., l'intérêt des données liées à la reproduction avec les vairons *Phoxinus* spp., et celui des données environnementales avec les goujons *Gobio* spp. Enfin, un dernier chapitre fera la synthèse et discutera des résultats obtenus, et des conséquences d'un point de vue conservation.

# CHAPITRE 1 STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE ET METHODOLOGIE

# STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE ET METHODOLOGIE

Ce chapitre traite 3 points. Dans un premier temps, un petit rappel de la biologie générale des taxons d'étude est présenté, ce qui est essentiel pour comprendre la stratégie d'échantillonnage et de collecte des données présentées qui forme le deuxième point. Enfin, la dernière partie sera consacrée à l'approche de taxonomie intégrative telle qu'appliquée aux poissons d'eau douce de France.

#### Taxons d'étude

Cette thèse traite de taxonomie intégrative appliquée à 5 genres de téléostéens d'eau douce de France, incluant 3 genres de Cyprinidae (*Squalius* (chevesne), *Phoxinus* (vairon) et *Gobio* (goujon)), le genre *Esox* (brochet) et le genre *Gasterosteus* (épinoche). Tous ont longtemps été considérés comme monospécifiques en France : avec respectivement *Leuciscus cephalus*, *Phoxinus phoxinus*, *Gobio gobio*, *Esox lucius* et *Gasterosteus aculeatus* (e.g. Spillmann, 1961; Allardi & Keith, 1991; Billard, 1997; Keith & Allardi, 2001).

Il est important de rappeler les caractéristiques biologiques de chacun de ces taxons. Ce rappel se veut général, et par conséquent ne tient pas compte des récentes découvertes taxonomiques qui seront abordées dans les chapitres correspondants. Pour cela, nous suivrons l'Atlas des poissons d'eau douce de France de Keith et Allardi (2001) car il s'agit du dernier ouvrage synthétisant nos connaissances avant les premières révisions taxonomiques. Ainsi, cette connaissance générale nous permettra de connaître les habitats pour les échantillonner, ainsi que de savoir quels sont les caractères à explorer lors des révisions taxonomiques.

#### Le chevesne (Leuciscus cephalus sensu Keith & Allardi, 2001)

Le chevesne est un Cyprinidae au corps fusiforme, se caractérisant par une nageoire anale convexe aussi longue que la nageoire dorsale, ainsi qu'une bouche terminale (Fig. 1.1). Du polymorphisme a été détecté chez ce taxon, notamment dans le Sud et le Sud-Est de la France. Sa taille est généralement comprise entre 10 et 30 cm, mais certains individus atteignent les 65 cm.



Figure 1.1 : Le chevesne © E. Vigneux, ONEMA.

Le chevesne est réparti sur l'ensemble du territoire à l'exception du Nord, du Finistère, des Landes et de la Corse (où il a été récemment introduit) (Fig. 1.2).

Il occupe un large spectre d'habitats différents en rivière, depuis la zone à truite jusqu'à la zone à brème et les estuaires, avec une préférence pour les zones à ombre et à barbeau supérieur. Il cohabite parfois avec le vairon et la truite, mais surtout avec des espèces rhéophiles telles que la loche franche, le barbeau fluviatile voire des espèces plus limnophiles comme le gardon ou l'anguille. Il est capable de supporter des grandes variations de températures et de pH.

Les juvéniles de l'année se tiennent en petits groupes proches de la surface de l'eau dans des zones peu profondes où la vitesse du courant est relativement lente. Dans le cas des grands cours d'eau, on les rencontre parfois mélangés aux grands bancs de gardons et

de hotus. Les adultes deviennent moins grégaires et préfèrent les zones plus profondes à courant rapide

Il s'agit d'un poisson omnivore consommant aussi bien des invertébrés que des végétaux et des poissons pour les gros individus.

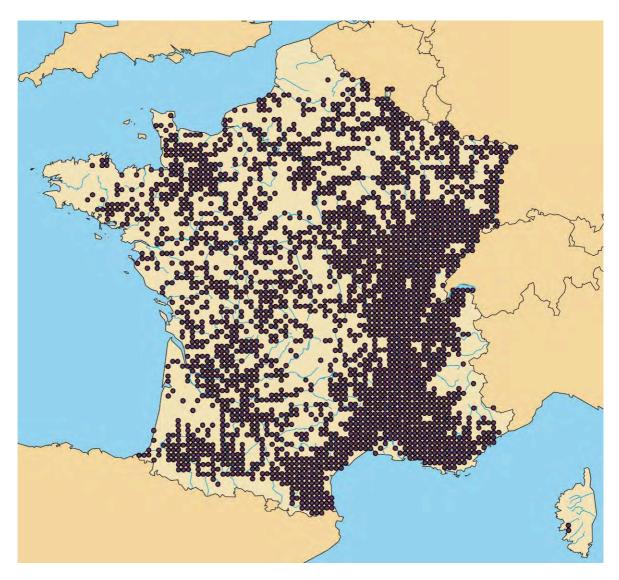


Figure 1.2 : Carte de répartition du chevesne © DMPA-MNHN/SPN, 2010.

#### Le vairon (Phoxinus phoxinus sensu Keith & Allardi, 2001)

Le vairon est un petit Cyprinidae au corps allongé de coloration olivâtre avec des taches de formes variables sur le flanc et une ligne claire à la hauteur de la ligne latérale (Fig. 1.3). Leur taille atteint généralement 8-9 cm.



Figure 1.3: Le vairon © E. Vigneux, ONEMA.

Le vairon est autochtone sur l'ensemble du territoire à l'exception de la Corse et des lacs de montagne où il a été récemment introduit (Fig. 1.4).

Il s'agit d'un poisson rhéophile qui affectionne les eaux claires de la zone à truite à la zone à barbeau. Il vit également en bancs de plusieurs dizaines à plusieurs milliers d'individus.

Durant la période de reproduction (d'avril à juillet voire août), les vairons (notamment les mâles) adoptent une parure nuptiale éclatante et très colorée, et arborent de petits tubercules nuptiaux sur le dessus de la tête. Les pontes sont multiples et fractionnées.

Enfin, c'est un petit poisson omnivore et opportuniste, pouvant consommer ses propres œufs et alevins.

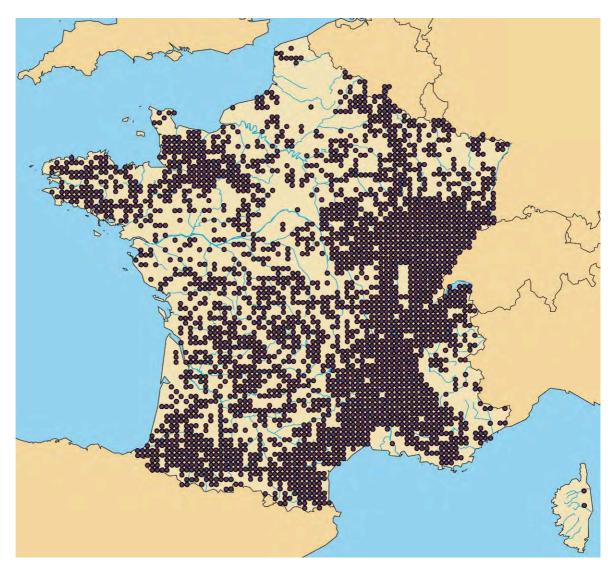


Figure 1.4 : Carte de répartition du vairon © DMPA-MNHN/SPN, 2010.

#### Le goujon (Gobio gobio sensu Keith & Allardi, 2001)

Le goujon est un Cyprinidae au corps allongé de couleur verdâtre, moucheté de brun sur le dos, les flancs et les nageoires, et au ventre blanc argenté. Sa bouche subterminale est munie d'une paire de barbillons (Fig. 1.5). Le goujon est réputé pour être très polymorphe, avec une forte variation intraspécifique des caractères méristiques et de la coloration. Il atteint une taille généralement comprise entre 10 et 15 cm.



Figure 1.5: Le goujon © E. Vigneux, ONEMA.

Le goujon est autochtone sur l'ensemble du territoire à l'exception de la Corse où il a été introduit (Fig. 1.6).

Il s'agit d'un poisson ayant une large distribution dans le bassin versant. S'il est généralement associé aux espèces de la zone à barbeau, le goujon est relativement bien représenté dans les zones à ombre et à brème, plus rarement dans la zone à truite. Il est présent en plaine comme en montagne, mais ne supporte pas les eaux trop froides ni trop chaudes. Il a une grande variabilité en traits de vie, car s'il affectionne les eaux claires à fonds de gravier, il peut s'adapter à des milieux stagnants, à fonds vaseux et riches en matières organiques comme les lacs et canaux.

La période de reproduction s'étale d'avril à juillet avec des pontes multiples et fractionnées. Enfin, le goujon est un poisson fouisseur, vivant en bancs et se nourissant de petits invertébrés benthiques.

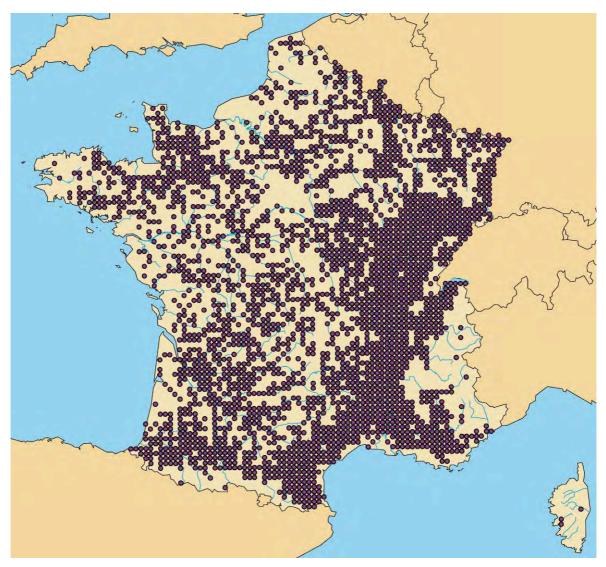


Figure 1.6 : Carte de répartition du goujon © DMPA-MNHN/SPN, 2010.

## Le brochet (Esox lucius sensu Keith & Allardi, 2001)

Le brochet est caractérisé par son corps allongé et fusiforme, une nageoire dorsale unique très reculée et opposée à l'anale, et un museau large et aplati en « bec de canard » (Fig. 1.5). La teinte générale du corps est vert clair à vert olive, et les flancs sont couverts de rayures claires obliques qui, avec l'âge, se transforment en taches oblongues et alignées longitudinalement. Il peut atteindre de très grandes tailles jusqu'à 1m30.



Figure 1.7: Le brochet © E. Vigneux, ONEMA.

S'il est présent quasiment partout en France, le brochet n'est pas natif dans le Sud-Est (Fig. 1.8).

Le brochet est un poisson limnophile, affectionnant les habitats à faible courant, et riches en végétation aquatique. On peut le rencontrer aussi bien dans les rivières à Salmonidés, que dans les bras morts des cours moyens des fleuves. Il est peu exigeant visà-vis de la température, de l'oxygène dissout, et a une certaine tolérance à la salinité.

La période de reproduction se déroule en février-mars dans les régions méridionales, et jusqu'en avril en altitude et dans les zones septentrionales.

A l'exception des premières semaines de sa vie durant laquelle il se nourrit d'insectes, le brochet est essentiellement carnassier, consommant d'autres poissons, voire des grenouilles, écrevisses et jeunes canards. Les cas de cannibalisme sont fréquents.

Ce poisson a un fort intérêt pour la pêche récréative. Et du fait de la surpêche, et de la destruction des lieux de fraie, le brochet est considéré comme vulnérable, tout en étant considéré comme « nuisible » dans les rivières à Salmonidés.

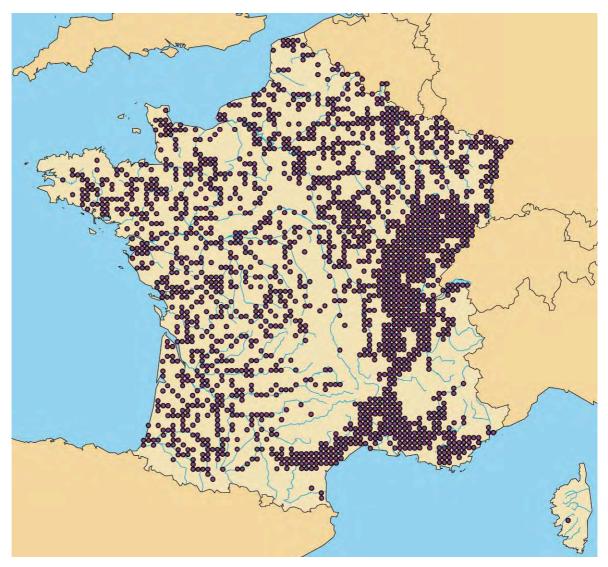


Figure 1.8 : Carte de répartition du brochet © DMPA-MNHN/SPN, 2010.

## L'épinoche (Gasterosteus aculeatus sensu Keith & Allardi, 2001)

L'épinoche est un petit poisson au corps allongé, comprimé latéralement, et arborant un nombre très variable de plaques osseuses latérales (de 1 à 25). Elle porte 2 à 4 (généralement 3) épines dorsales en avant de la deuxième dorsale (Fig. 1.9). La longueur des femelles est comprise entre 3,5 et 12 cm.



Figure 1.9: L'épinoche © E. Vigneux, ONEMA.

L'épinoche est présente dans tous les principaux bassins versants français, mais est surtout fréquente dans l'Est du pays et dans la vallée du Rhône (Fig. 1.10).

Ce poisson peut aussi bien se rencontrer en mer, en milieu saumâtre, que dans les étangs et les rivières. Il vit surtout en plaine et est absent des zones montagneuses. On le rencontre dans les herbiers des cours d'eau oxygénés, le long des berges.

La reproduction a lieu de mars à juillet, donnant lieu à des parades nuptiales remarquables. Le mâle a la gorge et les flancs d'un rouge brillant, un dos vert-bleu intense et l'iris bleu marine.

L'épinoche se nourrit essentiellement d'invertébrés aquatiques, même s'il y a beaucoup de cannibalisme.

Ce téléostéen est un organisme modèle pour la recherche en biologie, aussi bien en génétique, qu'en biologie comportementale, et en biologie évolutive.

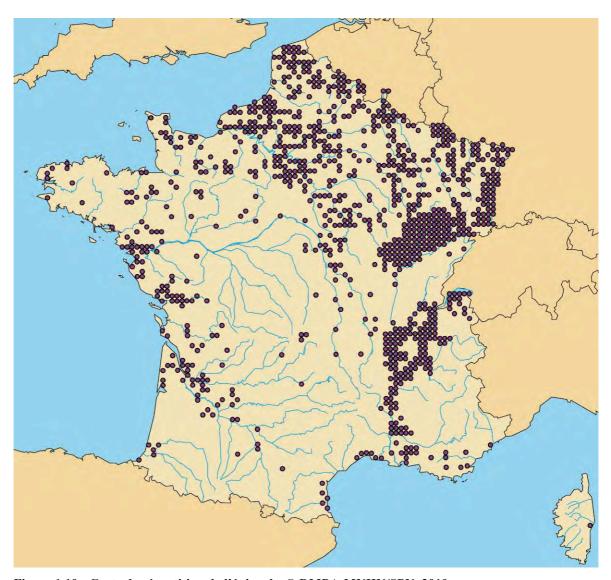


Figure 1.10 : Carte de répartition de l'épinoche © DMPA-MNHN/SPN, 2010.

# **Echantillonnage**

Pour résoudre la taxonomie des genres étudiés dans le cadre de la thèse, un échantillonnage important a été nécessaire.

Nous avons pu bénéficier des inventaires ichtyologiques par pêches électriques organisées par l'ONEMA, mais aussi par des Fédérations de Pêche et de Protection des Milieux Aquatiques, et de campagnes de terrain que nous avons mis en place et effectuées avec Henri Persat (Université de Lyon I, Claude Bernard). Les stations ont été choisies en fonction des plannings de pêches annuels de l'ONEMA, mais aussi grâce à la base de données des résultats des pêches de 2000 à 2011 (<a href="http://www.image.eaufrance.fr/">http://www.image.eaufrance.fr/</a>) qui nous a permis de sélectionner les stations hébergeant *a priori* les espèces recherchées. Parfois la pêche à la ligne a complété notre échantillonnage.

C'est ainsi que 283 stations de pêche constituent notre jeu de données (Fig. 1.11) (incluant 139 déplacements, le restant m'ayant été transmis) : plus de 600 lots d'échantillons collectés et identifiés morphologiquement (tous taxons confondus), plus de 1900 spécimens collectés, identifiés morphologiquement ou mesurés pour les analyses morpho-méristiques, parmi lesquels 465 spécimens ont été prélevés pour des analyses génétiques.

Cet échantillonnage a aussi été complété par la consultation de 215 spécimens et en particulier de 18 spécimens types dans les collections du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris (MNHN), de l'Université de Lyon 1 Claude Bernard (UCBLZ), du Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN) de Madrid, du British Museum of Natural History (BMNH) de Londres, du Linnean Society of London (LINN), du Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig (ZFMK) de Bonn, du Fischsammlung Jörg Freyhof (FSJF) de Berlin, du Naturhistoriska riksmuseet (NRM) de Stockholm, du Royal Ontario Museum (ROM) de Toronto, du Národní Museum (NM) de Prague, du Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences (ZIN) de Saint-Petersbourg et de l'Université de Washington (UW). La comparaison des spécimens collectés avec les spécimes types a permis de statuer sur la taxonomie des premiers.

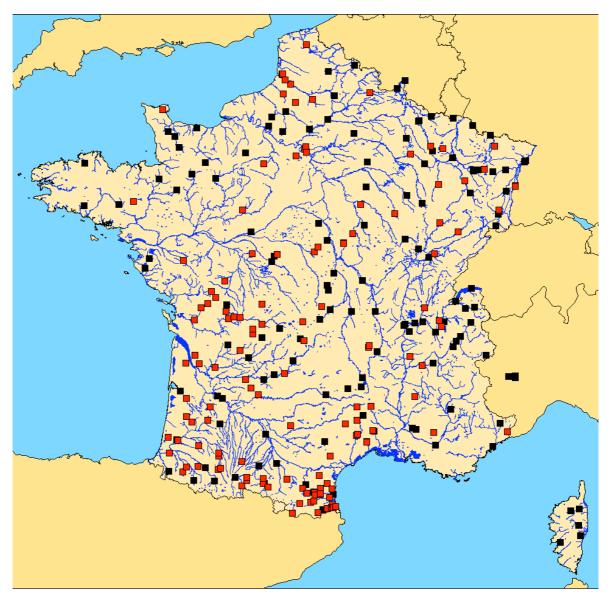


Figure 1.11 : Localisations des stations d'échantillonnages ; les déplacements avec observations de spécimens vivant et leurs milieux sont figurés par des carrés rouges.

# La pêche électrique

La plupart des échantillonnages ont donc été réalisées par pêche électrique. Le principe de cette pêche est de créer un champ électrique dans l'eau entre les deux électrodes (la cathode et l'anode). Le champ électrique émis autour de l'anode est actif sur une zone dite « attractive » ou « efficace » d'environ 1,50 à 2 mètres selon les engins utilisés, de la puissance développée et de la conductivité. Ainsi, les poissons se trouvant dans cette zone vont recevoir une décharge électrique qui va agir sur leur motricité. Leur nage va d'abord être inhibée, puis, portés par le courant les rapprochant de l'anode, les

poissons entrent dans une nage forcée vers la source du champ électrique (galvanotaxie) avant de devenir immobiles (galvanonarcose). Il ne reste plus qu'à capturer ces derniers à l'épuisette (voir Vibert *et al.*, 1960; Vibert, 1968; Cowx, 1990; Cowx & Lamarque, 1990). Concrètement, la pêche électrique peut se pratiquer aussi bien à pied qu'en bateau, de l'aval vers l'amont. A partir d'un générateur (qu'il soit portatif ou non), sont branchés un câble avec au bout une pelote de cuivre (la cathode) qui reste en permanence dans l'eau, et une perche surmontée d'un anneau métallique (l'anode) que le pêcheur manipule; une ou plusieurs personnes accompagnatrices récupèrent les captures à l'épuisette et stockent les prises dans des seaux.

Lors des pêches électriques organisées par l'ONEMA (Fig. 1.12) et les fédérations de pêche, il a été utilisé l'appareil de pêche Héron (fabriquant DREAM Electronique), un alternateur triphasé couplé à un transformateur (200–1000 V, 1–4 A) sur lequel plusieurs anodes peuvent être branchées. La mise en place des chantiers de pêches et les protocoles mis en place lors de ces campagnes ont été décrits par Belliard *et al.* (2008). Il est important de noter que ces stations d'échantillonnage ont été choisies de manière à être représentatives d'un tronçon de rivière homogène sur le plan géomorphologique et biotypologique dans le cadre classique des activités de l'ONEMA, en plus de leur accessibilité. Les habitats de nos taxons d'études n'ont donc pas été ciblés préférentiellement. De même, la longueur des stations de pêche a été définie à environ 12 à 15 fois la largeur du lit en eau. Selon la longueur de la station, les protocoles diffèrent : une pêche complète est réalisée pour les petits cours d'eau de moins de 9 m de largeur, une pêche partielle pour les plus larges par points jugés représentatifs des principaux faciès et habitats de la station.

Pour les pêches électriques non organisées par l'ONEMA ou les fédérations de pêche, nous avons utilisé un appareil portatif DEKA 3000 (fabriquant EFKO, Leutkirch, Allemagne), 30 i.s<sup>-1</sup>, 350 V, 4–6 A. Avec cet appareil, nous avons pu cibler de préférence les habitats dans lesquels se trouvent nos taxons d'étude afin de capturer spécifiquement ces derniers.

L'inconvénient de la pêche électrique est que d'une part, il est difficile de capturer certains taxons comme le brochet, ce dernier a le temps de fuir avant de se trouver dans le champ de vision de l'anode, et que d'autre part, le planning des pêches de l'ONEMA ou des fédérations de pêche n'a pas toujours été compatible avec la période où nous souhaitons capturer les espèces en fonction des critères que nous souhaitions étudier, comme les parures nuptiales des vairons par exemple. Or la période de reproduction des

vairons est située de fin avril à fin juillet, alors que les pêches ne commencent pas avant juin voire septembre. De plus, la pêche électrique étant illégale pour les particuliers, la demande d'autorisation d'utilisation de cette technique à des fins scientifiques auprès des préfectures est très longue et contraignante. Il fallait donc une autre méthode d'échantillonnage à la fois simple, efficace et surtout respectant la règlementation.



Figure 1.12 : Scène de pêche électrique organisée par l'Onema dans le Beuvron (bassin de la Seine) © G. Denys, MNHN.

# La pêche à la ligne

La pêche à la ligne ou récréative en eaux libres nécessite l'adhésion à une association agrée de pêche (AAPPMA) et l'acquittement d'une redevance individuelle (art. L436-1 du Code de l'Environnement), autrement dit, un simple permis de pêche (http://www.cartedepeche.fr/). Ainsi, le pêcheur peut utiliser au moins une ligne à une main, munie d'un ou plusieurs hameçons dans tout le domaine public. En revanche dans le domaine privé (géré par une AAPPMA), la règlementation peut être différente en fonction de l'association. Des réciprocités entre assocciations à l'échelle nationale permettent de pêcher dans des cours d'eau en étant adhérant à une autre AAPPMA. J'ai pu ainsi mettre à contribution mes plus de 20 ans de pratique de pêche à la ligne pour réaliser mes échantillonnage.

Les brochets et les vairons en période nuptiale ont été capturés à la ligne.

La pêche du brochet s'est faite au lancer (voir Barbellion, 1952 ; Duborgel, 1955), à l'aide d'une cuillère tournante métallique ou d'un « poisson-nageur ». C'est une pêche itinérante, qui permet de prospecter le long des berges, mais aussi les bras morts, les herbiers et les souches d'arbres.

La pêche des vairons s'est faite au coup (voir Prioux, 1952), à l'aide d'une canne télescopique de 3 ou 4 mètres sans moulinet, d'une ligne montée fine (10 à 8/100) et d'un hameçon de 20 sur lequel est accoché un bout de ver. Il suffit de prospecter les zones oxygénées des rivières avec du courant. Cette technique de pêche au coup permet d'obtenir de hauts rendements (Changeux, 2011).



Figure 1.13 : Brochet capturé à la ligne (au leurre) dans la Boutonne (bassin de la Charente) © G. Denys, MNHN.

#### **Conservation**

Pour pouvoir étudier la morphologie des spécimens collectés, et parce que nous avons voulu rattacher les séquences obtenues en génétique à des spécimens mis en collection (Hebert *et al.*, 2003 ; Hanner, 2009 ; Strohm *et al.*, 2015), des individus ont été conservés et ont intégré les collections du MNHN.

Pour chaque station et chaque taxon (à l'exception des brochets), 5 à 10 spécimens en moyenne de taille inférieure à 15 cm ont été fixés et conservés dans de l'alcool 95° selon une méthode de concentration progressive, afin de limiter l'altération de la forme. Les plus gros individus ont, quant à eux, été formolés après avoir découpé des bouts de nageoires conservés dans des tubes d'alcool 95°. Pour les analyses génétiques, un sous-échantillonnage de chaque lot a permis de constituer une collection de tissus. Les individus constituant chaque sous-échantillon ont été marqués par un tag, qui permet d'assurer la traçabilité de la séquence au spécimen. Pour la plupart des brochets qui ont en général été relachés, seul un bout de nageoire a été prélevé et des photos des individus ont été réalisées.

Comme l'alcool altère la coloration, pour étudier la variabilité des robes nuptiales des vairons, des photos *in vivo* à l'aide d'un appareil photo Nikon D3000 équipé d'un objectif 18-55 mm (focale standard) ont été prises, après que les spécimens aient séjournés dans un seau à fond sombre. Les individus ont été pris en photo dans le sens conventionnel (sur le côté gauche) avec une étiquette indiquant la station, et une règle avec des pastilles de couleurs de calibration (Fig. 1.14).



Figure 1.14 : Mise en place du chantier pour photographier les vairons en robe nuptiale ; ici une femelle capturée à la ligne (au coup) dans le Bourne (bassin du Rhône) © G. Denys, MNHN.

#### Gestion des données

L'ensemble des échantillonnages sur les 283 stations ayant généré énormément de données (Tabl. 1.1), il était essentiel d'en assurer une bonne gestion afin d'assurer la traçabilité des lots d'individus capturés jusqu'aux séquences obtenues. Pour cela, nous avons mis en place un protocole de gestion des données similaire à celui de Puillandre *et al.* (2012a), en assurant le lien entre la base de données des collections d'ichtyologie du MNHN (GICIM; Hureau, 1991; Pruvost *et al.*, 1996), et celle du Barcode of Life (BOLD; Ratnasingham & Hebert, 2007). Nous utilisons une autre base de données que nous avons développé pour la thèse sous Access, « NEWSP », qui permet d'exporter les

données sous GICIM et sous BOLD (Fig. 1.15), assurant ainsi les liens entre ces dernières bases de données. BOLD assure de son côté le lien vers GenBank. Cette base de données intègre à la fois les informations liées à la collecte et les stations, mais aussi sur les lots et les spécimens, les prélèvements effectués, les PCRs et les séquences réalisées (Fig. 1.16), mais permet aussi de réaliser le récollement des tissus et ADN extraits dans leurs collections correspondantes. Ainsi, après avoir intégré les informations concernant les lots et individus dans la base NEWSP, sur une simple requête, des tableaux peuvent être générées pour importation dans GICIM et BOLD selon leur format. Ce système de gestion des données a été essentiel pour la mise en place de notre travail.

Tableau 1.1 : Synthèse de la quantité de données générées en morphologie et en génétique sur les 5 genres d'étude.

	Squalius	Gasterosteus	Esox	Phoxinus	Gobio	TOTAL
Nombre de stations	32	30	32	116	94	
Nombre d'individus analysés en morphologie	155	174	49	1036	493	1907
Nombre d'individus analysés en génétique	60	68	65	118	154	465
Nombre de séquences générées	121	68	119	122	285	715

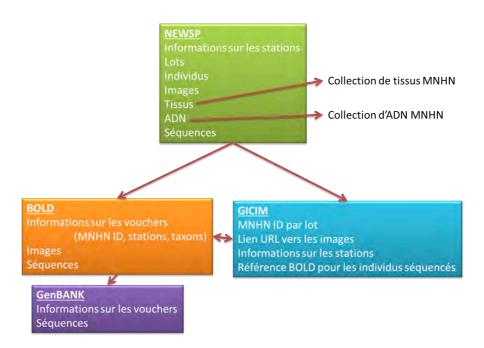


Figure 1.15 : Schéma expliquant les relations entre la base de données NEWSP avec la base de donnée du Barcode of Life BOLD (*a fortiori* GenBank), et celle des collections d'ichtyologie du MNHN GICIM.

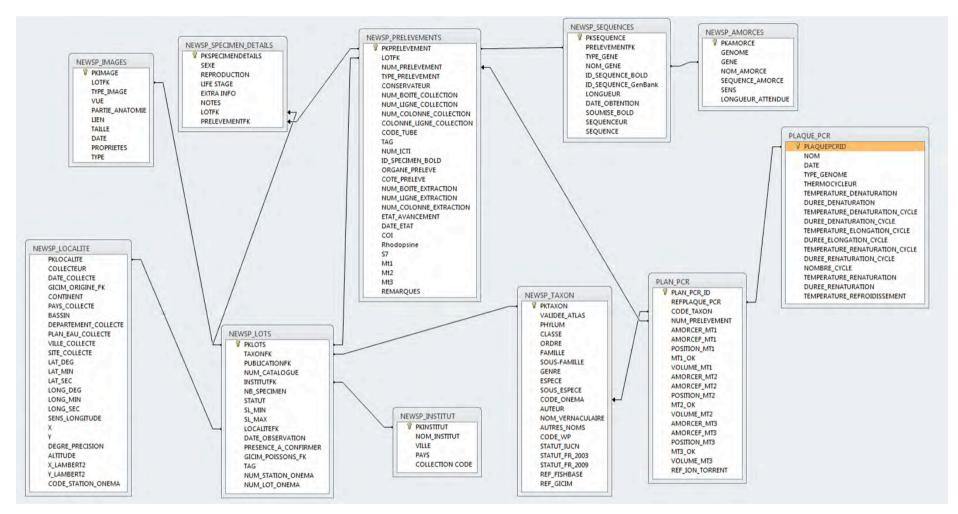


Figure 1.16 : Schéma des relations entre les différentes tables de la base de données NEWSP créée pour gérer les données.

# Taxonomie intégrative

Cette thèse est une révision taxonomique de 5 genres de poissons d'eau douce de France selon une approche de taxonomie intégrative, c'est-à-dire intégrant plusieurs sources de données différentes, telles que la morphologie, la génétique, l'écologie, la biogéographie etc...

Plusieurs protocoles méthodologiques ont été publiés sur la manière d'intégrer ces différentes sources de données dans une révision taxonomique, et comment délimiter les espèces (Dayrat, 2005 ; Will *et al.*, 2005 ; Esselstyn, 2007 ; Padial *et al.*, 2010 ; Schlick-Steiner *et al.*, 2010 ; Pante *et al.*, 2015a). Nous utiliserons l'approche de taxonomie intégrative par congruence *sensu* Padial *et al.* (2010) qui est la plus précise. Selon cette approche, si deux groupes sont distinguables avec par exemple la morphologie, et qu'ils le sont également avec les données moléculaires, liées à la reproduction, et/ou écologiques, ces derniers appartiendraient à deux espèces différentes ; sinon, il n'y aurait qu'une espèce présentant du polymorphisme. Et plus de jeux de données seront utilisées, plus l'incertitude sera importante en cas de non crongruence (Fig. 1.17).



Figure 1.17 : Schéma protocolaire de l'approche de taxonomie intégrative par congruence. L'intensité de couleur noire indique l'incertitude croissante du statut d'une espèce et le besoin d'apporter des données supplémentaires (adapté de Padial *et al.*, 2010).

Pour réaliser notre étude de taxonomie intégrative, nous avons essayé d'utiliser des jeux de données indépendants tels que la morphologie, le moléculaire, l'isolement reproductif, l'écologie, ou la biogéographie (voir Fig. 10, Introduction). Or cela n'est pas si simple, car les signaux biogéographiques en France sont brouillés par l'activité humaine (canaux, déversements), des cas d'hybridation intra et intergénériques sont connus (Scribner *et al.* 2001), et peu d'études en écologie ont été réalisées (encore moins des

études comparatives entre bassins). Néanmoins, lorsque cela était possible, un maximum de jeux de données a été exploité.

La suite de ce chapitre liste les outils dont nous avons disposés, et comment nous avons exploité les données obtenues.

## Morphologie

Chaque spécimen collecté sur le terrain ou consulté dans les collections a été identifié ou ré-identifié grâce aux critères diagnostiques fournis par le catalogue des poissons d'eau douce européens de Kottelat et Freyhof (2007) et de Keith *et al.* (2011a), ainsi que dans les articles de descriptions d'espèces ou de révision taxonomique (*i.e.* Cuvier, 1829; Casselman *et al.*, 1986; Kottelat & Persat, 2005; Doadrio *et al.*, 2007; Kottelat, 2007; Bianco & Delmastro, 2011; Lucentini *et al.*, 2011).

Dans les cas d'une révision taxonomique selon des critères morphologiques, des analyses morpho-méristiques ont été réalisées afin de dégager des caractères discriminants propres à chaque taxon (e.g. Holčík *et al.*, 1989; Kottelat & Freyhof, 2007). Ces analyses, telles que décrites par Kottelat et Freyhof (2007), consistent à:

- observer la pigmentation, la forme du corps ou de membres (exemples : position de la bouche, forme des nageoires), ou la présence ou non de certains caractères (exemple : écailles sous la gorge) ;
- effectuer une série de mesures sur le corps des spécimens (Fig. 1.18), et de les rapporter à la taille standard, ou à la longueur de la tête pour les mesures relatives à cette dernière (pour éviter les effets dûs à l'allométrie, les juvéniles sont exclus de cette analyse);
- compter les rayons de chaque nageoire, les écailles à des positions bien précises sur le corps (Fig. 1.18), ainsi que des caractères internes tels que le nombre de vertèbres à l'aide de radiographies.

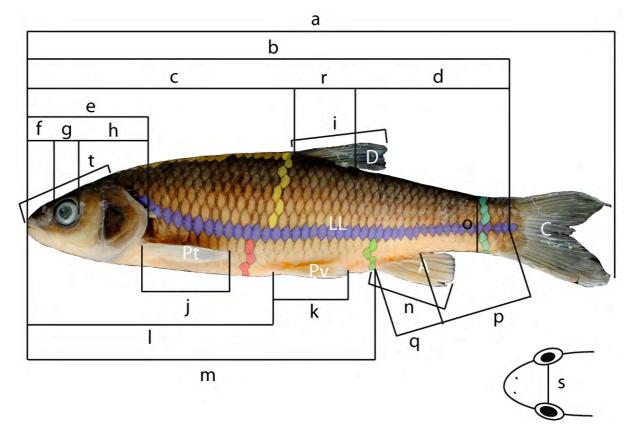


Figure 1.18: Principales mesures et comptes d'écailles effectués lors des analyses morphoméristiques: nageoire dorsale (D), nageoires pectorales (Pt), nageoires pelviennes (Pv), nageoire anale (A), nageoire caudale (C); ligne latérale (LL); longueur totale (a), longueur standard (b), longueur prédorsale (c), longueur postdorsale (d), longueur de la tête (e), longueur du museau (f), diamètre de l'œil (g), longueur postorbitaire (h), longueur de la nageoire dorsale (i), longueur de la nageoire pectorale (j), longueur de la nageoire pelvienne (k), longueur prépelvienne (l), longueur préanale (m), épaisseur du pédoncule caudal (o), longueur de la nageoire anale (n), longueur du pédoncule caudale (p), longueur de la base de la nageoire anale (q), longueur de la base de la nageoire dorsale (r), écart interorbitaire (s), longueur dorsale de la tète (t); écailles de la ligne latérale (bleu foncé), écailles transversales entre la ligne latérale et l'origine de la nageoire pelviennes (rouge), écailles transversales entre la ligne latérale et l'origine des nageoires pelviennes (rouge), écailles transversales entre la ligne latérale et l'origine des nageoires pelviennes (rouge), écailles transversales entre la ligne latérale et l'origine de la nageoire anale (vert), écailles circompédonculaires (bleu ciel), écailles prédorsales (orange) (adaptée de Kottelat & Freyhof, 2007).

Les mesures et les comptages ont été réalisés sur le côté le plus préservé (le côté droit par défaut). Toutes les mesures ont été faites point par point et non par projection, à l'aide d'un pied à coulisse électronique. Les rayons des nageoires impaires et les vertèbres (jusqu'à l'os ural 1 inclus) ont été énumérées à l'aide de radiographies (modèle Faxitron 43855F, énergie des rayons X utilisée : 40 à 70 kV en fonction de la taille des spécimens).

Enfin, lorsque cela était possible, le sexe a également été déterminé pour tenir compte du dimorphisme sexuel.

#### Génétique

Afin de compléter les études morpho-méristiques, des analyses génétiques ont été réalisées, dans le cadre d'une analyse de taxonomie moléculaire *sensu* Tautz *et al.* (2003).

#### Les marqueurs employés

Les marqueurs mitochondriaux sont principalement utilisés pour les analyses de taxonomie moléculaire car ils ont un taux d'évolution beaucoup plus élevé que celui de la plupart des marqueurs nucléaires (Brown *et al.*, 1979; Vawter & Brown, 1986; Galtier *et al.*, 2009). Ainsi, ces marqueurs plus variables permettent d'étudier des relations plus récentes.

Le marqueur mitochondrial le plus couramment utilisé dans le cadre d'une analyse de taxonomie moléculaire est la sous-unité 1 du cytochrome oxydase 1 (COI). Ce gène, codant pour une protéine de la chaîne respiratoire, possède une variabilité intraspécifique supérieure à la variabilité interspécifique dans de nombreux groupes taxonomiques dont beaucoup de Téléostéens (Ward *et al.*, 2005, 2009). Ainsi, le COI a été choisi comme marqueur de référence pour l'identification taxonomique, le *DNA-barcoding sensu* Hebert *et al.* (2003), même s'il s'est avéré manquer de variabilité chez certains groupes (e.g. Dettai *et al.*, 2011; Geiger *et al.*, 2014).

Le séquençage du COI est de plus en plus souvent étendu au génome mitochondrial complet chez les Téléostéens (Miya & Nishida, 2015). Grâce aux nouvelles technologies de séquençage (voir plus loin), le séquençage de mitogénome devient plus accessible d'un point du vue matériel et financier (Hinsinger *et al.*, sous presse<sup>2</sup>), ce qui représente désormais une nouvelle perspective de recherche en taxonomie moléculaire (Dettai *et al.*,

<sup>2</sup> Cet article sous presse dans le journal *DNA Barcodes*, fourni en Annexe 2, explique comment obtenir des séquences de mitogénome pour des coûts comparables à celui d'un séquençage de type Sanger.

HINSINGER D.D., DEBRUYNE R., THOMAS M., **DENYS G.P.J.**, MENNESSON M., UTGE M. & DETTAI A., sous presse – Fishing for barcodes in the Torrent: from COI to complete mitogenomes on NGS platforms. *DNA Barcodes*.

2012 ; Pompanon & Samadi, 2015 ; Hinsinger *et al.*, sous presse). D'autant plus que les données de mitogénome ont été employées avec succès et de manière répétée sur de nombreux groupes de Téléostéens (Miya & Nishida, 2015). Certains chercheurs considèrent même l'utilisation du COI comme dépassée et pas assez pertinente (Taylor & Harris, 2012 ; Dowton *et al.*, 2014). Les mitogénomes sont circulaires, mesurent environ 16 000 pb et codent pour 13 protéines, 2 ARNr (12S et 16S) ainsi que 22 ARNt. L'hérédité est maternelle chez les Actinoptérygiens. L'ordre des gènes est conservé pour nos groupes d'études (Ishiguro *et al.*, 2003 ; Saitoh *et al.*, 2006 ; Imoto *et al.*, 2013 ; Liu & Yang, 2014 ; Gandolfi *et al.*, 2015). L'utilisation du mitogénome est intervenue en fin de thèse, et n'est par conséquent que peu mentionnée mais fait l'objet des investigations futures et de nos perspectives.

Certains marqueurs nucléaires sont également suffisamment variables pour apporter une quantité de données comparable aux marqueurs mitochondriaux (Zhang & Hewitt, 1996). La mitochondrie étant à hérédité maternelle chez les Actinoptérygiens, les marqueurs mitochondriaux ne permettent pas de détecter les cas d'hybridation ou d'introgression, contrairement aux marqueurs nucléaires qui peuvent permettre d'identifier les allèles hérités de chacun des parents. Ainsi, l'emploi des marqueurs nucléaires, en complément des mitochondriaux, permet de valider les résultats du COI en fournissant une source indépendante supplémentaire pour la taxonomie (Vogler & Monaghan, 2007). Nous utiliserons par conséquent deux marqueurs nucléaires qui ont fait leurs preuves pour la taxonomie moléculaire des Téléostéens : le rétrogène de la rhodopsine (Rh) (e.g. Chen et al., 2003; Sevilla et al. 2007; Lautrédou et al. 2010; Collins et al. 2012; Rehbein, 2013) et le premier intron de la protétine ribosomale S7 (S7) (e.g. He et al. 2008; Mendel et al. 2008 ; Bufalino & Mayden 2010). Pour le brochet, nous avons utilisé un gène nucléaire Pleiomorphic adenoma gene-like 2 (Plagl2; Li et al., 2007) suffisamment variable pour lequel une séquence du taxon le plus proche (Esox reichertii) était disponible dans GenBank, faute d'avoir du matériel représentant les groupes externes.

#### L'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée à partir d'un fragment de nageoire conservé dans de l'alcool à 95% à 3°C.

Pour extraire l'ADN de spécimens récents, chaque fragment est déposé dans un puit d'une plaque 96 puits (12x8). L'extraction complète est réalisée à l'aide du robot EpMotion et du kit d'extraction MN Biomedical « Tissue extraction kit », en suivant le protocole du fabricant. Ainsi, les tissus sont digérés dans 180 μL de tampon de lyse et 25 μL de solution de protéinase K (75 mg de PK dans 2,6 mL de tampon soit Cm<sub>PK</sub>=28,8 mg.L<sup>-1</sup>). Les échantillons sont ensuite centrifugés et placés dans une étuve à 60°C pendant 6h minimum sous agitation. Les lysats sont déposés et l'ADN est fixé par passage sur une membrane de silicate préalablement humidifiée au NucPrep Digestion Buffer. Cette membrane chargée positivement retient l'ADN, tandis que les produits de la lyse cellulaire sont éliminés par aspiration avec 600 μL puis 900 μL de solution tampon à base d'éthanol. Toute trace d'éthanol est éliminée lors du séchage de la plaque par aspiration. Enfin, l'ADN est élué par ajout de tampon Tris-HCl 5mM. Les solutions d'ADN sont conservées dans une plaque 96 puits à -20°C.

En revanche, pour les spécimens anciens de brochets (issus des collections du MNHN), l'ADN étant dégradé, l'extraction est réalisée manuellement au CTAB (Bromure d'hexadécylTriméthylAmmonium) avec une étape utilisant du chloroforme isoamylalcool (Winnepenninckx *et al.*, 1993).

#### Amplification des fragments de gène à partir de l'ADN génomique total

Pour amplifier les fragments d'intérêt dans les gènes, il est nécessaire d'avoir les bons couples d'amorces (une forward et une reverse) ; il s'agit de courtes séquences situées dans des régions conservées. Les amorces fournissent un point de départ à partir duquel l'ADN polymérase va se fixer à l'ADN et synthétiser le brin complémentaire (sens pour la forward et anti-sens pour la reverse).

La plupart des amorces utilisées ont été extraites de la littérature. Néanmoins, une amorce reverse a été créée pour pouvoir obtenir des séquences de COI à partir des spécimens anciens de brochets des collections. Pour cela, en alignant les séquences de COI de brochet à l'aide du logiciel BioEdit (Hall, 1999), nous avons sélectionné une zone conservée entre espèces à l'intérieur du marqueur, flanquant une séquence inférieure à 200 pb (et pouvant être amplifiée à partir de matériel de collection fragmenté) et présentant de la variabilité entre espèces.

Concernant les génomes mitochondriaux complets, nous avons créé des amorces utilisables sur un large éventail de Téléostéens dans le but d'amplifier le mitogénome en trois PCRs longues. Pour cela, nous avons téléchargé de la base de données GenBank des mitogénomes déjà disponibles appartenant à plusieurs familles de Téléostéens (Cyprinidae, Esocidae, Cottidae, Nototheniidae, Gobiidae, Eleotridae, Lampridae, Zoarcidae), que nous avons alignées sous ClustalW (paramètres par défaut; Thompson *et al.*, 1994). Les régions conservées identifiées à l'oeil ont ensuite été importées dans le logiciel Oligo 4.1 (National BioScience Inc., Plymouth) afin de vérifier qu'elles conviennent à la création d'amorces. Ainsi, à l'exception du couple d'amorces 12S de Kocher *et al.* (1989), 9 couples ont été créés (Hinsinger *et al.*, sous presse).

Toutes les amorces utilisées sont listées dans le Tableau 1.2.

Les amplifications ou réactions en chaîne par polymérase (PCR) pour les marqueurs nucléaires et le COI sont réalisées dans un volume total final de 20 µL contenant 15,4 µL d'eau, 5% de DMSO (DiMéthyl SulfOxyde), 1 µL de BSA à 5 µg.mL<sup>-1</sup> (Sérum Albumine Bovine), 1 µL de dNTP 6,6mM (DésoxyNucléotide TriPhosphate), 0,15 μL de Qiagen Taq polymérase, 2 μL de tampon, 0.32 μL de chacune des amorces forward et reverse à 10pM, et enfin 2,5 à 10 µL d'ADN selon la concentration de l'extrait. La vitesse de polymérisation de la Taq polymérase pour synthétiser l'ensemble d'un fragment du gène considéré est d'environ 1000 pb (paires de bases) par minute. Un contrôle sans ADN est toujours réalisé pour vérifier l'absence de contamination. La PCR est réalisée à l'aide des thermocycleurs Biometra trioblock (T3000) ou Biorad applied 2700. Le programme de la PCR est le suivant : une dénaturation initiale de 2 min à 94°C, suivie de 50 à 60 cycles comprenant chacun une phase de dénaturation à 94°C de 20 secondes, une phase d'hybridation à 50°C de 20 secondes, une phase de polymérisation à 72°C de 50 secondes à 1 min 10 et enfin une phase finale de polymérisation à 72°C durant 3 minutes. Les échantillons sont ensuite maintenus à une température de 12°C dans le thermocycleur ou à 4°C au réfrigérateur avant l'électrophorèse. Les produits de PCR sont visualisés par migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1% avec une coloration au BET (Bromure d'Ethydium). La révélation du BET se fait par exposition aux rayons ultraviolets. Pour connaître la taille des produits amplifiés, le marqueur moléculaire XIV est utilisé comme référence sur chaque gel.

Concernant les mitogénomes, nous avons utilisés le protocole de Hinsinger *et al.* (accepté ; Annexe 2), qui diffère principalement par l'utilisation d'un tampon et d'une Taq

polymérase (Long Amp Taq) spécialement conçus pour les longues PCRs, et d'une vitesse d'élongation plus longue et à plus faible température (15 minutes à 65°C).

Tableau 1.2 : Amorces utilisées pour l'amplification des marqueurs.

Marqueur	Amorces	Séquences 5'-3'	Référence	
COI	TelF1	TCG ACT AAT CAY AAA GAY ATY GGC AC	Dettai et al. (2011)	
	TelR1	ACT TCT GGG TGN CCA AAR AAT CAR AA	Dettai et al. (2011)	
	FishR1	TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA	Ward et al. (2005)	
Mitogénome	12SL1091R	AAA CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA	Kocher et al. (1989)	
	12SH1478	TGA CTG CAG AGG GTG ACG GGC GGT GTG	Kocher et al. (1989)	
	12SH1481- Acanth	TTG GGG AGA GTG ACG GGC GRT GTG TGC	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtH20	GCC CAT TTC AAC ATC TTC AGT GTT A	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtL8	TTA ACT AAA GCA TAA CAC TGA AGA TGT	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtL5231	TAG ATG GGA AGG CTT CGA TCC TAC A	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtL5231- Cottus	TAG ATG GGT AGG CCT CGA TCC TAC A	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtL5231- Gast	TAG CTA GGC AGG CCT CGA TCC TGC A	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtL5247	GAT CCT ACA AAC TCT TAG TTA ACA GCT A	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtH7045	CTT GAA ACC AGT TTA TGG GGG TTC	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtH7061	GGG TTA TGT GGC TGG CTT GAA AC	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtH7061- Acanth	CGG TTA TGT GGT TGG CTT GAA AC	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtL9563	TCT ACG TCT CCA TCT ACT GAT GAG G	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtH9621	CAA GAC CGG GTG ATT GGA AGT CA	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtH11944	CAT AGC TTT TAC TTG GAT TTG CAC CA	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtH11944- Gast	CAT TTY TAC TCC TAC TTG GAT TTG CAC CA	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtL11910	CAG CTC ATC CAT TGG TCT TAG GAA C	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtL11910- Gast	CAG CTC ATC CAT TGG ACT TAG GAT C	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtH15027	GGC TTA CAA GAC CGG CGC TC	Hinsinger et al. (accepté)	
	MtL15023	GCC AGA GCG CCG GTC TTG TAA	Hinsinger et al. (accepté)	
Plagl2	plagl2_F9	CCA CAC ACT CYC CAC AGA A	Li et al. (2007)	
	plagl2_F51	AAA AGA TGT TTC ACC GMA AAG A	Li et al. (2007)	
	plagl2_R930	TTC TCA AGC AGG TAT GAG GTA GA	Li et al. (2007)	
	plagl2_R920	GGT ATG AGG TAG ATC CSA GCT G	Li et al. (2007)	
Rhodopsin Rh193 CNT ATG AAT AYC CTG		CNT ATG AAT AYC CTC AGT ACT ACC	Chen et al. (2003)	
	Rh1039r	TGC TTG TTC ATG CAG ATG TAG A	Chen et al. (2003)	
S7	S7univL	ACA ATT GTA AGT CGG AGA TG	Mendel et al. (2008)	
	S7univP	CCC ACA AAA TAA GAT ATT AGG	Mendel et al. (2008)	

# Séquençages

Les produits de PCR sont purifiés à l'aide d'ExonucleaseI et de Phosphatase.

La grande majorité des produits de PCR (à l'exception des mitogénomes) ont été utilisé selon la méthode « Sanger » (Sanger & Coulson, 1975 ; Sanger et al., 1977). La PCR est séquencée grâce à une polymérase, des amorces ayant servie aux PCRs et en présence d'oligonucléotides marqués. Et grâce à une électrophorèse, le détecteur du séquenceur peut lire les spectres d'émission des bases marquées au fur et à mesure que les fragments de taille différente passent devant le lecteur, et générer un chromatogramme qui permet alors de reconstituer la séquence. L'inconvénient est que cette méthode ne permet pas d'obtenir des séquences lisibles de plus de 1000 pb, et le plus souvent moins. Les séquençages « Sanger » ont été réalisés au Genoscope (Consortium National de Recherche en Génomique, Evry ; <a href="http://www.genoscope.cns.fr/">http://www.genoscope.cns.fr/</a>), ou par l'entreprise Eurofins (<a href="http://www.genoscope.cns.fr/">http://www.genoscope.cns.fr/</a>).

Mais désormais il existe de nouvelles approches de séquençage (NGS; Shendure & Ji, 2008) permettant d'obtenir un nombre très élevé de séquences. Pour notre protocole, l'ADN des PCRs est fragmenté en segments de 300 à 400 pb. Des adaptateurs sont fixés aux extrémités de ces fragments. Ils sont fixés sur des billes, puis amplifiés lors d'une PCR en émulsion qui permet des millions de réactions en parallèle dans un seul tube. Les billes chargées du résultat de cette PCR sont réparties dans les puits d'une puce électronique qui permettra de séquencer indépendamment par synthèse: les nucléotides incorporés à chaque brin d'ADN délivrent un signal reconnu par le séquenceur, et la succession des signaux enregistrés permet de reconstituer des séquences pour chaque puit.

Les séquences fragmentaires qui sont produites lors du séquençage sont assemblées par similarité pour donner les séquences d'intérêt. Cette méthode de séquençage permet d'obtenir après assemblage des fragments d'ADN bien plus longs que ceux du Sanger (plusieurs milliers de pb), et c'est avec cette méthode que nous séquençons les mitogénomes, à l'aide du séquenceur PGM IonTorrent. Afin de réduire considérablement les coûts de séquençage, nous avons établi un protocole en multiplexant les produits de PCR dans des banques individualisées par des tags uniques présents dans les adaptateurs. Un deuxième niveau de pultiplexage est introduit en mélangeant à l'intérieur d'une même banque les produits de PCR de taxons suffisamment éloignés pour pouvoir les individualiser et les identifier lors de la reconstruction des séquences (Dettai *et al.*, 2012; Hinsinger et al., sous presse). Ainsi, au lieu de séquencer un seul mitogénome par séquençage pour 280€ (Murienne *et al.*, 2015), nous arrivons à 7,50€ par séquence et par séquençage (Hinsinger *et al.*, sous presse), ce qui permet d'obtenir de multiples séquences pour refléter la diversité intra et interspécifique.

#### Vérification, nettoyage et alignement des séquences

Les séquences sont vérifiées et nettoyées à l'aide du logiciel CodonCode Aligner version 2.0.6 (<a href="http://www.codoncode.com/aligner/">http://www.codoncode.com/aligner/</a>). Les séquences forwards et reverses sont superposées. Les ambiguïtés sur une séquence d'ADN sont levées en comparant la séquence du deuxième brin. Une fois nettoyées, les séquences sont alignées à l'aide du logiciel MUSCLE (Edgar, 2004), hormis pour le S7 pour lequel nous avons utilisé ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) en raison des indels (insertions ou délétions dans une séquence par rapport à une séquence de référence).

Lorsque les individus présentent des ambiguïtés dans la séquence pour un gène nucléaire c'est qu'ils sont hétérozygotes (ils présentent deux allèles différents à un locus donné). Les séquences hétérozygotes des gènes nucléaires ont été séparées en deux allèles en utilisant des séquences homozygeotes comme guides (e.g. Sousa-Santos *et al.* 2005) provenant du même bassin avec les logiciels SEQPHASE (Flot, 2010) et PHASE (Stephens *et al.*, 2001). Seuls les allèles ayant une probabilité de plus de 90% ont été conservées pour l'analyse. Les individus présentant une ambiguïté sur un gène mitochondrial ont été re-séquencés.

Les séquences obtenues par NGS ont été assemblées à l'aide du logiciel Geneious V7 (Kearse *et al.*, 2012) et à l'aide de séquences de référence disponibles sur GenBank.

## Analyses phylogénétiques

Dans le cadre de cette thèse, la reconstruction phylogénétique entre les individus repose sur des données moléculaires, à savoir des séquences nucléotidiques. Différentes méthodes de reconstructions phylogénétiques permettent de traiter les données : les méthodes de distances, de parcimonie ou probabilistes (voir Darlu & Tassy, 1993 ; Felsenstein, 2004). Nous avons choisi la méthode de reconstruction phylogénétique selon une approche probabiliste, car elle prend en considération toutes les possibilités de mutations nucléotidiques entre les séquences (comme les transitions  $A \leftrightarrow G$  ou  $C \leftrightarrow T$  et les transversions  $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow$ 

emploient : la méthode du maximum de vraisemblance et l'approche bayésienne (Felsenstein, 2004). La méthode du maximum de vraisemblance sélectionne l'arbre qui maximise la vraisemblance expliquant le mieux le jeu de données. L'approche bayésienne, quant à elle, donne une distribution de probabilité *a priori* aux différents arbres construits et réalise des inférences à partir de la distribution *a posteriori* de ces mêmes arbres. La plupart de nos analyses ont été réalisées selon une approche bayésienne.

Dans les méthodes probabilistes, il est nécessaire de calculer les paramètres du modèle d'évolution décrivant les probabilités de substitution d'un nucléotide par un autre. Ces modèles comprennent différents paramètres comme les fréquences nucléotidiques et les taux de substitution. Différents modèles existent, du plus simple considérant une fréquence pour chaque nucléotide et un taux de substitution identique (Jukes & Cantor, 1969), au plus complexe avec des fréquences nucléotidiques différentes pour chaque nucléotide et 6 taux de substitution différents (GTR; Yang, 1994). Ces modèles font l'hypothèse d'un taux de substitution unique pour chaque site, or chaque site ne mute pas à la même vitesse, certains ne changeant pas du tout. Ainsi, il est possible d'ajouter aux modèles de substitution une fraction de sites invariables (I). De la même manière, le continuum de la variabilité des taux entre les sites sont modélisés par des distributions continues appelées gamma (Γ). En effet, le changement du paramètre alpha de la loi gamma permet de décrire une large gamme de distribution sans rajouter de multiples paramètres additionnels (Galtier, 2001). Le calcul des modèles s'est fait avec JModelTest 2.1.1 (Darriba et al. 2012) qui prend en compte 88 modèles globaux de substitution différents en incluant les paramètres Γ et I. Le choix du modèle est réalisé selon 4 approches: hLRT 'hierarchical Likelihood Ratio Tests', AIC 'Akaike Information Criterion', BIC 'Bayesian Information Criterion' ou DT 'Decision Theory'. Pour nos analyses nous avons utilisé le AIC.

Dans sa forme générale, la vraisemblance (L) est la probabilité d'observer les données sous un modèle particulier. Dans un contexte phylogénétique, il s'agit de la probabilité (Pr) d'observer le jeu de données X (alignement de séquences) étant donné un arbre T avec une topologie particulière.

$$LX = Pr(X/T)$$

Le maximum de vraisemblance est un cas étendu de la parcimonie où les taux d'évolution peuvent varier le long des séquences et en fonction des lignées (Felsenstein,

1981; Yang, 1994). En maximum de vraisemblance, il s'agit théoriquement de trouver l'ensemble des topologies et des longueurs de branches possibles. Cette approche n'a été utilisée que lorsque peu de variabilités ont été observées sur les marqueurs, notamment la rhodopsine. Les analyses en maximum de vraisemblance (ML) ont été réalisées avec le logiciel MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Afin de connaître la robustesse de l'arbre résultant, il est nécessaire d'appliquer la méthode du bootstrap (Felsenstein, 1985). Elle consiste à calculer un nouvel arbre optimal provenant d'un nouvel alignement créé à partir de sites tirés aléatoirement avec remise provenant de l'alignement d'origine, et de comparer les topologies. Cette opération est répétée 1000 fois. Plus le nœud d'un arbre est retrouvé dans les autres, plus on considère le nœud comme robuste, et cette robustesse est exprimée en pourcentage d'occurrence parmi les nouveaux arbres optimaux créés.

La reconstruction phylogénétique par inférence bayésienne formalise le calcul de probabilités postérieures *a posteriori* d'un arbre phylogénétique à partir de probabilités définies *a priori*. L'inférence bayésienne combine la probabilité (Pr) *a priori* et la vraisemblance des données X sachant l'arbre T pour produire une probabilité postérieure sur les arbres en utilisant la formule de Bayes :

$$Pr(T/X) = Pr(X/T) * Pr(T) / Pr(X)$$

La probabilité postérieure d'un arbre est interprétée comme étant la probabilité qu'un arbre soit vrai connaissant les données. La formule analytique des probabilités postérieures étant impossible à résoudre, l'estimation de ces dernières se fait donc par l'approche algorithmique MCMC (Markov Chain Monte Carlo). L'idée est qu'une chaîne de Markov prend la forme d'une marche guidée où chaque pas explore l'espace multidimensionnel des paramètres. L'échantillonnage régulier des valeurs de ces paramètres permet de définir une distribution de probabilités, la marche guidée échantillonnat davantage des les régions avec des probabilités plus élevées. Le cadre bayésien permet de faire des inférences c'est-à-dire d'imaginer les propriétés d'un taxon à partir d'un échantillon décrit statistiquement. Moyennant une distribution initiale (priors) de tous les paramètres (topologie, longueurs de branches, taux relatif de substitution) autres que les données, la formule de Bayes permet le calcul des distributions finales (posteriors) de ces paramètres. Ainsi, il est possible de connaître les probabilités des hypothèses formulées. Le calcul de Pr (T / X) étant impossible, le MCMC permet de générer un échantillon de plusieurs dizaines de milliers d'arbres qui suit la distribution de probabilité Pr (T / X). Cet échantillonnage a été réalisé ici grâce au logiciel MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012), à travers quatre chaînes de Markov de 10 millions de générations (pas) dont on supprime le début (burnin de 10%) et qu'on sous-échantillonne toutes les 200 générations. On obtient alors 4 500 arbres. La topologie finale représente le consensus majoritaire à 50%. A chaque clade est associée la fraction d'arbres échantillonnés contenant le clade en question, ce qui correspond aux probabilités postérieures que le clade correspondant soit vrai.

# Interprétation des données selon une approche de taxonomie moléculaire

Différentes méthodes ont été publiées pour délimiter les espèces en fonction des divergences entre les groupes (Pons *et al.*, 2006; Yang & Rannala, 2010; Hao *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2011; Puillandre *et al.*, 2012b; Ratnasingham & Hebert, 2013). Une approche plus grossière est de considérer que 2 groupes d'Actinoptérygiens qui ont une divergence supérieure à 3%, sont des espèces distinctes (e.g. Mendel *et al.*, 2012; Geiger *et al.*, 2014; Knebelsberger *et al.*, 2015). Certaines espèces valides de Téléostéens ont cependant une divergence interspécifique très inférieur à cette valeur (e.g. Dettai *et al.*, 2011; Geiger *et al.*, 2014). Par conséquent, nous avons confronté les topologies des arbres phylogénétiques pour plusieurs marqueurs indépendants, et comparé avec les groupes identifiés *via* des caractères morphologiques. Nous avons également calculé les distances intra- and inter-specifiques (p-distances) à l'aide du logiciel MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013), et identifié les synapomorphies dans les séquences à savoir les bases nucléotidiques partagées.

#### Identification moléculaire

Les arbres phylogénétiques ont permis de délimiter les taxons et de constituer une base de référence. Grâce à celle-ci, l'identification des spécimens anciens issus des collections du MNHN a pu être confirmée génétiquement selon le principe du barcoding sensu Hebert *et al.* (2003) en utilisant un fragment du COI (131 pb) (Meusnier *et al.*, 2008). Pour cela, les séquences ont été alignées avec le reste du jeu de données pour ce taxon. L'alignement a été ramené à la longueur des fragments courts. Une analyse de distance, dit « Neighbour Joining », sur un modèle de paramètre Kimura 2 (Kimura, 1980)

est ensuite réalisée. Ainsi, nos séquences à identifier vont être regroupées avec les séquences de référence en clusters, qui dans ce cas correspondent aux espèces.

#### Le jeu de données

Dans le cadre de cette thèse, au total, 715 séquences (sans compter les mitogénomes en cours d'acquisition) ont été obtenues pour les analyses phylogénétiques, et pour les 5 genres d'études (121 pour *Squalius*, 68 pour *Gasterosteus*, 119 pour *Esox*, 122 pour *Phoxinus* et 285 pour *Gobio*). Chaque marqueur a été analysé indépendamment pour évaluer la corroboration entre marqueurs. Comme les marqueurs mitochondriaux sont plus variables et plus informatifs que nos marqueurs nucléaires, et qu'il y a des possibilités d'hybridations entre les taxons, nous n'avons pas réalisés d'analyses avec les marqueurs concaténés. Enfin, pour les gènes mitochondriaux, le jeu de données a été partitionné en fonction de la position de codons.

### **Ecologie**

Peu d'études sur l'écologie des espèces à l'échelle du bassin versant ont été réalisées et malheureusement, la plupart des publications analysent les données écologiques à l'échelle nationale voire européenne, ne considérant qu'une seule espèce de goujon, vairon, brochet, etc...

Dans cette thèse, nous étudierons les niches écologiques occupées par les différentes espèces de goujons à partir de spécimens de goujons clairement identifiés puisque nous avons pour ce groupe suffisamment de données. Le concept de niche, tel que Hutchinson (1957) le décrit, considère la niche écologique d'une espèce comme un hyperespace multidimensionnel au sein duquel les populations peuvent subsister. Elle est définie par la combinaison de gradients environnementaux coexistants et par les relations fonctionnelles avec les autres espèces (Whittaker *et al.*, 1973).

La grande majorité de nos échantillonnages ont été réalisées sur des stations de l'ONEMA qui sont associées à des données environnementales (Banque Hydrobiologique et Piscicole) telles que l'altitude (ELE), la distance par rapport à la source (DIS), la largeur (WID), la profondeur (DEP), la pente (GRA), la surface du bassin versant (SAD), et les températures de janvier et de juillet (respectivement T<sub>january</sub> et T<sub>july</sub>). Ces données

environnementales permettent notamment de calculer l'indice poisson rivière (IPR ; Oberdorff *et al.* 2002) ; elles seront utilisées dans notre étude.

Il s'agira d'une étude préliminaire avec une *Outlying Mean Index* (OMI) qui analyse les niches destinées aux études de gradient dans lesquelles la variance des présences des espèces est maximisée le long d'axes de coordination provenant de l'entrée de données environnementales (Dolédec *et al.*, 2000). Pour calculer la marginalité, c'est à dire le lien entre les espèces et les variables environnementales décrivant le milieu de vie, nous utilisons le test de permutation de Monte Carlo avec 1000 itérations.

Pour ce faire, les variables environnementales ont été normalisées selon la méthode d'Oberdorff *et al.* (2001) afin de calculer l'élévation (E), le gradient longitudinal (G), la vélocité (V) et les deux variables indépendantes liées aux besoins des espèces de poissons (T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>; voir Sokal & Rohlf, 1995):

$$\begin{split} E &= log~(ELE) \\ G &= 3,015 - 0,347~x~log~(SAD_{Km}) - 0,543~x~log~(DIS_{Km}) \\ V &= log~(WID_m) + log~(DEP_m) + log~(GRA_m) - log~(WID_m + 2~x~DEP_m) \\ T_1 &= T_{july} + T_{january} \\ T_2 &= T_{july} - T_{january} \end{split}$$

Une matrice de variables sera générée avec, pour chaque station, les données environnementales calculées, ainsi que la présence ou absence (0 ou 1) de chaque espèce de goujons et d'autres espèces peuplant les cours d'eau (Tabl. 1.3).

Les analyses statistiques ont été réalisées sous R (R Core Team, 2014) à l'aide du module ade4 (Chessel *et al.*, 2004 ; Dray & Dufour, 2007 ; Dray *et al.*, 2007).

Pour réaliser cette étude, nous avons sélectionné 152 stations pour lesquelles toutes les variables environnementales sont renseignées de 1978 à 2011, et pour lesquelles les goujons collectés ont été clairement identifiés morphologiquement et génétiquement.

Tableau 1.3 : Liste des taxons utilisés pour les analyses en écologie.

ABBREVIATION	NOM SCIENTIFIQUE	NOM VERNACULAIRE	
ABH	Leucaspius delineatus (Heckel, 1843)	Able de Heckel	
ABL	Alburnus alburnus (Linnaeus, 1758)	Ablette	
AFL	Alosa fallax (Lacepède, 1803)	Alose feinte	
ANG	Anguilla anguilla (Linnaeus, 1758)	Anguille européenne	
ASP	Leuciscus aspius (Linnaeus, 1758)	Aspe	
BAF	Barbus barbus (Linnaeus, 1758)	Barbeau fluviatile	
BAM	Barbus meridionalis Risso, 1827	Barbeau méridional	
BLB	Micropterus salmoides (Lacepède, 1802)	Black-Bass	
BLG	Telestes souffia (Risso, 1827)	Blageon	
BLN	Salaria fluviatilis (Asso, 1801)	Blennie fluviatile	
BOU	Rhodeus amarus (Bloch, 1782)	Bouvière	
BRE	Abramis brama (Linnaeus, 1758)	Brème commune	
BRB	Blicca bjoerkna (Linnaeus, 1758)	Brème bordelière	
BRO	Esox spp	Brochet	
CAS	Carassius spp	Carassin	
CAP	Cyprinus carpio Linnaeus, 1758	Carpe	
СНА	Cottus spp	Chabot	
CHE	Squalius spp	Chevesne	
EPI	Gasterosteus aculeatus Linnaeus, 1758	Epinoche	
EPT	Pungitius spp	Epinochette	
FLE	Platichthys flesus (Linnaeus, 1758)	Flet	
GAR	Rutilus rutilus (Linnaeus, 1758)	Gardon	
GOA	Gobio alverniae Kottelat & Persat 2005	Goujon d'Auvergne	
GOU	Gobio gobio (Linnaeus, 1758)	Goujon commun	
GOL	Gobio lozanoi Doadrio et Madeira 2004	Goujon de l'Adour	
GOO	Gobio occitaniae Kottelat & Persat 2005	Goujon occitan	
GRE	Gymnocephalus cernua (Linnaeus, 1758)	Grémille	
HOT	Chondrostoma nasus (Linnaeus, 1758)	Hotu	
LPP	Lampetra planeri (Bloch, 1784)	Lamproie de Planer	
LPM	Petromyzon marinus Linnaeus, 1758	Lamproie marine	
LOR	Cobitis taenia Linnaeus, 1758	Loche de rivière	
LOF	Barbatula barbatula (Linnaeus, 1758)	Loche franche	
LOT	Lota lota (Linnaeus, 1758)	Lote de rivière	
OMB	Thymallus thymallus (Linnaeus, 1758)	Ombre commun	
PER	Perca fluviatilis Linnaeus, 1758	Perche commune	
PES	Lepomis gibbosus (Linnaeus, 1758)	Perche soleil	
PCH	Ameiurus melas (Rafinesque, 1820)	Poisson chat	
ROT	Scardinius erythrophthalmus (Linnaeus, 1758)	Rotengle	
SAN	Sander lucioperca (Linnaeus, 1758)	Sandre	
SAT	Salmo salar Linnaeus, 1758	Saumon atlantique	
SIL	Silurus glanis Linnaeus, 1758	Silure	
SPI	Alburnoides bipunctatus (Bloch, 1782)	Spirlin	
TAN	Tinca tinca (Linnaeus, 1758)	Tanche	
TOX	Parachondrostoma toxostoma (Vallot, 1837)	Toxostome	
TAC	Oncorhynchus mykiss (Walbaum, 1792)	Truite arc-en-ciel	
TRF	Salmo trutta Linnaeus, 1758	Truite de rivière	
VAI	Phoxinus spp	Vairon	
VAN	Leuciscus spp	Vandoise	

#### Connaissances naturalistes

Enfin, pour compléter nos études, nous utiliserons aussi un certain nombre d'ouvrages réalisés par des naturalistes du XIXème ou du XXème siècle à l'échelle régionale ou départementale (Millet, 1828 ; Fournel, 1836 ; Vallot, 1837 ; Mauduyt, 1848 ; Laporte, 1853 ; Ogérien, 1863 ; Villattes des Prûgnes, 1897 ; Moreau, 1899 ; Piton, 1931 ; Spillmann, 1961 ; Yvernault, 1972 ; Magnan, 1982), voire des pays voisins (Heckel, 1836 ; Heckel & Kner, 1858 ; Leunda *et al.*, 2010). Ces ouvrages se sont avérés une ressource précieuse pour compléter nos connaissances sur la distribution des espèces aujourd'hui brouillée par les opérations de repeuplements. Ils apportent des informations sur la présence des taxons à une époque donnée, mais aussi parfois sur leur biologie.

L'intégralité des jeux de données (morphologiques, génétiques, biogéographiques, liées à la reproduction, écologiques etc...) étudiés durant notre thèse nous permettra d'avoir des éléments nécessaires pour délimiter les espèces selon une approche de taxonomie intégrative, et d'enrichir nos connaissances sur l'ichtyofaune dulçaquicole française.

Le premier groupe d'espèces sur lequel nous avons travaillé est le genre *Squalius* (chevesnes).

# **CHAPITRE 2**

# CONFIRMATION D'ESPECES DECRITES RECEMMENT : LE CAS DES CHEVESNES (SQUALIUS SPP)

# CONFIRMATION D'ESPECES DECRITES RECEMMENT : LE CAS DES CHEVESNES (SQUALIUS SPP)

#### Préambule

Le chevesne *Squalius cephalus* (Linnaeux, 1758) est un exemple de taxon qui a longtemps été considéré comme monospécifique en France. Or une révision taxonomique des chevesnes de Catalogne française et espagnole a mis en évidence en 2007 une nouvelle espèce de chevesne endémique à cette région : le chevesne catalan *Squalius laietanus* Doadrio *et al.*, 2007 (Fig. 2.1).

Selon ces auteurs, le chevesne catalan se distingue du chevesne commun, entre autres, par une bouche en position subterminale (*vs.* terminale ; Fig. 2.2), ainsi que par une pigmentation sur les écailles du flanc conférant ainsi de légères rayures longitudinales sur le flanc (*vs.* pas de pigmentation ; Fig. 2.3).

Cette distinction morphologique a également été corroborée par la génétique, validant ainsi l'espèce selon une approche de taxonomie intégrative, mais uniquement sur des spécimens espagnols. Or des spécimens français provenant de l'Agly avaient également été désignés comme paratypes (CMK 17564, MNHN 2011-0035). Malheureusement, ces individus ayant été conservés en formol, aucune analyse génétique n'est possible pour vérifier la présence du *S. laietanus* en France.

C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, une étude a été réalisé en collaboration avec l'Université de Lyon 1 Claude Bernard, ainsi qu'avec le Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (MNCN) dans l'objectif de vérifier avec des données génétiques la présence du chevesne catalan en France sur l'ensemble des bassins versants catalans français.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2013 dans le journal *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* (voir ci-après).



Figure 2.1: le chevesne catalan Squalius laietanus (Massane). ©F. Melki/BIOTOPE

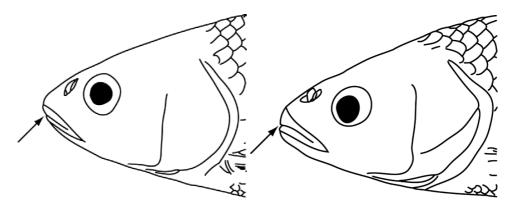


Figure 2.2: Bouche subterminale du *S. laietanus* (a), bouche terminale du *S. cephalus* (b). ©G. Denys / MNHN.

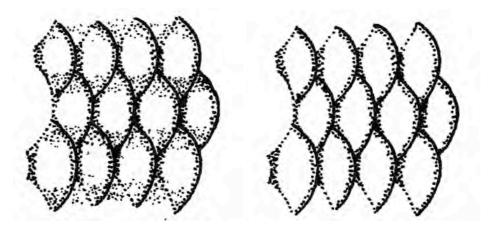


Figure 2.3: Pigmentation des écailles du flanc chez S. laietanus (a), et chez S. cephalus (b); dessins adaptés de Doadrio et al. (2007).

Le statut du chevesne catalan *Squalius laietanus* (Actinopterygii, Cyprinidae) en France : apport des données morphologiques et moléculaires

## Article publié<sup>3</sup>

**Résumé.** - Il y a deux espèces de chevesnes dans les bassins versants français, le chevesne commun *S. cephalus* et le chevesne catalan *S. laietanus* restreint aux Pyrénées Orientales. Les spécimens espagnols des deux espèces sont clairement distinguables aussi bien sur le plan morphologique que sur le plan moléculaire, mais aucun spécimen français n'avait été testé. 32 stations sur tout le réseau hydrographique français ont permis de collecter 155 spécimens dont 60 ont été utilisés pour les analyses moléculaires sur les marqueurs du COI et de la rhodopsine. Deux haplotypes sont présents pour sur le marqueur du COI, indiquant la présence du *S. laietanus* en France du bassin de la Massane à l'Agly. Les deux espèces sont sympatriques dans certaines stations. Il n'y a pas toujours de congruence entre les résultats moléculaires et les données morphologiques, suggérant d'éventuelles hybridations entre les deux espèces. *S. laietanus* pourrait être menacé en France et son statut de la Liste Rouge doit être réévalué afin d'entreprendre des mesures de conservation.

#### Mots-clés

Squalius laietanus, Squalius cephalus, France, taxonomie moléculaire, hybridation

<sup>-</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> DENYS G.P.J., DETTAI A., PERSAT H., DOADRIO I., CRUAUD C. & KEITH P., 2013 – Status of the Catalan chub *Squalius laietanus* (Actinopterygii, Cyprinidae) in France: input from morphological and molecular data. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.*, 408(4): 1-13.

**Abstract.** - Status of the Catalan chub *Squalius laietanus* (Actinopterygii, Cyprinidae) in France: input from morphological and molecular data.

Two species of chubs in French drainages: the common chub *S. cephalus* and the Catalan chub *S. laietanus* restricted to Oriental Pyrenees (South of France). Morphological and molecular characters distinguishing the two species have been described on Spanish specimens, but not tested on French samples. 32 sites were sampled throughout the French water system, yielding 155 specimens of which 60 were sequenced for two molecular markers COI and rhodopsin. Two divergent haplotypes for COI are found, and indicate the presence of *S. laietanus* in France (from Massane to Agly basins). In some sites, both species are sympatric. In some cases, molecular results partially disagree with morphological data, suggesting possible hybridizations between the two. This might threaten Catalan chub in France, and its red list status should be re-evaluated in order to undertake conservation measures.

During two centuries, only one species of chub (Squalius, Actinopterygii, Cyprinidae) was known in France. It was however separated into two subspecies (Spillmann, 1961): a common form Leuciscus cephalus (Linnaeus, 1758) currently valid as Squalius cephalus (Linnaeus, 1758), and a meridional form L. cephalus cabeda (Risso, 1827) currently valid as S. squalus (Bonaparte, 1837). Kottelat and Freyhof (2007, p. 275, 623), based on data cited as "Kottelat 2007b in press" considered the two French subspecies as synonyms. Doadrio et al. (2007) described a new species of chub, S. laietanus from Northeast Spain, from Ebre (Spain) to Agly (France) drainages on the basis of both morphological and cytochrome b sequence data. S. laietanus mainly differs from S. cephalus by having a mouth slightly subinferior (vs. terminal with well marked chin), lots of brown pigments on the upper and lower tips of the exposed part of the scales forming faint longitudinal stripes between scale rows (vs. no or few pigments on scales, forming clearly contrasted reticulate pattern), and 17 to 20 branched rays at pectoral fin (vs. 14 to 17). Genetic studies on S. laietanus were performed on Spanish specimens only (e.g. Doadrio et al., 2007; Perea et al., 2010), and never included French samples. However Doadrio (unpublished data) noticed that French S. laietanus populations differ morphologically from Spanish S. laietanus specimens. We therefore aim to (i) study the morphology and two DNA markers on a large and representative sampling from the French drainages: the mitochondrial gene coding for cytochrome C oxidase subunit 1 (COI) and the nuclear rhodopsin retrogene, (ii) compare the morphological and molecular characters and evaluate the presence of *S. laietanus* in France.

Sampling operations were performed in 2010 and 2011 with the collaboration of the French National Agency for Water and Aquatic Environments (Onema), the Fédération Nationale de la Pêche en France (FNPF), and Associations agréées de pêche et de protection des milieux aquatiques (AAPPMA). 155 specimens were caught by electrofishing in 32 stations, in the major drainages (Seine, Loire, Garonne, Rhine, Rhône, Adour), with a higher collection effort on the Mediterranean basins as Agly, Massane and Tech drainages (8 locations) (Fig. 2.4). Fin clips were collected for molecular study in EtOH, and specimens were fixed in formalin. Specimens smaller than 15 cm were fixed by steps in 95% ethanol. All the specimens were identified morphologically using diagnostic characters given by Doadrio *et al.* (2007). 60 specimens were used for DNA analyses. Tissue samples from well identified Spanish *S. laietanus* were also included (see appendix 1). For DNA extraction, PCR, sequencing and quality control, we followed Dettai *et al.* 

(2011) except for the use of CodonCode Aligner 3.9 (Codon Code Corporation) for sequence cleaning and control. This yielded two datasets: partial COI gene (567 pb) and partial rhodopsin retrogene (755 pb), in which we also included some sequences from other Squalius species available in BOLD and GenBank, as well as Alburnoides, Chondrostoma, Leuciscus and Rutilus sequences as outgroups (Perea et al. 2010) (Appendix 3). All new sequences were deposited in the Barcode of Life database (Ratnasingham and Hebert, 2007) with their voucher information. BOLD and GenBank Accession numbers are listed in appendix. Alignment was performed manually, as neither marker includes indels. Heterozygous sequences of rhodopsin were separated into the two alleles using as guides homozygote sequences (e.g. Sousa-Santos et al., 2005) from the same drainage with SEQPHASE (Flot, 2010) and PHASE (Stephens et al., 2001). Phylogenetic analyses were performed with Bayesian inference (MrBayes 3.2, Ronquist et al., 2012). For COI, a model computed by JModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012), and partitioned by codon position was specified, on four analyses with 10 million generations and sampling every 200 generations. For rhodopsin, the dataset was not partitioned because of the low sequence variability. 10% of trees were eliminated as burnin after checking convergence. Intra- and inter-specific distances (p-distances) were calculated with the software MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

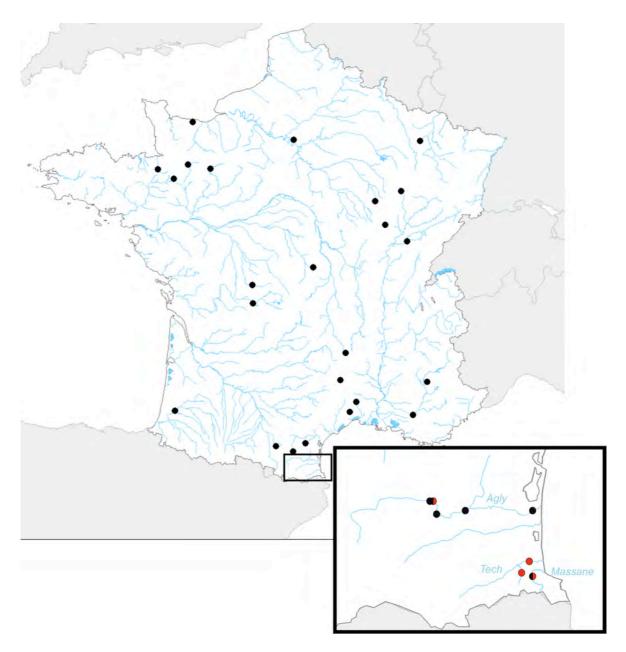


Figure 1.4: Location of the 32 sampling sites, showing the presence of *Squalius cephalus* haplotype (black dots), and *S. laietanus* (red dots).

For the COI analysis (Fig. 2.5), there are two distinct haplotype clusters, with almost no within cluster variability: only one specimen differing by 2 bases (FFFTag10843) in the first cluster, and in the second cluster one specimen differs by a single base from the others (FFFTag4180). There are 22 diagnostic sites differentiating the two clusters. The first haplotype includes specimens from all French drainages including Mediterranean basins. It clusters with low support (0.58 ppv) with other *S. cephalus* from Elbe and Danube drainages in Czech Republic. This group also includes a distinct Central European group with *S. vardarensis* and *S. cephalus* (0.91 ppv) from Danube basin. This

branch and the *S. cephalus* sequences differ by 5 positions. The second haplotype cluster includes Spanish *S. laietanus*, and samples from Agly, Tech and Massane drainages (0.69 ppv). It is included into a North Mediterranean group as the sister group of a Greek chub *S. orpheus* (1 ppv), and is distant from the Mediterranean group *sensu* Perea *et al.*, (2010). Two locations, Agly at Torreilles and the Massane stream, yielded specimens belonging to both clusters. Central European and North Mediterranean groups constitute the Euroasiatic group *sensu* Perea *et al.*, (2010).

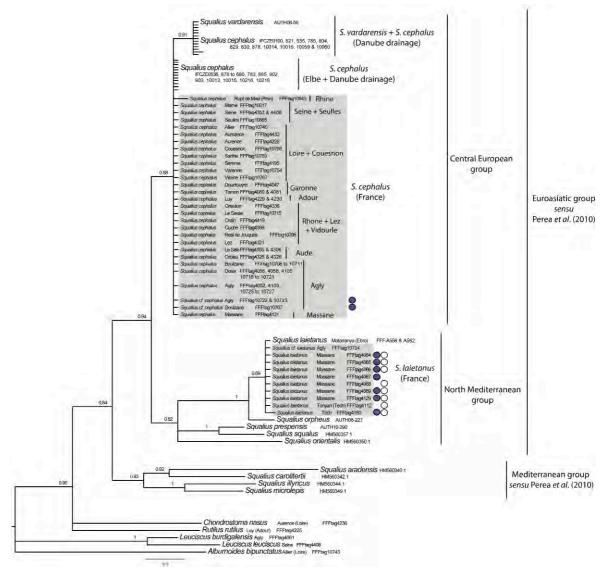


Figure 2.5: Bayesian tree of the cytochrome c oxidase subunit I (COI). Numbers on the nodes represent posterior probabilities. The mean a posteriori values of the parameters are (respectively for first, second and third codon position): TL = 19.515126; alpha = 94.564172, 99.421936, 76.659005; pinvar = 0.841327, 0.994746, 0.089359. French samples (grey boxes) have drainage indicated. Character states supposedly specific to *S. laietanus* are indicated by dots: subterminal mouth (blue), presence of brown pigments on scales on upper and lower tips of exposed part forming faint longitudinal stripes between scale rows (white).

Morphological identification of chubs from the principal drainages was done without any difficulty using the diagnostic characters (Doadrio *et al.*, 2007). However, the specimens from Agly and Tech basins were more problematic, for both species. Some (morphological characters placed on the COI topology, Fig. 2.5) presented morphological data characteristic of both species (i.e. subterminal/terminal mouth, presence/absence of faint longitudinal stripes on flanks). All chubs caught in these Mediterranean basins have 17 pectoral fin rays, the maximum number for *S. cephalus* and the minimum for *S. laietanus*.

There are 9 haplotypes for the rhodopsin dataset (Appendices 4 and 5), mostly represented by a single specimen, only one (H6) is present in both species and drainages. They correspond neither to taxonomy nor to geography, and some specimens are heterozygous. This pattern might be due to incomplete lineage sorting (Edwards, 2009) among other processes, but this needs further study. Thus, rhodopsin is not a good marker for DNA identification of *Squalius* genus.

The COI dataset, like the *cyt b* dataset (Perea *et al.*, 2010), clearly separates the two species. More variable nuclear sequences would be needed for further analyses of these species.

Our results corroborate the presence of the Catalan chub in France from the Tech to Agly drainages (Doadrio *et al.*, 2007), and add a new occurrence in the Massane basin. The two species are sympatric in Agly and Massane basins, at least at two stations, but currently only *S. laietanus* has been identified in the Tech basin. Moreover, some specimens from these basins have a mix of diagnostic characters from both species: this might be evidence of hybridization or introgression between *S. cephalus* and *S. laietanus*. Doadrio *et al.* (2007) suspected exchange of genetic material based on two specimens identified as *S. laietanus* from the Agly river with the lower jaw somewhat more developed. Common chub has been largely transported and introduced since Middle Ages (Keith *et al.*, 2011a), and is considered invasive in Ireland, where it is not native (Caffrey *et al.*, 2008). In Spain, *S. laietanus* is sympatric with *S. pyrenaicus* (Günther, 1868) in the south of Ebro basin (see Doadrio & Carmona, 2006), where introgression is known (Doadrio, pers.com.). In France, introgression has been described in many cyprinid species (see Keith *et al.*, 2011a). Hybridization and introgression following the introduction of a non-native species are one of the major threats to endemic freshwater fishes (e.g. Ribeiro

& Leunda, 2012). In France, until further data about its presence in the neighbour basins to the Agly and Tech (Têt and Baillaury drainages), Catalan chub has only been recorded in three small drainages, where it cohabits with a species with which it can probably hybridise. The use of appropriate nuclear markers would allow to verify this hypothesis. To our knowledge, only the Tech basin might shelter *S. laietanus* and no sympatric common chub. It would deserve further investigation and must be preserved from fish dumping. *S. laietanus* might therefore deserve a place in the Red List of threatened freshwater fish in France (Keith & Marion, 2002; UICN France *et al.*, 2010), where it would join the 70% of extant endemic freshwater fishes in the Mediterranean basin recognized as threatened by extinction (Ribeiro & Leunda, 2012).

#### Acknowledgements

This work was supported by the Onema, and we are particularly grateful to N. Poulet and S. Dembski. We thank all the Onema and FNPF agents, and the AAPPMA members for fish samplings. The ichthyology curators of MNHN and MNCN allowed access to the specimens. A. Amir helped with extractions and PCRs. This work was supported by the 'Service de Systématique Moléculaire' project @ SPEED-ID "Accurate SPEciEs Delimitation and IDentification of eukaryotic biodiversity using DNA markers" proposed by F-BoL, the French Barcode of life initiative).

#### **Conclusion**

Ce travail confirme avec des données de séquences l'existence en France de 2 espèces distinctes et valides de *Squalius*: le chevesne commun *S. cephalus* présent dans la plupart des bassins français, et *S. laietanus* Doadrio *et al.*, 2007 présent uniquement dans les bassins des Pyrénées-Orientales (de l'Agly à la Massane). Certaines stations sur l'Agly et la Massane indiquent une sympatrie entre les deux espèces, probablement suite à des introductions, et l'observation des caractères morphologiques laisse craindre des possibilités d'hybridation voire d'introgression entre les deux espèces. Or l'introgression, due à l'introduction d'espèces non natives dans le bassin versant considéré, constitue l'une des causes majeures d'extinction des espèces endémiques de poissons (e.g. Ribeiro & Leunda, 2012). La distribution du chevesne catalan est limitée aux petits bassins des Pyrénées-orientales, il est donc nécessaire de lui donner rapidement un statut sur la Liste Rouge des Espèces Menacées afin d'adopter des mesures de conservation appropriées.

# **CHAPITRE 3**

# DE L'UTILITE DES DONNEES MOLECULAIRES : LE CAS DES EPINOCHES *GASTEROSTEUS* SPP

# DE L'UTILITE DES DONNEES MOLECULAIRES : LE CAS DES EPINOCHES GASTEROSTEUS SPP

Les chapitres qui vont suivre vont traiter successivement de l'importance des données moléculaires, des données liées à la reproduction et des données écologiques, en plus des données morphologiques, dans le cadre de la révision taxonomique de l'ichtyofaune française.

### Préambule

La plupart des espèces décrites ou revalidées par la révision taxonomique de Kottelat et Freyhof (2007) ont été analysées uniquement sur la base de critères morphologiques.

Les épinoches *Gasterosteus* spp. font parties de ces taxons révisés. Elles sont connues pour être très polymorphes, au point que de nombreuses espèces ont été décrites en France durant le XIXème siècle par Cuvier (1829), Crespon (1844) et Blanchard (1866), notamment suivant la présence ou l'absence de plaques osseuses latérales sur le corps. Cependant, pour plusieurs auteurs, il ne s'agirait que d'une seule et même espèce, *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758 possédant une forte variabilité morphologique, et ayant une répartition circumpolaire (Berg, 1949; Spillmann, 1961; Hureau & Monod, 1973; Bănărecu & Paepke, 2002).

Münzing (1963) a observé une séparation géographique entre deux morphotypes : un morphotype possédant des plaques latérales uniquement sur la partie antérieure du corps, présent en Europe de l'Ouest et en Méditerrannée, et un morphotype recouvert de plaques latérales sur tout le corps, présent en Europe du Nord-Est et sur les bords de la Mer Noire (Fig. 3.1). A partir de cette publication, et appliquant le concept phylogénétique de l'espèce sensu Cracraft (1983), Kottelat (1997) reconnait d'un côté G. aculeatus avec un corps recouvert de plaques latérales et d'un autre côté G. gymnurus Cuvier, 1829 possédant peu ou pas de plaques latérales, et dont les répartitions correspondent à celles données par Münzing (1963). Ainsi, il n'y aurait qu'une seule espèce d'épinoche en France, G. gymnurus (Kottelat & Freyhof, 2007; Keith et al., 2011a). Or Bertin (1925) a observé

plusieurs « formes » d'épinoches, notamment dans les bassins côtiers de la Manche, suggérerant la possibilité d'avoir plusieurs espèces en France.

C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, une étude a été réalisée en collaboration avec le Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig (ZFMK) de Bonn dans le cadre du programme européen FREDIE (<a href="http://www.fredie.eu">http://www.fredie.eu</a>), ainsi qu'avec l'Université de Lyon 1 Claude Bernard, avec pour objectif de vérifier le statut taxonomique de *G. aculeatus* et de *G. gymnurus* en réalisant une étude de taxonomie moléculaire à l'échelle circumpolaire sur des individus identifiés morphologiquement. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2015 dans le journal *Cybium* (voir ci-après).



Figure 3.1: Distribution des différentes formes d'épinoches européennes: forme recouverte de plaques latérales (lignes et cercles noirs), forme ayant peu, voire pas, de plaques latérales (lignes et cercles blancs), populations mélangées (cerles noirs et blancs); adapté de Münzing (1963).

# Invalidité de *Gasterosteus gymnurus* (Cuvier, 1829) (Actinopterygii, Gasterosteidae) confirmée par la taxonomie intégrative

### Article publié<sup>4</sup>

**Résumé.** - L'épinoche *Gasterosteus* spp. est un organisme modèle utilisé en biologie. Quatre espèces sont connues en Europe : *G. aculeatus*, *G. gymnurus*, *G. islandicus* et *G. crenobiontus* qui est éteinte. Notre étude de taxonomie intégrative, comprenant 194 spécimens, démontre que ces taxons ne peuvent être distingués ni avec le marqueur mitochondrial COI, ni avec les données morphologiques comme les plaques latérales. Nous invalidons donc l'espèce *Gasterosteus gymnurus*, et nous la considérons comme synonyme junior de *Gasterosteus aculeatus*. Le statut taxonomique de *Gasterosteus islandicus* nécessite d'être clarifié.

#### Mots-clés

Taxonomie integrative, Gasterosteidae, Gasterosteus aculeatus, Gasterosteus gymnurus, Gasterosteus islandicus, Cytochrome C oxidase subunit 1

**Abstract.** - Invalidity of Gasterosteus gymnurus (Cuvier, 1829) (Actinopterygii, Gasterosteidae) according to integrative taxonomy

The three-spined stickleback *Gasterosteus* spp. is a model organism largely used in biology. Four species have been described in Europe: *G. aculeatus*, *G. gymnurus*, *G. islandicus* and the extinct *G. crenobiontus*. Our integrative taxonomy study including 194 specimens demonstrates that these taxa are distinguishable neither with the mitochondrial COI marker nor by the morphological characters like lateral plates supposed to differentiate them. Thus, we invalidate *Gasterosteus gymnurus*, and we consider it as junior synonym of *Gasterosteus aculeatus*. The taxonomical status of *Gasterosteus islandicus* still needs to be clarified.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> DENYS G.P.J., GEIGER M.F., PERSAT H., KEITH P. & DETTAI A., 2015. – Invalidity of *Gasterosteus gymnurus* (Cuvier, 1829) (Actinopterygii, Gasterosteidae) according to integrative taxonomy. *Cybium*, 39: 37-45.

### Introduction

The three-spined stickleback Gasterosteus aculeatus Linnaeus. 1758 (Actinopterygii, Gasterosteidae) has for decades been a model organism for evolutionary, behavioural, developmental and ecological research, which qualified it as "supermodel" (Merilä, 2013). It inhabits sea or freshwater, and has a very large distribution in circumarctic and temperate regions (Froese & Pauly, 2014). Its taxonomy has often been discussed as it is very polymorphic, especially regarding plate morphs. 47 species were described throughout the world (Eschmeyer, 2014), and have been mainly considered to be synonyms to the species present in Western Europe, G. aculeatus and Gasterosteus gymnurus Cuvier, 1829 (Kottelat, 1997). Four other species are currently considered valid: Gasterosteus wheatlandi Putnam, 1867, Gasterosteus islandicus Sauvage, 1874, Gasterosteus crenobiontus Bacescu & Mayer, 1956 (extinct), and Gasterosteus nipponicus Higuchi et al., 2014, respectively endemic to North-West America, Iceland, Central of Europe and Japan. Considering morphological and molecular studies (e.g. Münzing, 1963; Mäkinen & Merilä, 2008), Kottelat and Freyhof (2007) changed the assignation of west European sticklebacks into G. gymnurus, because of the low plate numbers on the flanks and the absence of a keel on the caudal peduncle. Keith et al. (2011a) considered it to be the only species of three-spined stickleback in France, whereas Iglésias (2012) recognized both species. However, several sticklebacks "forms" in France, especially in the coastal basins of the Channel (North-West of France), display a variability in their lateral plate numbers, as already noted by Bertin (1925). This is of particular importance, as G. gymnurus was described solely on the character "presence of plates only on pectoral region" (translated from French: "G. gymnurus (...) n'a de ces plaques que dans la région pectorale"; Cuvier 1829). A morphological and morphometric study (Woltmann & Berg, 2013) on more than 5000 German individuals belonging to both forms found no difference between G. aculeatus and G. gymnurus.

The aim of this study is to verify the status of *G. aculeatus* and *G. gymnurus* using DNA taxonomy sensu Tautz et al. (2003), combining morphological characters and the mitochondrial gene coding for cytochrome C oxidase subunit 1 (COI) on a large circumpolar sampling, in order to evaluate both species in an integrative taxonomy approach (Padial et al., 2010). It occurs in a context where the taxonomy of European

ichthyofauna undergoes many discoveries and changes (Kottelat and Freyhof, 2007; Denys *et al.*, 2014; Geiger *et al.*, 2014).

### Materials and methods

Samples were collected between 2003 and 2013 with collaborations of the FREDIE program (http://www.fredie.eu), the French National Agency for Water and Aquatic Environments (Onema), and the Fédération Nationale de la Pêche en France (FNPF). A total of 174 specimens were caught, mainly by electrofishing, in 30 locations in the major French drainages. Ninety five individuals from 37 other European sites were added (Fig. 3.2; Appendix 6). Specimens were fixed in 95% EtOH for later fin clipping. We did all morphological identification (juveniles excepted): *G. aculeatus* has a complete series of 29-35 bony scutes covering the trunk and the caudal peduncle (Fig. 3.3A), whereas *G. gymnurus* has only 2-10 scutes on the anterior part of the trunk (Fig. 3.3B), and *G. islandicus* has a deep notch on the anterior margin of the pelvic girdle (vs. straight or rounded for the other taxa) (Kottelat & Freyhof, 2007). One hundred sixty two specimens were used for DNA analyses.

DNA extraction, PCR, sequencing and quality control were performed according to Geiger *et al.* (2014) and for French samples Denys *et al.* (2014), yielding a dataset of partial COI sequences (627 bps). It was completed by sequences from other *Gasterosteus* species with locality and photo vouchers available on the Barcode of Life database (BOLD, <a href="www.boldsystems.org">www.boldsystems.org</a>; Ratnasingham & Hebert, 2007) and GenBank. Several other gasterosteid species were used as outgroups (Fig. 3.2; Appendix 6). All new COI sequences were deposited in the EUEPI project folder in the BOLD with their voucher information. Alignment was performed manually, as neither marker includes indels. Phylogenetic analyses were performed with Bayesian inference (MrBayes 3.2, Ronquist *et al.*, 2012), with the GTR+I+G model selected by JModelTest 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012). Two runs of two analyses with 10 million generations and sampling every 200 generations were performed, and 10% of trees were eliminated as burnin after checking for convergence. Intra- and inter-specific distances (p-distances) were calculated with MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).



Figure 3.2: Geographical distribution of the vouchers used in the analysis in polar view. Gasterosteus aculeatus (black squares), G. gymnurus (white squares), G. islandicus (white circle), G. wheatlandi (white stars) and unidentified morphologically specimens (grey squares). Asterisks mean approximative locations.

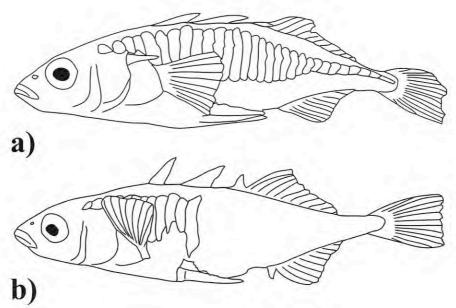


Figure 3.3: A: Line drawings of *Gasterosteus aculeatus*, MNHN 2013-1299, FFFtag12285, 35 mm SL, Taute (Douve drainage) at Tribehou, France, 17 Sep. 2013; B: *G. gymnurus*, MNHN 2014-0010, FFFtag12314, 42 mm SL, Blaise (Seine drainage) at Saint-Ange-et-Torçais, France, 24 Sep. 2013.

### Results

The morphological identification according to Kottelat and Freyhof (2007) of the 159 non juvenile three-spined sticklebacks (i.e. over 30 mm SL) placed *G. islandicus* (one population, four specimens) in Iceland, *G. gymnurus* (40 populations, 100 specimens) from Portugal to Turkey including United-Kingdom and Mediterranean drainages, and *G. aculeatus* (28 populations, 51 specimens) from Channel coast and East of Europe to Alaska and Canada. Mediterranean and all French populations were determined as *G. gymnurus*, except one from Taute stream in Normandy (MNHN 2013-1299), which was identified as *G. aculeatus*. The populations from the North Sea (ZFMK:ICH:55427), Acheron in Greece (ZFMK:ICH:55875 to 55879), and the Japanese specimen (UW 41883) were also identified as *G. aculeatus*.

Genetic analyses were performed on 194 individuals for the COI marker. Twenty four specimens belonging to *G. aculeatus* have identical sequences to specimens identified as *G. gymnurus*.

In the Bayesian phylogenetic tree reconstruction (Fig. 3.4), a deep divergence (12.62% mean pairwise divergence) separates *G. wheatlandi* from the strongly supported (1 ppv) clade including *G. aculeatus*, *G. gymnurus* and *G. islandicus*. The clade is a large polytomy; the variability within it is 0.36% pairwise divergence, and it has no taxonomical structure. Two *G. gymnurus* individuals from the United Kingdom (North Sea: Ex70G2 and Ex70G4) are included into a Canadian subclade of *G. aculeatus* supported by one synapomorphy (A in position 401). However, several subclades are geographically homogeneous, like a Western Mediterranean subclade from France to Italy (except for Brague stream) supported by 2 synapomorphies (G in positions 14 and 547), with moderate support (0.87 ppv) and mean divergence from the others of 0.5%. On the other hand, some localities from surrounding areas or even areas within the geographic areas of these subclades, have different haplotypes.

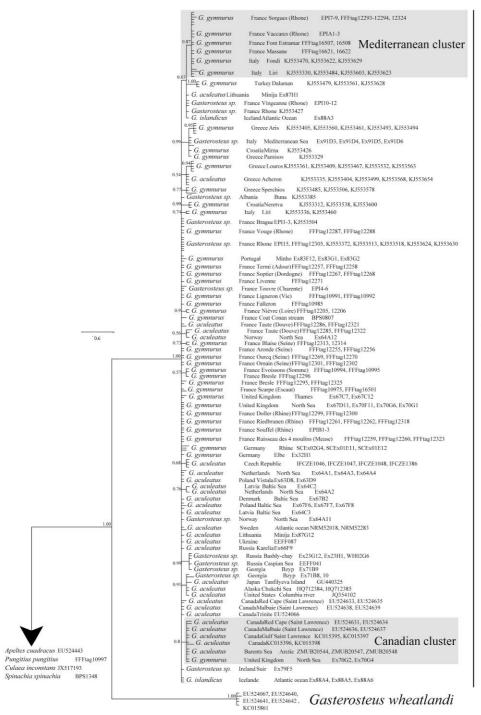


Figure 3.4: Bayesian tree of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) for 194 individuals of Gasterosteus spp and other gasterosteids. The mean a posteriori values of the parameters are: TL = 38.329096; alpha = 0.076817; pinvar = 0.308267. As a reminder, G. aculeatus is full plated, whereas G. gymnurus has two to 10 lateral plates on both sides.

Gasterosteus aculeatus

+ G. gymnurus

+ G. islandicus

### **Discussion**

Münzing (1963) drew a map of Europe with the repartition of the different plate morphs. He distinguished clearly the plateless morph "leiurus" in the West part of Europe, whereas the morph with plates "trachurus" occurs from Channel to Baltic Sea. Our morphological identifications demonstrate globally the same pattern. But one population in Channel drainage is fully plated; other French and English populations have just the lower part of the flank covered. Bertin (1925) noticed that "forms" covered by plates "trachura" occurred only in costal basin of Channel, but during their growth, they passed by the other forms having less plates: "hologymna", "gymnura" and "semiarmata" (see Bakker & Sevenster, 1988 for the terminology review). This is why care must be taken to compare only adults, which is the case of our specimens. Moreover, one Greek population (Acheron drainage) is fully plated, whereas all other Mediterranean populations have a few plates. Thus the morphological identification demonstrate that the species distinction between G. acculeatus and G. gymnurus using plate numbers and arrangement as key character does not lead to a clear biogeographic pattern.

The lateral plate number is controlled by the ectodysplasin-A *Eda* gene, with a stronger expression in adults than juveniles (see Barrett, 2010). Plate presence is strongly correlated to the habitat: marine specimens are totally covered with plates, whereas freshwater populations are less shielded (Barrett 2010; Merilä 2013). A coastal-inland gradient as positive relationship between salinity and plate numbers was documented (Raeymaekers *et al.*, 2007), activating firstly the anterior plates development, followed by posterior plates and finally middle plates (Bell, 2001). So plate reduction probably constitutes an adaptation to freshwater habitat (Le Rouzic *et al.*, 2011) colonized by fully plated ancestral marine populations, and often occurring in numerous cases through allelic substitution in the *Eda* gene (Leinonen *et al.*, 2012). The main explanation for these phenotypes is that lateral plates serve as defensive structures against the teeth of predatory fish in marine environments, but they alter the escape capacity in freshwater (Barrett, 2010).

Density of plates is therefore not an appropriate taxonomical criterion for European three-spined sticklebacks, but represents an intraspecific polymorphism induced by habitat, contrary to *G. nipponicus*, which has a characteristic plate morph and is supported by ecological, chromosomal and reproduction data (Higuchi *et al.*, 2014). Besides, the

plateless morph has been observed from Norway to Alaska *via* Iceland (Barrett, 2010), and is not characteristic to any European area. "Presence of plates only on pectoral region" is the sole character in the original description of *G. gymnurus*. Moreover, as no type specimen is currently known (Kottelat, 1997), no taxonomical review on a reference individual is possible.

The DNA taxonomy analysis with the COI marker does not differentiate *G. aculeatus* from *G. gymnurus* and *G. islandicus*. Geographically, a few divergences were observed on the mitochondrial cytochrome b and control region markers between European, American and Japanese populations, because of very recent colonisations estimated at 90 000 to 260 000 years from Alaska and British Columbia to Atlantic (Ortí *et al.*, 1994; Mäkinen & Merilä, 2008). Several transatlantic exchanges have taken place during this period (Mäkinen & Merilä, 2008). In addition, Mäkinen *et al.* (2006) demonstrate the absence of a relationship between phylogeny and habitat. While this lack of differentiation could be due to insufficient variability of the marker, it is here combined to the lack of morphological characters other than the highly plastic plate numbers.

Mediterranean populations are distinct from West European populations, however the dataset is not well representative of the area (Mäkinen *et al.*, 2006; Cano *et al.*, 2008). Consequently Bianco (2014) proposed that Mediterranean populations constitute another lineage. Our results also recover a Western Mediterranean subclade, but it does not include all Mediterranean specimens. Furthermore, the type locality of *G. gymnurus* is in England and North of France (Cuvier, 1829).

In consequence, we consider *Gasterosteus gymnurus* Cuvier, 1829 as a junior synonym of *G. aculeatus* Linnaeus, 1758.

G. islandicus is endemic to Iceland, and is recognizable by its notch in pelvic girdle (Kottelat and Freyhof, 2007). The 4 specimens in our dataset are also included in the same cluster as G. aculeatus and G. gymnurus. As some populations possibly belonging to this species were found in Norway and Finland (in sympatry with G. aculeatus; Kottelat and Freyhof, 2007), the presence of the notch in pelvic girdle might also be a polymorphic character. More investigations are needed in order to clarify this species delineation.

### Acknowledgements

This work was supported by the Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN), the UMR BOREA 7208, the UMR 5023 LEHNA Lyon 1 University, the French Office de l'eau et

des milieux aquatiques (ONEMA) and the FREDIE program (http://www.fredie.eu) financed in the SAW program by the Leibniz Association (SAW-2011-ZFMK-3). We are particularly grateful to N. Poulet. We thank the Fédération de la pêche of Pas-de-Calais and all the Onema agents (especially S. Besson, F. Laval, O. Ledouble, S. Manné, M. Thiret, J.C. Reverdy, and F. Villette) for fish samplings. The ichthyology curators of MNHN, Claude Bernard Lyon 1 University (UCBLZ), Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig, Bonn (ZFMK), Fischsammlung Jörg Freyhof (FSJF), Naturhistoriska riksmuseet (NRM), Royal Ontario Museum (ROM), Národní Museum, Prague (NM), Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg (ZIN) and the University of Washington (UW), gave access to the specimens and provided the photo of vouchers. Laboratory access and assistance was provided by the "Service de systématique moléculaire" of the Muséum national d'Histoire naturelle (CNRS UMS 2700).

### **Conclusion**

Ce travail de révision taxonomique des épinoches à l'échelle circumpolaire a permis d'invalider *Gasterosteus gymnurus* Cuvier, 1829, et a mis en évidence que les plaques latérales ne peuvent être considérées comme des critères taxonomiques, mais comme un caractère lié à l'environnement. Notre étude a aussi mis en évidence un sousclade méditerranéen inclus dans le clade comprenant *G. aculeatus*, *G. gymnurus* et *G. islandicus*. Ceci a été confirmé par d'autres études sur d'autres marqueurs moléculaires comme une lignée évolutive différente dont l'origine remonterait au Pléistocène (Mäkinen & Merilä, 2008; Lucek & Seehausen, 2015; Sanz *et al.*, 2015). Néanmoins, en l'absence de données supplémentaires liées à la reproduction ou à l'écologie, il n'y a pas pour l'instant suffisamment d'éléments pour affirmer que cette lignée évolutive méditerranéenne est une espèce différente. Ainsi, il n'y a pour l'instant qu'une seule espèce d'épinoche en France, *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758.

La taxonomie des épinochettes *Pungitius* spp, appartenant à la même famille des Gasterosteidae, est également très débattue. Le problème est semblable, à savoir si la présence ou l'absence de carenne sur le pédoncule caudal constitue un critère taxonomique (Moreau, 1881-1891; Spillmann, 1961; Münzing, 1969; Hureau & Monod, 1973; Gross, 1979; Wootton, 1984; Kottelat, 1997; Reshetnikov et al., 1997; Keivany & Nelson, 2000 ; Bănărescu & Paepke, 2002 ; Kottelat & Freyhof, 2007). Comme pour les épinoches, Münzing (1969) a observé une séparation géographique entre les formes sans carène dans le Sud de la France et le Nord de la Grande-Bretagne, et la forme avec carène dans le Nord de l'Europe. Kottelat (1997), appliquant la même méthodologie, considère 2 espèces, Pungitius pungitius (Linnaeus, 1758) avec une carène et présente de l'Allemagne à l'Europe de l'Est, et *Pungitius laevis* (Cuvier, 1829) sans carène et présente en Europe de l'Ouest (Kottelat & Freyhof, 2007). Il n'y aurait ainsi qu'une seule espèce d'épinochette en France, *Pungitius laevis* (Keith *et al.*, 2011a). Or, une récente étude génétique réalisée sur des individus identifiés morphologiquement a démontré, d'une part, l'existence de 3 groupes distincts de *Pungitius* spp en France (un dans le Nord de la France correspondant à P. pungitius, un deuxième sur la bassin de la Loire, et un dernier dans les bassins Atlantique), mais aussi la polyphylie de P. laevis, et enfin la présence ou l'absence de carenne sur le pédoncule caudal n'était pas un critère taxonomique (Wang et al., 2015).

Une révision taxonomique sur des caractères morphologiques et écologique est alors nécessaire. Ce travail est actuellement prévu avec notamment la délimitation avec des données de séquence plus précises des types des différentes espèces d'épinochettes décrites en France

Ces résultats sur les Gasterosteidae montrent que parfois l'utilisation des données morphologiques seules peut donner lieu à de mauvaises interprétations. En effet, de nombreux états de caractère morphologiques sont héritable génétiquement, tandis que d'autres sont liés à l'environnement. L'utilisation des données moléculaires, en particulier de séquence, permet de vérifier la congruence des données moléculaires et morphologiques, puis l'héritabilité des états de caractères. Ceci est particulièrement important lorsque, comme pour les Gasterosteidae, un groupe repose sur un seul caractère morphologique sur lequel des doutes ont été émis. La morphologie et la génétique doivent être complémentaires dans toute révision taxonomique, et le minimum dans le cadre d'une approche de taxonomie intégrative.

# CHAPITRE 4 DE L'UTILITE DES COLLECTIONS : LE CAS DES BROCHETS *ESOX* SPP

### DE L'UTILITE DES COLLECTIONS : LE CAS DES BROCHETS *ESOX* SPP

### Préambule

Nos manques de connaissance de l'ichtyofaune dulçaquicole française touche également des taxons très emblématiques d'un point de vue social et économique, que même Kottelat et Freyhof (2007) ne les ont pas révisés : c'est le cas du brochet.

Pendant plus de deux siècles, le brochet *Esox lucius* Linnaeus, 1758 a été considéré comme la seule espèce du genre *Esox* en Europe. Or, en 2011, deux équipes italiennes de chercheurs ont décrit indépendamment une nouvelle espèce de brochet en Italie : *Esox cisalpinus* sur des critères morphologiques (Bianco & Delmastro, 2011), et *Esox flaviae* sur des critères morphologiques et moléculaires (Lucentini *et al.*, 2011). La publication de Bianco et Delmastro (2011) étant parue en premier, d'après le Code International de Nomenclature Zoologique, *E. cisalpinus* est le nom valide ; *E. flaviae* devenant ainsi le synonyme junior de ce dernier (Bianco, 2014). Cette nouvelle espèce de brochet se distingue de l'*E. lucius* par une robe vermiculée ou ayant des barres longitudinales (*versus* des taches blanches pour *E. lucius* ; Fig. 4.1), et par un nombre moins élevé d'écailles sur la ligne latérale. Ceci est corroboré par les données de séquence de Lucentini *et al.* (2011).

D'autre part, Launey *et al.* (2006) ont réalisé une étude de génétique des populations pour connaître l'impact des opérations de soutien d'effectif de brochet sur les populations natives en France, et ils ont mis en évidence une population du Sud-Ouest de la France (rivière Boutonne, bassin de la Charente) avec une divergence très élevée par rapport aux autres populations françaises et européennes de leur échantillonnage (Fig. 4.2).

C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, une révision taxonomique des brochets de France a été réalisée en collaboration avec l'Université de Lyon 1 Claude Bernard, dans l'objectif de vérifier la présence de l'*E. cisalpinus* en France, et pour évaluer le statut de la population de la Boutonne. La difficulté de cette étude fut d'une part, de se procurer des individus natifs en tenant compte des opérations de repeuplement qui ont eu lieu en France depuis les années 1950, brouillant l'image des populations d'origine et, d'autre part, l'impossibilité de conserver tous les spécimens capturés de par la taille des individus et du

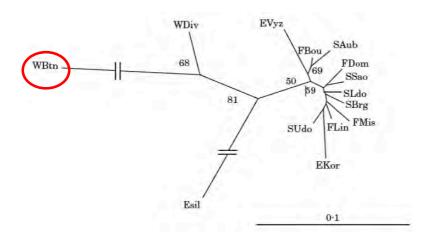
Figure 4.2 : Arbre de Neighbor-joining basé sur les distances génétiques de Cavalli-

fait que le brochet ait un statut UICN vulnérable. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2014 dans le journal *Comptes Rendus Biologie* (voir gi-après) ochet

françaises et européennes;



Figure 4.1: *Esox cisalpinus* à la robe vermiculée de la gravière Escosa (a), avec des bandes longitudinales de la gravièe Fontane (b) ©G. Delmastro, Museo Civico di Storia Naturale; *Esox lucius* du Rhône avec une robe tachetée (c), ©G. DENYS, MNHN.



# Evidence morphologique et moléculaire de trois espèces de brochets *Esox* spp (Actinopterygii, Esocidae) en France, dont la description d'une nouvelle espèce

### Article publié<sup>5</sup>

Résumé. - Cette étude de taxonomie intégrative sur les brochets de France compare les caractères morphologiques et les données moléculaires (gènes mitochondrial COI et nucléaire Plagl2). En plus de l'*E. lucius*, les données moléculaires et morphologiques caractérisent une espèce nouvelle en France *E. aquitanicus* sp. nov. présente dans les bassins de la Charente à l'Adour. Elle est caractérisée par un patron de coloration des flancs formé de bandes obliques d'1–1.5 écaille d'épaisseur lui conférant une robe marbrée, un museau seulement 0.9 fois plus long que la longueur postorbitaire, une base de nageoire anale 1.1–1.2 fois plus longue que la longueur du pédoncule caudal, 101 à 121 écailles sur la ligne latérale, 53 à 57 vertèbres, ainsi que 24 sites diagnostiques sur le gène du COI et 3 sur celui du Plagl2. Les séquences partielles de COI (131 pb) des spécimens récents et historiques indiquent également la présence de l'*E. cisalpinus* et *E. lucius* dans le Lac Léman au XIXème siècle.Les données morphologiques et moléculaires démontrent aussi une possible hybridation entre l'*E. lucius* et chacune des deux autres espèces locales, représentant ainsi une menace pour elles. Leurs statuts de conservation devrait être évalués rapidement afin d'entreprendre des mesures de protection.

**Keywords:** *Esox aquitanicus*, *Esox cisalpinus*, nouvelle espèce, taxonomie integrative, cytochrome C oxidase subunit 1, pleiomorphic adenoma gene-like 2, France

Morphological and molecular evidence of three species of pikes *Esox* spp (Actinopterygii, Esocidae) in France, including the description of a new species. *C. R. Biol.*, 337: 521-534.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> DENYS G.P.J., DETTAI A., PERSAT H., HAUTECOEUR M. & KEITH P., 2014 –

**Abstract.** - Morphological and molecular evidence of three species of pikes *Esox* spp (Actinopterygii, Esocidae) in France, including the description of a new species.

This integrative taxonomy study of French pikes compares morphological characters and molecular sequence data (mitochondrial COI and nuclear Plagl2 genes). In addition to the expected *E. lucius*, DNA sequences and morphology both support a new species in France, *E. aquitanicus* sp. nov. from Charente to Adour drainages. It is characterized by a color pattern of sides with narrow 1–1.5 scale wide oblique vertical bands conferring it a marbled coat, a snout only 0.9 times larger than the postorbital length, an anal fin basis 1.1–1.2 times larger than the caudal peduncle length, 101 to 121 lateral scales, 53 to 57 vertebrae, as well as 24 diagnostic sites in the COI gene and 3 in the Plagl2 gene. Partial COI sequences (131 bp) from modern and historical specimens indicate also the presence of *E. cisalpinus* and *E. lucius* during the 19<sup>th</sup> century in Leman Lake. Morphological and molecular data points to a possible hybridization between *E. lucius* with both other local pike species, representing a risk for them. Their endangerment status should be evaluated rapidly in order to take conservation measures.

### Introduction

The Northern Pike *Esox lucius* Linnaeus 1758 (Teleostei, Esocidae) is globally the most common esocid (although this might differ locally). Its distribution is circumpolar, covering both North America and Eurasia (Raat, 1988). It holds high socio-economic interest for recreational and commercial fishing (Raat, 1988; Mann, 1996). Moreover, pike reproduction is well-known (Billard, 1996). Aquaculture is now well developed and has been used to restock numerous waterbodies (Raat, 1988; Billard, 1983, 1996; Mann, 1996) or to introduce it in places where it is not native (Welcomme, 1988; Lucentini *et al.*, 2011).

Since the early 19<sup>th</sup> century, the taxonomy of the Esocidae is considered to be well known, and *E. lucius* was thought to be the only species present in Europe (Raat, 1988; Crossman, 1996). Faced with the high ecological variability of pikes, Nilsson *et al.* (2008) asked "How many species of pike are there?". Yet neither they nor others researchers thought that many new species of pikes remained to be described, especially in Europe where the vertebrate fauna was assumed to be well known. Numerous genetic studies proved low variability between American and North European Northern Pike populations (Healy & Mulahy, 1980; Senanan & Kapuscinski, 2000; Maes *et al.*, 2003; Miller & Senanan, 2003). *A contrario*, however, South European populations present a higher variability, especially in Adriatic drainages and Italy (Nicod *et al.*, 2004; Lucentini *et al.*, 2006), in the Danube basin and the south west of France (Launey *et al.*, 2006). However during the last decade, other groups of European freshwater fishes turned out to include many cryptic or just undetected species (Kottelat & Freyhof, 2007; Geuger et al., 2014).

Very recently, Bianco & Delmastro (2011) and Lucentini *et al.* (2011) described, independently, the same endemic species of pike in Italy, and named it respectively *E. cisalpinus* and *E. flaviae*, the first being the valid name according to the priority rule of the International Code of Zoological Nomenclature, *E. flaviae* being a junior synonym (Bianco, 2014). This species differs from *E. lucius* by having 92-107 lateral scales (*vs.* 105-148), 4-4 submandibular pores (*vs.* 5-5), a banded or reticulated pigmentation on the sides (*vs.* rounded spots) (Bianco & Delmastro, 2011), and an average divergence of 1.80% on the cytochrome C oxidase subunit 1 mitochondrial marker (COI) (Lucentini *et al.*, 2011). This genetic divergence is also supported by microsatellite markers (Lucentini *et al.*, 2006). This species is present in the Padany-Venetian and Tuscany-Latium districts in

Italy, but was extensively bred and introduced elsewhere in Italy as well as in other countries such as France during the last 50 years (Bianco, 2014).

In France, pike, considered by default to be *E. lucius* (Keith *et al.*, 2011a), is native in the Rhine, Seine, Loire (except in Brittany) and Rhone drainages. There are records of its introduction in the small coastal French Mediterranean rivers out of the Rhone itself (Persat & Keith, 1997). Archeological data indicate its presence in Aquitania during the Pleistocene (Le Gall, 2008), suggesting that it is native in the Dordogne and Garonne rivers and maybe also in the Adour drainage.

Launey *et al.* (2006) used a microsatellite approach on several pike populations from France and the East of Europe to assess the impact of pike restocking on genetic diversity of native populations. They found extensive introgression between wild populations and introduced stocks, but interestingly also highlighted a very divergent population from the South West of France, very different from all their other French and Eastern European samples. Chimits (1956) had already pinpointed an earlier spawning period in this region compared to other French pike populations.

The aim of our study is to review the taxonomy of pikes present in France using an integrative taxonomy approach (Padial *et al.*, 2010). We use morphological and molecular data on 19<sup>th</sup> century and recent specimens collected in the main catchments of France to explore the diversity of French pikes. We replace them in the context of the variability of European pikes (including the description of an eventual new species), and investigate the presence of *E. cisalpinus* in France using the characters of the two descriptions (Bianco & Delmastro, 2011; Lucentini *et al.*, 2011).

### Materials and methods

### Sampling and measurements

The Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN, Paris) and the Claude Bernard Lyon 1 University with the collaboration of the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA), the Fédération Nationale de la Pêche en France (FNPF), and some professional and amateur fishermen, performed sampling operations from 2003 to 2013. 65 specimens were caught by electrofishing or angling in 32 locations from the main French drainages (Seine, Loire, Garonne, Rhine, Rhone, Adour) (Table 4.1). Samples were

collected in rivers classified as 'French first category' (cold salmonid rivers where pike populations are supposed to be native because its introduction is strictly prohibited (Launey et al., 2006)), and in rivers classified as 'second category', i.e. warmer cyprinid rivers with mainly limnophylic species. In order to have a link with the study of Launey et al. (2006), we collected in the exact location (Boutonne stream) where the very divergent population was noticed, and one specimen could be captured. Because pike has a vulnerable protection status in France, most specimens were released alive after being photographed and sampled for molecular study. Some specimens were kept as vouchers. They were fixed in formalin (or ethanol for the smallest ones). They were deposited in the collections of the MNHN or of the Claude Bernard Lyon 1 University and were used for the morpho-meristic study.

49 specimens from the historical collections of the MNHN and the British Museum of Natural History (BMNH, London) covering the whole native distribution area of E. lucius were added in the morpho-meristic study (Holčík et al., 1989). The possible type of E. lucius (BMNH 1853.11.12.114) was also included in the analyses, but as only its skin on paper is conserved, no morphometric measurements were possible. We used the meristic data of the holotype of E. cisalpinus (IZA 111) from the species description. Counts and measurements were taken from the best preserved side (by default the right side). Measurements were taken with an electronic caliper and are expressed to the nearest tenth of a millimeter. For measures longer than 300 mm, we used tape measures expressed to the nearest millimeter. The standard length was measured from tip of snout to the basis of the uppermost caudal ray. The post-dorsal length was measured from behind the base of the last dorsal-fin ray to the basis of the uppermost caudal ray. The length of the caudal peduncle was measured from behind the base of the last anal fin ray to the basis of the lowermost caudal ray. The transverse scales counts (from pelvic fins origin to lateral line, and from dorsal fin origin to lateral line) did not include the scale of the lateral line. All measurements were made point to point, never by projections. Vertebrae were counted to the ural 1 bone included. Vertebrae and unpaired fin rays were counted by X-rays (Faxitron Model 43855F, X-ray energies used: 40 to 70 kV depending to the size of specimens). When available, photos of released specimens were used for lateral scales count as additional data. *In vivo* observations were performed on adults and juveniles. Sex determination was realized following the criteria of Raat (1988).

Table 4.1: Sampling sites and GenBank accession numbers for COI and Plagl2 sequences of the French individuals.

D	Loordin	Cample ID	GenBank accession numbers				
Drainage	Location	Sample ID	COI	Plagl2			
Adour	Adour at Estirac	BRO462	KM224857	KM224797			
	Estampon at Saint-Gor	BRO531	KM224871	KM224810			
	Geloux at Garein	BRO534	KM224872	KM224811			
Charente	Antenne at Le Seure	EM17879	KM224827	-			
		EM17880	KM224828	KM224772			
	Boutonne at Saint-Séverin-sur- Boutonne	BRO545	KM224870	KM224809			
	Charente at Saint-Saviol	BRO25	KM224843	KM224783			
	Lien at Condac	BRO505	KM224817	KM224764			
		BRO506	KM224812	KM224759			
		BRO509	KM224819	KM224765			
	Seugne at Les Gonds	BRO29	KM224847	KM224787			
	Sonsonnette at Saint Front	BRO433	KM224865	KM224805			
Dordogne	Dordogne at Cénac-et-Saint-Julien	BRO19	KM224839	KM224779			
		BRO22	KM224861	KM224801			
	Isle at St-Médard-de-Guizière	FFFtag12251	KM224813	KM224760			
		BRO453	KM224854	KM224794			
		BRO455	KM224855	KM224795			
		BRO457	KM224856	KM224796			
	Isle at Trélissac	BRO24	KM224842	KM224782			
	Lary at St-Martin-d'Ary	EM17877	KM224826	-			
Eyre	Eyre at Bélin-Béliet	BRO441	KM224866	-			
		BRO443	KM224867	KM224806			
		BRO445	KM224868	KM224807			
		BRO536	KM224863	KM224803			
	Eyre at Mios	BRO21	KM224860	KM224800			
		BRO23	KM224862	KM224802			
	Grande Leyre at Sabres	BRO538	KM224864	KM224804			
		BRO541	KM224869	KM224808			

Drainage	Location	Sample ID	GenBank acco	ession numbers
Garonne	Garonne at Verdun-sur-Garonne	BRO20	KM224841	KM224781
Loire	Boivre at Béruges	BRO502	KM224816	KM224763
	Sèvre Nantaise at Saint Malo du Bois	BRO1	KM224829	KM224773
Meuse	Meuse at Han s/Meuse	BRO6	KM224822	KM224768
		BRO7	KM224823	KM224769
		BRO8	KM224824	KM224770
Rhone	Clauge at La Loye	BRO427	KM224850	KM224790
		BRO428	KM224851	KM224791
		BRO430	KM224852	KM224792
		BRO431	KM224853	-
	Chautagne at Lône du Brotalet	BRO14	KM224834	KM224776
	Bourget Lake	BRO3	KM224848	KM224788
		BRO4	KM224849	KM224789
		BRO5	KM224815	KM224762
	Rhone at Breignier	BRO13	KM224833	KM224775
		BRO26	KM224844	KM224784
		BRO27	KM224845	KM224785
		BRO28	KM224846	KM224786
	Rhone at Massigneu de Rives	BRO529	KM224821	KM224767
	Rhone at Saint-Vulbas	BRO12	KM224832	KM224774
Sarthe	Sazée at East of Segré	BRO15	KM224835	KM224777
		BRO16	KM224836	KM224778
		BRO17	KM224837	-
		BRO18	KM224838	-
Seine	Blaise at Saint-Ange-et-Torçay	BRO525	KM224820	KM224766
	Epte at Guerny	FFFtag10874	KM224818	-
	Serein at Pontigny	BRO464	KM224858	KM224798
		BRO466	KM224859	KM224799
		BRO470	KM224814	KM224761
	Superbe at Pleurs	BRO9	KM224825	KM224771
		BRO10	KM224830	-

Drainage	Location	Sample ID	GenBank acce	ession numbers			
		BRO11	KM224831	-			
Somme	Canal de la Maye at Favières	BRO2	KM224840	KM224780			

### **Molecular study**

The molecular study is in two parts: a DNA taxonomy study *sensu* Tautz *et al.* (2003) with recent DNA using mitochondrial (COI) and nuclear (Pleiomorphic adenoma gene-like 2 Plagl2, (Li *et al.*, 2007)) genes; and a DNA barcoding study *sensu* Hebert *et al.* (2003) using a fragment of COI (131 bp) (Meusnier *et al.*, 2008) for molecular identification of old museum collections.

All captured specimens were included in the DNA analyses. For each specimen (Table 4.1), a small piece of fin was stored in 95% ethanol at 3°C. DNA extraction was performed on an EpMotion Robot using MN Biomedical extraction kits, according to the manufacturer's protocols. 12 old specimens from the MNHN collections were selected based on their conservation fluid (ethanol, with no fixation in formalin). The DNA was extracted using a classical CTAB protocol with a chloroform isoamylalcohol step (Winnepenninckx et al., 1993) (Table 4.2). For the old specimens, particular precautions were taken to avoid contamination, and two independent extractions and PCRs were performed to check the sequences. DNA amplification was performed by PCR in a final 20μL volume containing 5% DMSO, 1μL of dNTP 6.6mM, 0.15μL of Qiagen Taq DNA polymerase, using 2μL of the buffer provided by the manufacturer, and 0.4μL of each of the two primers at 10pM; 2.5 to 10µl of DNA extract was added. The different primers used are: for COI TelF1 5'-TCG ACT AAT CAY AAA GAY ATY GGC AC-3', TelR1 5'-ACT TCT GGG TGN CCA AAR AAT CAR AA-3' (Dettai et al., 2011), FishR1 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3' (Ward et al., 2005); Plagl2 plagl2 F9 5'-CCA CAC ACT CYC CAC AGA A-3', plagl2 R930 5'-TTC TCA AGC AGG TAT GAG GTA GA-3', plagl2 F51 5'-AAA AGA TGT TTC ACC GMA AAG A-3', plagl2 R920 5'-GGT ATG AGG TAG ATC CSA GCT G-3' (Li et al., 2007). A new reverse primer was developed specifically for Esox sequences to amplify a small COI fragment (131 bp) for the study on Museum DNA: EsoxminibarR130 5'-AAG ATT ATW ACR AAR GCA TGG GCT G-3'.

Table 4.2: Samples from historical collections selected for molecular work. When two specimens shared a jar and a collection number, they were singled by size or attachment of the collection label. Specimens have been identified morphologically before analyses. BOLD samples ID are given for samples for which the amplification of the COI short fragment was successful.

Morphological			Sampling location	Collector	Remark	<b>BOLD sample ID</b>
identification	numbe	r				
Esox	MNHN	France	Grand-Lieu Lake	Thomas		-
lucius	A-9974		(Loire) at Grand- Lieu	(1858)		
Esox	MNHN	B-Switzerland	Zug Lake (Rhine)	Major		-
lucius	0941					
Esox	MNHN	B-France	Rhone at Avignon	Blanchard		-
lucius	0946			(1880)		
Esox	MNHN I	B- France	Charente at I	LaD'Enfer		-
nov. sp.	0944		Rochelle	(1824)		
Esox	MNHN	B-France	Mouriscot Lak	keBlanchard	smallest	MNHN B-0945a
nov. sp.	0945		(Adour) at Biarritz	(1880)		
					with label	MNHN B-0945b
Esox	MNHN	B-Italy	Reno at Bologna	Savigny		-
cisalpinus	0942	· · · · · · ·		(1823)		
Esox	MNHN	B-Italy	Trasimeno Lak	ceCanali	no label	MNHN B-0947
cisalpinus	0947	,	(Tibre)			
					with label	-
Esox	MNHN	B-Italy	Como Lake (Po)	Pentland		-
cisalpinus	0948	~ ······	como Dano (10)			
Esox	MNHN	B-Switzerland	Leman Lake	Candolle	with label	MNHN B-0949a
cf. cisalpinus	0949	2 5 WILLOW	(Rhone) at Geneva	Culluono	1011 10001	
			(Tanono) at Gonova		no label	MNHN B-0949b

After denaturation for 2 min, the PCR was run for 50 to 60 cycles of (20 s, 94°C; 20s, 50°C; 50s to 1 min 10s, 72°C) on a Biometra trioblock (T3000) or a Biorad applied 2700 cycler. Successful PCRs were selected on ethidium-bromide stained agarose gels. Sanger sequencing was performed by a commercial company (Eurofins; http://www.eurofins.fr) using the same primers.

All sequences were obtained for both the reverse and forward primers. Chromatograms in both directions were compared using CodonCode Aligner 3.9 (Codon Code Corporation) and automatic base calls were checked along the sequence, both where the two sequences were in disagreement and elsewhere. The sequences were obtained (PCR and sequencing) at the same time as species from very divergent groups, so contaminations would be more visible. Any dubious sequence (high divergence, unexpected placement in the tree) was resequenced from an independent PCR. *Esox* Plag12 sequences include a relatively long microsatellite at one end that impacted sequence

quality. Sequences were trimmed to retain only the high quality part (531 bp). The Plagl2 outgroup used allowed to identify the synapomorphies comparing with *E. lucius* and *E. aquitanicus* sequences. This yielded one dataset for the partial COI gene (650 bp) and one for the nuclear Plagl2 marker (531 bp). We also included the sequences available in GenBank from other Esocids from all over the distribution area for both the ingroup and as outgroups (COI: *E. americanus americanus* Gmelin 1789: EU52476; *E. americanus vermiculatus* Lesueur 1846: EU52473; *E. cisalpinus* (labelled in GenBank as *E. flaviae*): HM563688, HM563691-92, HM563694-98, HM563700, HM563703-07; *E. lucius*: EU524578, EU524580-83, EU524585-92, FJ890069-71, HQ600728-29, HQ960518-22, HQ960531, HQ960615, HQ960640-41, HQ960650-51, HQ960671, HQ960745-47, HQ960799, HQ960989-90, HQ960994, HQ961032-34, JQ623940, KC500713-32; *E. masquinongy* Mitchill 1824: EU524594; *E. niger* Lesueur 1818: EU524606; Plagl2: *E. reichertii* Dybowski 1869: JN132603). All new sequences were deposited in the Barcode of Life database (Ratnasingham & Hebert, 2007) and GenBank with their voucher information.

Alignment was performed manually as neither marker includes indels.

A phylogenetic analysis was performed on the COI dataset using Bayesian inference (MrBayes 3.2, Ronquist *et al.*, 2012). A model partitioned by codon position was computed by JModelTest 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012). According to the results, four independent analyses with a GTR+I+G model were run for 10 million generations, sampling every 200 generations. 10% of the trees were discarded as burn-in after checking it was sufficient for convergence. After checking convergence had been reached, the trees and parameters resulting from the four analyses were pooled and combined in a consensus. Intra- and inter-specific distances (p-distances) were calculated with the software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). The same analysis was done with the Plagl2 gene, with a HKY model, and separating heterozygous alleles. An NJ distance tree with the Kimura 2 parameter model (Kimura, 1980) was built to perform hierarchical placement to identify the short sequences. They were also identified using blast in BOLD and GenBank, and comparison with sequences from our complete COI dataset at the diagnostic sites. The robustness of the clusters nodes was estimated by the bootstrap method (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates.

### Results

### Morphological variability among French pikes

The 49 specimens from the MNHN and BMNH collections were morphologically identified using the diagnoses of Lucentini *et al.* (2011), Bianco & Delamastro (2011) and Casselman *et al.* (1986), using color pattern of the coat, lateral scales count, and submandibular pores.

Six Italian individuals with 102 to 113 lateral scales, and a color patterns of diagonal bars or stellated spots (Lucentini et al., 2011) were re-identified as *E. cisalpinus*, and so was a French specimen (MNHN 2003-0242) from the Saint-André Lake (between Chambéry and Grenoble) with 113 lateral scales and 4 submandibular pores (but without any visible color pattern because of long formalin fixation).

Two specimens from the Leman Lake (MNHN B-0949) have 111 and 113 lateral scales, 5 submandibular pores, but their color pattern has been altered by ethanol. Without any other morphological characters, they were identified morphologically as *E. cf. cisalpinus*.

Three ancient specimens from south-western France (Charente MNHN B-0944 and Mouriscot Lake MNHN B-0945) have 104 and 108 lateral scales. But 4 individuals recently caught in the same area (MNHN 2013-0838, 2013-0389, 2013-1245, 2013-1246) show a low lateral scale count too, as well as a shorter snout, and a different color pattern with a width of 1–1.5 scale tending to split into small irregular white blotches, conferring a marbled aspect. These specimens seem to belong to a distinct lineage and were provisionally identified as an unknown species *Esox sp.* Two individuals from Charente drainage (Lien stream, MNHN 2013-1247) present a combination of color pattern and lateral scale counts of both species: the smallest one has a *E. lucius* color pattern and a low lateral scale count (112), whereas the biggest one has a higher, *E. lucius* characteristic, lateral scale count (117) and the divergent color pattern.

All the other specimens have white blotches, 117 to 148 lateral scales, and 5 submandibular pores and were identified mainly as *E. lucius*.

### Molecular evidence of a new species of pike in the South West of France

The phylogenetic tree based on the COI among 140 individuals (Fig. 4.3a) groups all pikes caught in France within the subgenus (*Esox*) (Raat, 1988; Grande *et al.*, 2004).

Two clades are clearly separated with a 4.0% mean pairwise divergence, with 24 diagnostic sites and high posterior probabilities. The first clade (A) is a large polytomy including samples identified as *Esox cisalpinus* and *E. lucius*. The 14 *E. cisalpinus* samples form a monophyletic cluster with a mean intraspecific divergence of 0.4% and 14 distinct haplotypes within a larger *E. lucius* cluster. The mean interspecific divergence with *E. lucius* is 1.6%, and there are 11 diagnostic sites. The 109 *E. lucius* samples do not form a monophyletic group because of a few Turkish specimens grouped with *E. cisalpinus* with low support (0.78 ppv). The mean intraspecific divergence of *E. lucius* is 0.3% and there are 13 distinct haplotypes (3 from France). There are two main groups of French haplotypes. The largest one includes samples from Charente, Dordogne, Garonne, Loire, Meuse, Rhone and Seine drainages, and their haplotypes are identical to those from Elbe and Danube drainages. The other group includes haplotypes from the Adour, Charente, Loire and Rhone drainages, and are closed to Canadian and some Central European pikes.

The second clade (B) includes 5 very distinct haplotypes from the French South West basins: Adour, Charente (including the Boutonne stream), Eyre and Dordogne. The distance within this clade is low (mean 0.2%), and no groups are supported or organized by area within it, except for samples from Charente drainage (0.97 ppv). This clade is very distinct from the rest of the *E. lucius* COI sequences covering the variability from all over its distribution area. It is sister group the cluster formed by *E. cisalpinus* and *E. lucius*. It is also distinct and remote from all other *Esox* species integrated in the analysis.

The Plagl2 phylogeny of 53 individuals (Fig. 4.3b) shows 2 haplotype assemblages characterizing *E. lucius* and samples from this second divergent *Esox* clade, and diverging by 3 diagnostic sites (Table 4.3). Plagl2 identification is in agreement with the morphological and COI results. However, 4 specimens from Adour, Charente (including the Boutonne stream) and Eyre basins (BRO23, 462, 506, and 545) are heterozygous and have both Plagl2 alleles. These specimens are probably hybrids between the divergent and the common *Esox*, and some of them combine the morphological characters of both. Moreover, 2 specimens identified morphologically and with COI as *E. lucius* are

homozygous for the divergent *Esox* Plagl2 allele, and conversely BRO22 has the COI haplotype of the divergent *Esox* and is homozygous for the Plagl2 haplotype of *E. lucius*.

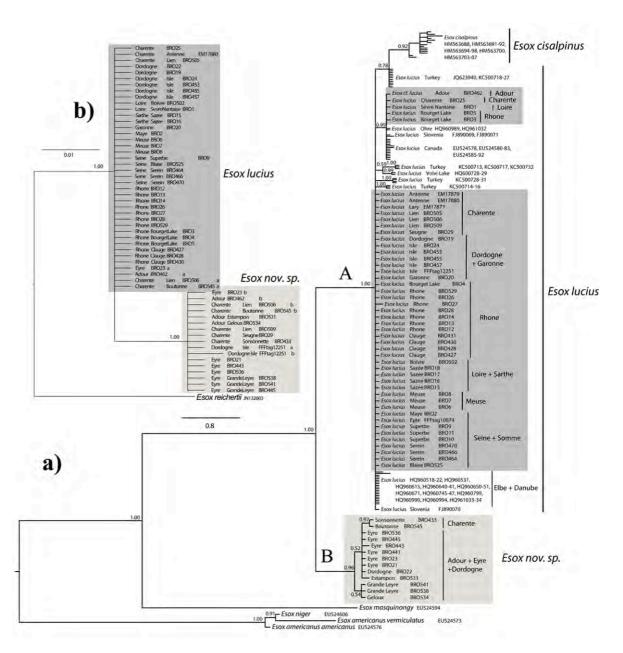


Figure 4.3: a) Bayesian tree of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) for 140 individuals of *Esox lucius* and other esocids. The mean *a posteriori* values of the parameters are (respectively for first, second and third codon position): TL = 27.534122; alpha = 96.371958, 0.053006, 108.993368; pinvar = 0.699196, 0.944113, 0.027670. b) Bayesian tree of the pleiomorphic adenoma gene-like 2 (Plagl2) alleles for 53 French esocids. TL = 0.374231. Suffixes "a" and "b" represent both alleles from heterozygous specimen. Numbers on the nodes represent posterior probabilities. Drainage origins of the French samples are highlighted with boxes: dark grey for *Esox lucius* and light grey for *Esox nov. sp.* 

Table 4.3: Diagnostic sites and probable hybrids for the Pleiomorphic adenoma gene-like 2 (Plagl2) sequences of the 52 individuals of French pikes; one *E. reichertii* sample was included as outgroup.

Identification	Sampling	Sample IDs	COI				Plagl2 position						
	location	•	clade	69	120	156	_	_	354 3		372	522	
			affiliation										
Esox lucius	Charente	BRO25	A	A	C	G	C	A	C	T	G	A	
Esox lucius	Antenne (Charente)	EM17880	Α	A	С	G	C	A	С	T	G	A	
Esox lucius	Lien (Charente)	BRO505	A	Α	C	G	C	A	C	T	$\mathbf{G}$	Α	
Esox cf. lucius	Dordogne	BRO22	В	Α	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Dordogne	BRO19	A	Α	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Isle (Dordogne)	BRO24, 453, 455, 457	A	A	C	G	C	A	C	T	G	A	
Esox lucius	Boivre (Loire)	BRO502	A	Α	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Sèvre Nantaise (Loire)	BRO1	A	A	C	G	C	A	C	T	G	A	
Esox lucius	Sazée (Sarthe)	BRO15, 16	A	Α	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Garonne	BRO20	A	Α	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Maye (Somme)	BRO2	A	A	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Meuse	BRO6, 7, 8	A	A	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Superbe (Seine)	BRO9	A	A	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Blaise (Seine)	BRO525	A	Α	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Serein (Seine)	BRO464, 466, 470	A	Α	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox lucius	Rhone	BRO12, 13, 14, 26, 27, 28, 529	A	A	C	G	C	A	C	T	G	A	
Esox lucius	Bourget Lake (Rhone)	BRO3, 4, 5	A	A	C	G	C	A	C	T	G	A	
Esox lucius	Clauge (Rhone)	BRO427, 428, 430	A	Α	C	G	C	A	C	T	G	Α	
Esox nov. sp. X lucius	Eyre	BRO23	В	A	С	G	C	R	C	Y	R	A	
Esox lucius X nov. sp.	Adour	BRO462	A	A	C	G	C	R	C	Y	R	A	
Esox lucius X nov. sp.	Lien (Charente)	BRO506	A	A	C	G	C	R	С	Y	R	A	
Esox nov. sp. X lucius	Boutonne (Charente)	BRO545	В	A	C	G	C	R	C	Y	R	A	
Esox nov. sp.	Estampon (Adour)	BRO531	В	A	С	G	С	G	C	C	A	A	
Esox nov. sp.	Geloux (Adour)	BRO534	В	A	C	G	C	$\mathbf{G}$	C	$\mathbf{C}$	A	Α	
Esox cf. nov. sp.	Lien (Charente)	BRO509	A	A	С	G	С	G	С	C	A	A	
Esox cf. nov. sp.	Seugne (Charente)	BRO29	A	A	С	G	С	G	С	C	A	A	
Esox nov. sp.	Sonsonnette (Charente)	BRO433	В	A	C	G	C	G	C	C	A	A	
Esox cf. nov. sp.	Isle (Dordogne)	FFFtag12251	A	A	C	G	C	G	C	C	A	A	
Esox nov. sp.	Eyre	BRO21, 443, 445, 536	В	A	C	G	C	G	C	C	A	A	
Esox nov. sp.	Grande Leyre (Eyre)	BRO538, 541	В	A	C	G	C	G	C	C	A	A	
Esox reichertii	\ \ \ \ /	JN132603		G	T	A	T	A	T	C	G	G	

Based on the position in the COI tree and the sequence divergence compared to all other pike species, on the distinct nuclear sequences for Plagl2 compared to the other

French pikes and *E. reichertii*, on morpho-meristic characters (see below), and on its distinctness with microsatellite data Launey *et al.* (2006), the divergent pikes are considered as a new pike species *Esox nov. sp.* 

### Molecular confirmation of Esox cisalpinus in France in the 19th century

Twelve samples from historical collections were selected to sequence the short COI fragment. However, only five yielded sequences: two specimens from Mouriscot Lake at Biarritz (Adour drainage, MNHN B-0945), one specimen from Trasimeno Lake in Italy (Tiber drainage, MNHN B-0947), and the two specimens from Leman Lake at Geneva (Rhone drainage, MNHN B-0949) (Table 4.2).

This DNA fragment provides a good discrimination of the three species despite its short length (Fig. 4.4).

In the tree-based identification, all the specimens morphologically assigned to the new species (including the specimens from Mouriscot Lake (MNHN B-0945)) cluster together, and they display 6 diagnostic sites. These sites are present in the ancient specimens. BLAST-searching the sequences does not yield results with similarity higher than 95% in either BOLD or GenBank. The *E. lucius* sequences form two clusters because of a single difference. One haplotype is shared between an ancient specimen from the Leman Lake (MNHN B-0949 (b)) and a recent one from the Rhone River, about 80 Km downstream (BRO27). All sequences of the specimens identified morphologically as *E. cisalpinus* cluster together (2 diagnostic sites). This cluster includes the specimen from Trasimeno Lake (MNHN B-0947), and the second individual from Leman Lake (MNHN B-0949 (a)).

Thus, the fragment of COI corroborates the morphological identification of specimens collected more than one century ago. This demonstrates the co-existence of *E. lucius* and *E. cisalpinus* in the Leman Lake at this period.

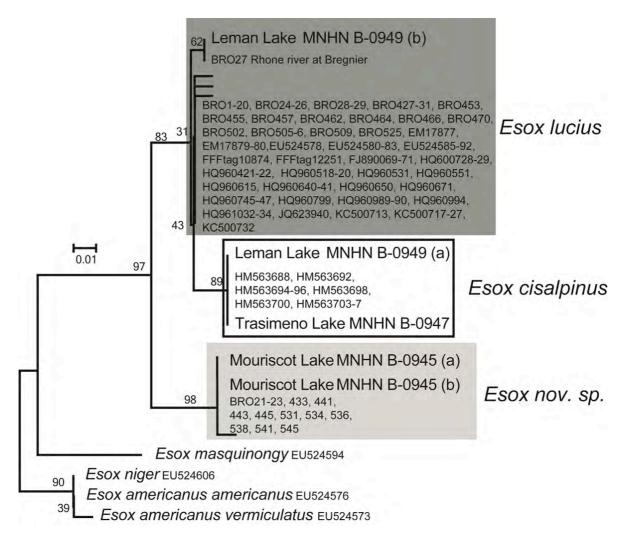


Figure 4.4: Barcoding NJ K2P tree of 131 bp of the COI marker on 136 individuals of *Esox lucius* and other esocids, including 5 from historical collections. Numbers on the nodes represent bootstrap values. A dark grey box highlights *Esox lucius* samples, a white box *E. cisalpinus* samples, and a light grey box *Esox nov. sp.* samples.

# Diagnostic description of the Aquitanian pike Esox aquitanicus sp. nov.

### Types and comparative material

The description is based on the observation of 6 specimens (see below) and completed by the analysis of photographs from 6 others released individuals. Specimens recognized as hybrids were not included in the description.

Holotype: MNHN 2013-1246, 372 mm SL, female; Adour drainage, Estampon, Saint-Gor; Denys & ONEMA, 08/10/2013. Paratypes: France: MNHN B-0944, 233 mm

SL; Charente-Maritime, La Rochelle; D'Enfer, 1824—MNHN B-0945, 2, 207-238 mm SL; Adour drainage, Mouriscot Lake, Biarritz; Blanchard, 1880—MNHN 2013-0838; 231 mm SL; Eyre drainage, Grande Leyre, Sabres; Denys & ONEMA, 10/10/2013—MNHN 2013-1245, 396 mm SL; Eyre drainage, Eyre, Belin-Béliet; Denys, 09/10/2013. Non type: France: MNHN 2013-0839; 416 mm SL; Charente drainage, Boutonne, Saint-Séverin-sur-Boutonne; Denys, 10/10/2013.

Comparative material. Esox cisalpinus: France: MNHN 2003-0242, 168 mm SL; Rhone drainage, Saint-André Lake; 24/06/1926— Italy: BMNH 1896.10.3.19, 241 mm SL; Po drainage, Lake Garda; Werner—BMNH 1896.10.3.20, 238 mm SL; Po drainage, Lake Garda; Werner— MNHN B-0942, 250 mm SL; Reno drainage, Reno, Bologna; Savigny, 1823—MNHN B-0947, 2, 172-204 mm SL; Tiber drainage, Lake Trasimeno; Canali—MNHN B-0948, 2, 292-341 mm SL; Po drainage, Lake Como; Pentland— Switzerland: MNHN B-0949, 1, 341 mm SL (the second specimen 295 mm SL was not included); Rhone drainage, Leman Lake, Geneva; Candolle. Esox lucius: BMNH 1853.11.12.114, type possible, 160 mm SL—Canada: MNHN B-2823, 590 mm SL; Saint-Laurent drainage, Erie Lake; Lesueur, 1818—MNHN 1994-0262, 5, 130-243 mm SL; Ontario, Saint-Laurent drainage, Sunshine creek; Momot & Hartviksen, 03/10/1986— Czech Republic: BMNH 1967.8.3.14, 270 mm SL; Danube drainage, Rybnik Vira, Lomnice and Luznici, the pound Vira, about 1 ha, South Bohemia, near the Town Trebon—MNHN 0000-1343, 252 mm SL; Danube drainage, Danube, Olomouc; Jetteleis, 1863—Estonia: BMNH 1925.5.22.17, 196 mm SL; Saadjaro, near Tartu (Dorpat); Piiper— Finland: MNHN 1884-0951, 307 mm SL; Enara; Rabot, 1884—MNHN 1884-0952, 230 mm SL; Enara; Rabot, 1884—MNHN 1884-0953, 335 mm SL; Nota; Rabot, 1884— France: MNHN 0000-1379, 189 mm SL; Seine drainage, Seine; Valenciennes—MNHN A-9974, 321 mm SL; Loire drainage, Grand Lieu Lake, Grand Lieu; Thomas, 1858—MNHN B-0946, 206 mm SL; Rhone drainage, Avignon; Blanchard, 1880—MNHN B-0950, 109 mm SL; Rhine drainage, Moselle, Metz; Malherbe, 1850—MNHN 1988-0373, 172 mm SL; Loire drainage, Indre, Le Blizon; Pletikosic & Zimermann, november 1987—MNHN 1993-3498, 285 mm SL; Seine drainage, Seine, Alfortville; Dingerkus & Guilbert, 01/08/1989—MNHN 2003-0133, 185 mm SL; Rhone drainage, Lake Paladru—MNHN 2011-1144, 241 mm SL; Seine drainage, Epte, Guerny; Denys & ONEMA, 20/10/2011— Germany: MNHN B-0943, 274 mm SL; Elbe drainage, Elbe; Nietsch, 1827—Macedonia: BMNH 1928.1.21.1, 263 mm SL; Lake Aghiou Vasseli, near from Salonika—Netherlands: BMNH 1953.6.26.8, 287 mm SL—MNHN 1975-0760, 132 mm SL; Vistonis Lake drainage, Richios; Economidis, 29/05/1975—Russia: MNHN 0000-1706, 2, 343-360 mm SL; Siberia, Irtysh drainage, Irtysh; Humboldt, 1830—MNHN B-0952, 2, 353-366 mm SL; Grande Duchesse Hélène—MNHN 1891-0200, 174 mm SL; Siberia, Petschora drainage, Petschora, Ust Poschow; Rabot, 1891—MNHN 1897-0515, 196 mm SL; Siberia, Ob drainage, Irtych, Kara irtych; Chaffanjon, 1897—MNHN 1897-0516, 155 mm SL; Siberia, Ob drainage, Irtych, Kara irtych; Chaffanjon, 1897—MNHN 1903-0141, 272 mm SL; Baical Lake; Labbe, 1903—Switzerland: MNHN B-0941, 347 mm SL; Rhine drainage, Zug Lake; Major—United-States: MNHN A-0793, 850 mm SL; Mississipi drainage, Wabash; Lesueur—MNHN A-1272, 151 mm SL; Lac Michigan, Oconomowoe; Jordan, 1879.

### **Diagnosis**

Esox aquitanicus is distinguished from the two other European species by a color pattern of the sides, with 1–1.5 scale wide oblique vertical bars conferring it a marbled coat (Fig. 4.5) and the combination of the following morpho-meristical characters: a shorter head with a snout 0.9 times larger than postorbital length (Fig. 4.6), an anal fin basis 1.1–1.2 times larger than caudal peduncle length, mainly 101 to 121 lateral scales and 53 to 57 vertebrae.



Figure 4.5: Holotype of *Esox aquitanicus* MNHN 2013-1246, 372 mm SL, coloration alive (a), and after fixation in formalin (b).

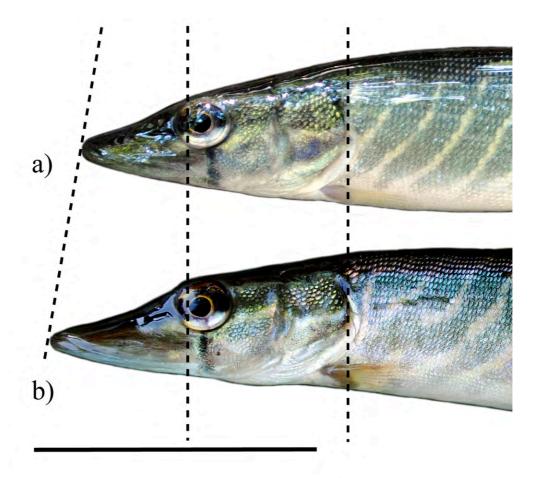


Figure 4.6: Head profile showing the difference in snout size of two juveniles caught in July of their birth year at one day interval: *Esox aquitanicus* BRO443, Eyre at Bélin-Béliet (a), and *Esox lucius* BRO453, Isle (Dordogne drainage) at Saint-Médard-de-Guizière (b); the specimens were released alive; scale bar: 30 mm.

### **Description**

General appearance is shown in Figures 4.5 and 4.6a; morphometric data are given in Table 4.4. The holotype counts are given first, followed by the paratypes counts in brackets, if different.

Table 4.4: Morphometry of *Esox aquitanicus*, *E. cisalpinus* and *E. lucius*. Values in parentheses: mean. Values of holotype included in range. Bold mean values highlight significant morphometric differences.

	E. aquitanicus		E. cisalpinus	E. lucius	
Number of specimens	6	holotype	7	38	
Standard length (mm)	207-396	372	168-341	106-850	
In percent of standard length					
Head length	28.6-34.3 (32.1)	28.6	31.8-33.8 (33.0)	27.3-37.1 (32.4)	
Predorsal length	72.6-79.8 (77.0)	72.6	75.7-79.0 (77.8)	73.7-79.7 (76.5)	
Prepectoral length	24.7-30.0 (27.8)	24.7	27.7-31.1 (28.8)	23.2-32.4 (28.2)	
Prepelvic length	51.5-59.9 (55.8)	51.5	54.4-59.6 (56.9)	52.6-60.7 (56.4)	
Preanal length	74.7-83.6 (79.4)	74.7	77.5-83.1 (80.6)	76.3-84.1 (79.5)	
Postdorsal length	8.0-12.2 (10.3)	12.1	8.5-11.2 (9.8)	8.4-12.5 (10.5)	
Length of caudal peduncle	9.0-10.9 (10.1)	10.8	8.5-11.7 (10.1)	7.9-13.7 (9.9)	
Distance between pectoral and	24.2-31.6 (26.9)	24.5	24.6-29.3 (27.0)	22.7-31.9 (26.8)	
pelvic fin bases					
Distance between pelvic-fin	20.3-24.0 (22.0)	20.9	19.5-23.8 (21.7)	18.1-25.4 (21.6)	
base and anal-fin origin					
Length of dorsal fin basis	13.3-15.5 (14.1)	14.3	12.2-14.3 (13.1)	11.5-15.7 (13.7)	
Length of pectoral fin	11.3-14.9 (13.7)	11.3	11.4-14.7 (13.1)	8.8-15.9 (12.8)	
Length of pelvic fin	11.0-14.5 (13.4)	11.0	11.8-14.2 (13.0)	8.6-14.9 (13.1)	
Length of anal fin basis	11.2-12.1 <b>(11.7</b> )	11.7	9.2-11.4 <b>(10.3)</b>	7.7-12.0 ( <b>10.4</b> )	
Body depth	16.9-18.6 (17.8)	17.3	15.2-20.3 (17.4)	13.8-19.7 (16.4)	
Depth of caudal peduncle	7.2-8.3 <b>(7.6)</b>	7.2	6.3-7.9 <b>(7.0</b> )	5.1-8.1 ( <b>6.7</b> )	
In percent of head length					
Snout length	39.2-42.3 <b>(40.7</b> )	42.3	40.7 <b>-</b> 47.8 <b>(43.1)</b>	39.8-52.1 ( <b>43.5</b> )	
Postorbital length	42.3-46.3 <b>(44.1)</b>	45.1	38.4-43.7 <b>(41.8</b> )	36.7-46.7 <b>(41.4)</b>	
Eye diameter	11.8-17.5 (15.2)	12.6	11.7-17.2 (15.1)	8.6-22.3 (15.1)	
Interorbital width	17.2-22.9 <b>(20.5)</b>	22.5	14.9-20.0 ( <b>17.8</b> )	13.8-23.7 ( <b>19.1</b> )	

This species has an extended and spindle-shaped body, a single dorsal fin in backwards position and opposed to the anal fin. Its large and flattened snout is 42.3% (39.2-42.3%) larger than head length. Its mandible is longer than the upper jaw, and teeth are implanted on vomer, tongue, palatins and inter-maxillaries. Small cycloid scales are present on preopercula and on the upper half of the opercula. The anal fin basis is 11.7% (11.2-12.1%) larger than standard length. Depth of caudal peduncle is 7.2 (7.3-8.3%) larger than standard length.

Lateral line with 106 (103-108) (101-121 with additional data from released samples) scales (Fig. 4.7); 12 (10–13) scales rows between the basis of pelvic fins and lateral line; 11 (11-13) scales rows between the basis of dorsal fin and lateral line. Dorsal fin with 6 (6–7) simple rays and 15 (13–15) branched rays. Anal fin with 4 (3–4) simple rays and 12 (12–14) branched rays. Pectoral fins with 1 simple ray and 14 (12–15) branched rays. Pelvic fins with 1 simple rays and 10 (9–10) branched rays. Caudal fin forked with 19 rays. Branchiostegal rays: 14 (13–14). Submandibular pores: 5-5. Vertebrae: 55 (53–57).

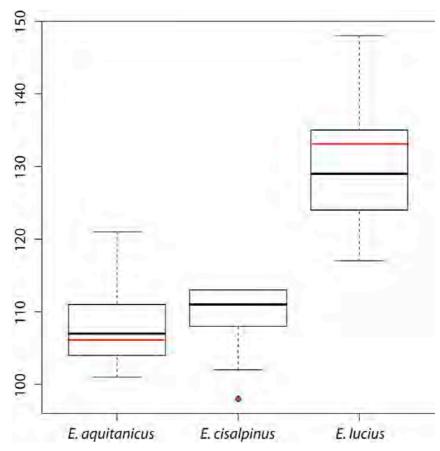


Figure 4.7: Boxplot representing the total number of scales on lateral line of *Esox aquitanicus* (N=13), *E. cisalpinus* (N=9), and *E. lucius* (N=50). Red marks represent type specimens.

# Comparison with closely related species

Esox aquitanicus is distinguished from E. lucius (from any origin) by 24 diagnostic sites on the long mitochondrial COI dataset and 3 in the nuclear Plagl2 dataset, by having fewer lateral scales (101–121, vs. 117-148; Fig. 4.7), a shorter snout (average 40.7 % HL, vs. 43.5 % HL; Fig. 4.6), a longer postorbital length (average 44.1 % HL, vs. 41.4 % HL), a slightly longer basis of the anal fin (average 11.7 % SL, vs. 10.4 % SL), a slightly deeper caudal peduncle (average 7.6 % SL, vs. mean 6.7 % SL), and a lower number of vertebrae (53–57, vs. 57–65; Keith et al., 2011a).

Esox aquitanicus is distinguished from E. cisalpinus by 26 diagnostic sites on the long COI dataset, by having a shorter snout (average 40.7 % HL, vs. 43.1 % HL), a longer postorbital length (average 44.1 % HL, vs. 41.8 % HL), a larger interorbital width length (average 20.4 % HL, vs. 17.8 % HL), a longer basis of the anal fin (average 11.6 % SL, vs.

10.3 % SL), a slightly deeper caudal peduncle (average 7.6 % SL, vs. 7.0 % SL), and a slightly higher number of branchiostegal rays (13–14, vs. 12–13).

Thus, *Esox aquitanicus* differs from both species by having a snout shorter than preopercular length (ratio snout length / preopercular length: 0.9 %, vs. 0.9–1.3 %), an anal fin basis always larger than the caudal peduncle (ratio anal fin basis /caudal peduncle length: 1.1–1.2 %, vs. 0.7–1.4 %), and by a marbled coat with 1–1.5 scale wide oblique vertical bands tending, in larger specimens, to be discontinuous until they form little irregular white blotches. The comparison was also made with specimens measuring between 200 and 400 mm SL (representing 60% of our sampling), and the conclusion was the same. As shown in Figure 4 with two juveniles caught in July of their birth year at one day interval, the difference of snout size is not due to an allometric effect.

# Color in life

Esox aquitanicus has grey to yellow-green flanks adorned with 16 to 30 oblique vertical bars with a width of 1–1.5 scale (very well marked in juveniles), which tend to be discontinuous into little irregular white blotches in larger fish, conferring a marbled aspect with very small white blotches (Fig. 4.4a). Fins color is yellow to orange. Dark pigmentation on paired fins are faint, as opposed to the unpaired fins which have well-developed dark vermiculations. Like E. lucius and E. cisalpinus, young individuals have a contrasting brownish vertical bar under the eye.

# **Color in preservation**

Samples preserved in formalin have a brown coloration, and the light parts like the belly and the ornamentation are yellow. Fins lose their pigmentation but not their dark blotches; only one specimen has conserved a trace of its orange pigmentation in the caudal fin after one month (MNHN 2013-0878). The brownish bar under the eye is still visible (Fig. 4.4b).

# Ecology and notes on biology

*E. aquitanicus* should have similar ecological characteristics as *E. lucius* in term of habitat, behavior, and predation (Craig, 2008), because no difference were mentioned about ecological traits between aquitanian and the other French pike populations, except an earlier spawning in February instead of March-April (Chimits, 1956). Size can exceed 1000 mm TL (Dégrave pers. comm.) A pike of 1370 mm was mentioned by Laporte (1853) in Cazeau Lake, right in the heart of the distribution area of *E. aquitanicus*. However, we cannot exclude early stockings of *E. lucius*. When there is cohabitation between the two species, the Aquitanian pike is able to hybridize with the northern pike (present study).

# **Distribution**

The Aquitanian pike is present in the Charente, Dordogne, Eyre and Adour basins. Mouriscot Lake constitutes its currently known most southern location (Fig. 4.8; Chimits, 1956). Considering the biogeographical history of Atlantic French drainages (Persat & Keith, 2011), it should occur in the Garonne basin too, but the population could have regressed following the introduction of the Northern Pike *E. lucius*. There are still higher probabilities to encounter the Aquitanian pike in small tributaries, where human do not stock Northern Pike, than in larger streams. It might be present in the Sèvre Niortaise basin but no specimen was captured, and in the Loire drainage but we captured only *E. lucius* individuals. It is possible that Aquitanian pike is stocked and sold as *E. lucius* by fish farmers of South West of France, in order to restock any waterbodies in France or abroad for sport fishing. Additional investigations to characterize the limits of the distribution area are necessary.

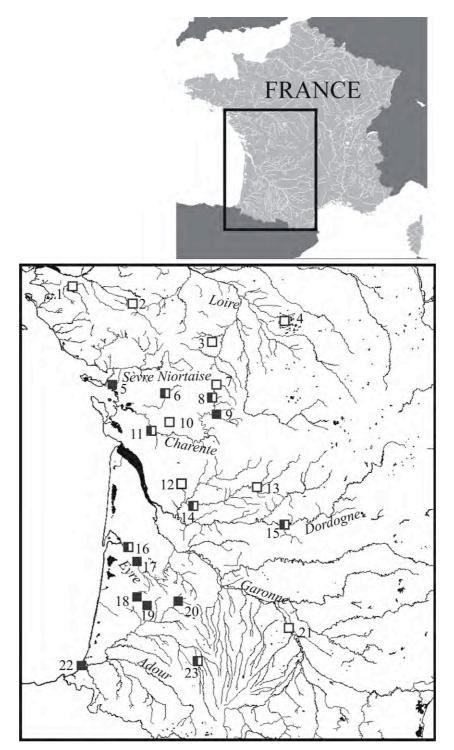


Figure 4.8: Occurences of *Esox aquitanicus* (black squares) and *E. lucius* (white squares) in the South West of France; numbers indicate the following locations: Grand-Lieu Lake (1), Sèvre Nantaise at Saint Malo du Bois (2), Boivre at Béruges (3), Indre at Le Blizon (4), La Rochelle (5), Boutonne at Saint-Séverin-sur-Boutonne (6), Charente at Saint-Saviol (7), Lien at Condac (8), Sonsonnette at Saint Front (9), Antenne at Le Seure (10), Seugne at Les Gonds (11), Lary at St-Martin-d'Ary (12), Isle at Trélissac (13), Isle at St-Médard-de-Guizière (14), Dordogne at Cénac-et-Saint-Julien (15), Eyre at Mios (16), Eyre at Bélin-Béliet (17), Grande Leyre at Sabres (18), Geloux at Garein (19), Estampon at Saint-Gor (20), Garonne at Verdun-sur-Garonne (21), Mouriscot Lake at Biarritz (22), Adour at Estirac (23).

# **Etymology**

The specific name *aquitanicus* is the adjective of Aquitania referring to the south west region of France, Aquitaine, where the species was discovered. For this reason, the vernacular name choosen is the Aquitanian pike (brochet aquitain in French).

# Molecular reference

Table 4.5 listes the GenBank accession numbers of COI and Plagl2 DNA sequences from specimens for which morphological and molecular data.

Table 4.5: DNA sequences of COI and Plagl2 and vouchers characterizing *Esox aquitanicus*. The sequences were tagged as suggested by the nomenclature of Chakrabarty *et al.* (2013).

<b>Specimen Catalog</b>	Tissu Catalog	BOLD sec	quences IDs	GenSeq Nomenclature			
		COI	Plagl2				
MNHN 2013-1246	MNHN ICTI 6388	FRBRO052-14	FRBRO052-14	Genseq-1 COI, Plagl2			
MNHN 2013-1245	MNHN ICTI 6389	FRBRO054-14	FRBRO054-14	Genseq-2 COI, Plagl2			
MNHN 2013-0878	MNHN ICTI 6390	FRBRO055-14	FRBRO055-14	Genseq-2 COI, Plagl2			
MNHN B-0945	MNHN ICTI 6391	FRBRO001-14	NA	Genseq-2 COI			
MNHN B-0945	MNHN ICTI 6392	FRBRO002-14	NA	Genseq-2 COI			
photo voucher	MNHN ICTI 6393	FRBRO036-14	FRBRO036-14	Genseq-5 COI, Plagl2			
photo voucher	MNHN ICTI 6394	FRBRO037-14	FRBRO037-14	Genseq-5 COI, Plagl2			
photo voucher	MNHN ICTI 6395	FRBRO053-14	FRBRO053-14	Genseq-5 COI, Plagl2			
photo voucher	MNHN ICTI 6396	FRBRO056-14	FRBRO056-14	Genseq-5 COI, Plagl2			

# **Discussion**

# **Evidence for three species of pike in France**

Morpho-meristical analysis discriminate *Esox lucius* and a group of pikes from the South West of France (see below). Moreover, the partial sequence for the mitochondrial gene COI for these specimens diverges from sequences for *E. lucius* by 4.0%. Most divergences between North American pike species areas above 2% (except between *E. niger* and *E. americanus* americanus) (Hubert *et al.*, 2008; April *et al.*, 2011). The nuclear marker Plagl2 corroborates this result. Our genetic analysis is in agreement with the microsatellite study of Launey *et al.* (2006) that included specimens from France and other European countries. These independent datasets all point to the existence of a new species of pike *Esox aquitanicus*, from Charente to Adour drainages.

Descriptions of *E. cisalpinus/E. flaviae* both lack complete morphometric studies. There is also a difference between the lateral scales numbers in the two descriptions: 101-115 (Lucentini *et al.*, 2011) *vs.* 92-107 (Bianco & Delmastro, 2011). In our study, specimens of this species have 102 to 113 lateral scales. *E. cisalpinus* samples form a cluster included within the *E. lucius* clade in the COI dataset analyzed by BI whereas NJ distance analysis separate them in distinct clusters. There are diagnostic sites for this cluster in the COI sequence, so assignation of specimens to *E. cisalpinus* or *E. lucius* is possible. Other molecular markers also support the distinction between these two species (Nicod *et al.*, 2004; Lucentini *et al.*, 2006, 2011), justifying thus the recognition of *E. cisalpinus* as a distinct evolutionary unit. Because all our specimens came from old collections, no Plag12 sequence could be obtained for *E. cisalpinus* in this study. It would be interesting to get some nuclear sequences of this species.

Two groups of COI haplotypes are present in French *E. lucius*: one closest to the Elbe and Danube drainages, and the other closest to Canadian populations. French specimens associated to the "Canadian group" might have an aquaculture origin (probably North American). Miller & Senanan (2003) observed genetic differentiation between North American and European pike populations, and recommended avoiding transcontinental restocking in order to maintain the genetic characterization. Our results indicate that such introductions probably took place in France and in other European drainages from North America or vice-versa. However, another freshwater fish species, actually better salt

tolerant, the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758 also displays such a similarity between both sides of the Atlantic Ocean (Mäkinen & Merilä, 2008).

The molecular identification checked with the morpho-meristic characters of old collections samples held at the MNHN uncovered specimens belonging to the 3 species. Out of two specimens caught in the Leman Lake in the first half of the 19<sup>th</sup> century (MNHN B-0949), one was identified genetically as E. cisalpinus whereas the other one was determined as E. lucius. Leman Lake borders Switzerland and France, so this analysis is the first known occurrence of E. cisalpinus in France, one century before the first recorded pike restocking campaign (Chimits, 1947). It confirms the presence of this species in the peri-alpine lakes North of the Alp range axis. These two species co-occured at this period. Nicod et al. (2004) sampled for their study 7 specimens of pike in the Leman Lake at Geneva, 4 in the Bourget Lake that is closed to the Saint-André Lake. All samples present the E. lucius haplotype rather than E. cisalpinus haplotype. It would however be necessary to check again for E. cisalpinus in all the peri-alpine lakes on a larger number samples, investigating more precisely possible traces left in the genomes specimens appearing as Esox lucius. Pike populations were very abundant in the peri-alpine lakes during the 16<sup>th</sup> century (Le Roux, 1928), but pike restocking became quite frequent in Switzerland during the 20<sup>th</sup> century (Pedroli et al., 1991), and this has had an impact on the genetic variability of native populations (Launey et al., 2006).

# Hybridization with the Northern pike

Hybridization is common within freshwater fishes in many groups, including Esocid species (Scribner *et al.*, 2001). While the hybrid *E. lucius* x *masquinongy* is sterile, the hybrid of the two more closely related *E. lucius* x *reichertii* is fertile (Raat, 1988). *E. lucius* is more closely related to *E. aquitanicus* (and even more to *E. cisalpinus*) than to *E. reichertii*. An old occurrence of introgressive hybridization is also suspected within Esocids between *E. niger* and *E. americanus americanus* (April *et al.*, 2011).

Lucentini *et al.* (2011) pointed out cohabitation of *E. lucius* and *E. cisalpinus* in Northern Italy, and hypothesized that specimens combining lower lateral scale numbers with the color pattern of Northern pikes are their hybrids. One of the MNHN pikes from Leman Lake was identified genetically as *E. lucius* but has a low lateral scales number (113); this might result from hybridization between cohabiting *E. cisalpinus* and *E. lucius*.

Plagl2 gene is a nuclear marker, and some specimens from the Adour, Charente and Eyre drainages are heterozygous, with both alleles present. Moreover, some specimens from these same basins were identified morphologically and with COI as one species, though they are heterozygous, with the haplotypes of both species present. It is the case of our two specimens caught in the Charente drainage (MNHN 2013-1247) which have the Plagl2 allele of *E. aquitanicus* (BRO506 and BRO509 being respectively heterozygous and homozygous), and an association of morphological characters from to the two species; they could therefore be considered as potential hybrids. Nevertheless more genetic studies with additional nuclear markers are needed in order to confirm this hypothesis (Ouellet-Cauchon *et al.*, 2014).

# Biogeography and conservation

The Northern Pike populations in France are regressing because of pollution, over-fishing, bank harnessing and dams, and the lost access to spawning grounds. For these reasons, this species is classified 'vulnerable' on the French red list of threatened species (IUCN France *et al.*, 2010; Keith *et al.*, 2011a).

The Aquitanian pike *E. aquitanicus* endemic from Charente to Adour drainages, like several other species in the South West of France (Kottelat & Freyhof, 2007; Keith *et al.*, 2011a) has a much smaller distribution area. Moreover, further introductions of Northern Pike from fish farming in Eastern France and other areas (Chimits, 1956; Martino, 2012), induce both hybridization and competition, and hybridization resulting from introduction of a non-native species is a major threat to endemic freshwater fishes (Gozlan *et al.*, 2010). Studies are strongly required to better assess the actual status and distribution of this new species.

The Cisalpine Pike *E. cisalpinus* is native from Italian drainages. Nevertheless to our knowledge the Rhone drainage was never connected with any Adriatic basin. Leman Lake was somewhat connected with the Rhine drainage during the retreat of the huge Rhone glacier that covered most of the Swiss plateau at the end of the last glacial maximum, and at the former glacial maximums probably as well (Persat & Keith, 2011). Only cold water fish fauna like salmonids were able to take advantage of this opportunity to colonize the Leman Lake. While pikes do not fear cold water, we do not know whether

it was able to swim back upstream to reach the Leman Lake, as this depended on the unknown water velocities prevailing at the northern outlet of the lake. Similarly, despite its presence in the French Rhone drainage basin during Paleolithic and Neolithic ages (Keith, 1998), there is no evidence that had the opportunity to cross the so-called "Pertes du Rhone" waterfall upwards between the Leman Lake upstream and the Bourget Lake downstream. Thus, the Cisalpine Pike is probably not native in Leman Lake, and could be the result of an ancient introduction: pike is already mentioned as a duty of the Geneva monastery to the Aoste church in Italy around 1150 (Forel, 1892). In Italy, the status of *E. cisalpinus* is still 'data deficient', but Bianco (2015) considers it 'vulnerable' because of the possibility of hybridization with *E. lucius*.

Because pike is a very important recreational and commercial fish, in France and other countries, it is highly manipulated and populations are regulated by fish dumping. Where only one species was previously known in France, our study highlights the presence of two other species with little known distributions. Further investigations are necessary to explore their biogeography, and their ecological traits. Both appear to occupy limited areas, and are threatened by the introduction of the Northern Pike *E. lucius*. They therefore deserve a place in the Red List of threatened freshwater fish in France (Collares-Pereira *et al.*, 2002; Keith & Marion, 2002), in order to organize the first conservation measures.

# Acknowledgements

This work was supported by the Muséum national d'Histoire naturelle, the UMR BOREA and the French Office de l'Eau et des Milieux aquatiques (ONEMA). We are particularly grateful to N. Poulet and S. Dembski. We thank the Fédération de la Pêche of Charente and all the Onema agents (especially M. Goillon, R. Martin, S. Vincelot, S. Manné, and S. Mougenez), as well as G. Hautecœur and the Pêcherie Parpillon for fish samplings. We also thank L. Dégrave (Parc Naturel Régional des Landes) and S. Lefèbvre (Onema) for their usefull information. The ichthyology curators of MNHN and BMNH gave access to the specimens, and provided the X-ray pictures. M. Mennesson, R. Debruyne and C. Bonillo helped with laboratory work. Laboratory access and assistance was provided by the "Service de Systématique Moléculaire" of the Muséum national d'Histoire naturelle (CNRS UMS 2700). And finally, we are grateful to J. Allardi, G. Carrel, A. Hassanin and F.J. Meunier for their advice and G. Lancelot and N. Schnell for their help with the manuscript.

# **Conclusion**

Ce travail de révision taxonomique des brochets de France a montré l'existence de 2 autres espèces de brochets dans nos cours d'eau, l'une, Esox cisalpinus, qui n'est probablement pas native, et dont la présence ancienne est validée dans certains lacs périalpins grâce aux spécimens conservés dans les collections du MNHN. L'autre, nouvelle pour la science, Esox aguitanicus, est endémique des bassins de la Charente à l'Adour ; des photos complémentaires de spécimens sont illustrées en Annexe 7. Sur des données de séquence avec d'autres marqueurs mitochondriaux, une récente étude en génétique sur le brochet commun, avec d'autres marqueurs mitochondriaux, a démontré l'existence de 3 lignées évolutives : une nord-européenne, une sud-européenne (danubienne), et une lignée circumpolaire (Skog et al., 2014). Les brochets communs de France natifs appartiennent à la lignée nord-européenne. Nos résultats ont également indiqué la présence de deux groupes au sein des E. lucius en France : un correspondant au groupe Elbe/Danube, et un autre aux populations canadiennes. Le COI ne permet pas de distinguer le groupe du Danube des autres alors que les spécimens proches des populations canadiennes font partie de la lignée circumpolaire. La présence de ces derniers est très probablement due aux opérations de repeuplements effectuées depuis la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Or ces opérations représentent actuellement une menace par introgression pour les deux autres espèces de brochets à distribution réduite (Launey et al., 2006; Gandolfi et al., 2014). Ainsi, nos résultats ont des conséquences en termes de gestion avec la nécessité de la mise en place de mesures de conservations adaptées. Afin de compléter nos connaissances, il est nécessaire de poursuivre l'effort d'échantillonnage et les analyses, en vue d'affiner la carte de répartition du brochet aquitain (notamment dans le bassin de la Garonne où aucune présence n'a été signalée pour le moment), et de vérifier la présence actuelle de l'*E. cisalpinus* en échantillonnant dans les lacs périalpins comme le Lac Léman.

Cette découverte de l'espèce permet également de mieux comprendre la phylogéographie des Esocidae d'Europe. Grâce aux nouvelles technologies de séquençage, qui nous ont permis de séquencer des mitogénomes complets pour plusieurs individus, nous avons pu retracer la phylogéographie des brochets de France *Esox* spp. à partir de génomes mitochondriaux complets de 16 *E. lucius*, 6 *E. aquitanicus* et 4 *E. cisalpinus*. Nos résultats distinguent non seulement les 3 espèces de brochets, mais aussi les 3 lignées d'*E. lucius* décrites par Skog *et al.* (2014) (Fig. 4.9). Nous avons également un spécimen

morphologiquement identifié comme E. lucius mais possédant le génome mitochondrial de l'E. aquitanicus, ce qui prouve la possibilité d'hybridation entre les deux espèces (résultat corroboré avec les marqueurs nucléaires). Notre datation moléculaire par calibration avec des fossiles estime une arrivée des brochets en Europe par l'Est au Miocène moyen, probablement grâce au réchauffement climatique global (voir You et al., 2009). Puis à la fin du Miocène, les brochets auraient profité de la très longue période de précipitations en Europe (Böhme et al., 2008) qui a provoqué des crues des rivières pour coloniser le Sud-Ouest de la France. Dans ce bassin, *E. aquitanicus* s'est spécié par spéciation allopatrique. L'ancêtre commun entre l'E. cisalpinus et l'E. lucius est estimé au Pliocène supérieur. Or la fin du Pliocène est marquée par le début des glaciations, et l'Italie a été isolée du reste de l'Europe durant les épisodes glaciaires (Bianco, 1995) ; ce qui aurait provoqué une spéciation allopatrique là aussi. Puis les différents épisodes glaciaires du Pléistocène ont résulté pen l'individualisation des différentes lignées de Skog et al. (2014). Enfin, la présence de spécimens appartenant aux lignées sud-européenne et circumpolaire est très probablement dûe aux opérations de repeuplements. Ainsi il est nécessaire de gérer les repeuplements de brochets en prêtant attention à l'origine des souches de repeuplement, afin de préserver ces espèces à hautes valeurs économiques et patrimoniales.

L'article est en cours de préparation, mais les résultats ont été présentés aux Rencontres de l'Ichtyologie de France en mars 2015<sup>6</sup>, et au Congrès européen d'ichtyologie à Porto en septembre 2015<sup>7</sup> dont le résumé est fourni en Annexe 8.

En définitive, l'utilisation de données morphologiques et moléculaires a permis dans notre étude sur le brochet de vérifier que les différentes sources de données donnent des résultats congruents, et de démontrer avec certitude l'existence d'une espèce non décrite, même sur un groupe peu riche en espèces et emblématique, dont on pensait connaître la systématique depuis des décennies. L'utilisation des collections muséologiques anciennes a apporté des données importantes pour toute révision taxonomique. Non seulement à travers les données morpho-méristiques prises sur les spécimens, mais aussi à travers leur analyse génétique. Les données de séquence sur les

.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> **DENYS G.P.J.**, HINSINGER D.D., DAVESNE D., DEBRUYNE R., DELMASTRO G.B., KEITH P., PERSAT H., UTGE J. & DETTAI A. - La « West Pike Story » des brochets de France *Esox* spp. (Actinopterygii, Esocidae) apportée par la mitogénomique. 6ème Rencontre de l'Ichtyologie en France, 24-27 mars 2015, Paris.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> **DENYS G.P.J.**, HINSINGER D.D., DAVESNE D., DEBRUYNE R., DELMASTRO G.B., KEITH P., PERSAT H., UTGE J. & DETTAI A. - West Pike's Story: a dated phylogeography of *Esox* spp. (Actinopterygii, Esocidae). XV European Congress of Ichthyology, 7-11 septembre 2015, Porto.

spécimens anciens ont permis de statuer sur leur présence ancienne. Le rôle des collections est donc tout à fait primordial dans le cadre de l'étude de l'évolution des peuplements.

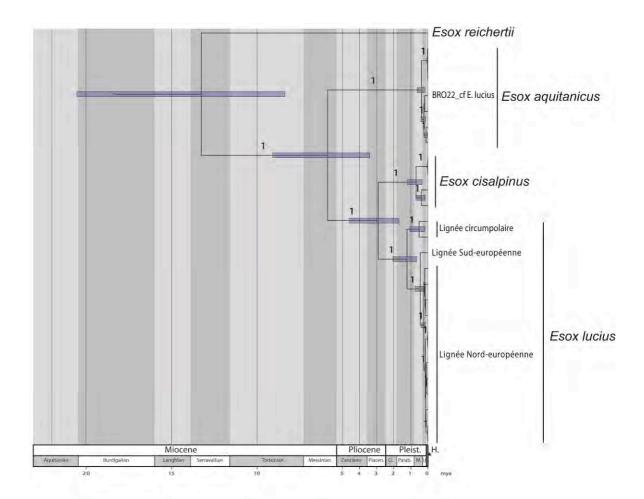


Figure 4.9: Arbre phylogénétique par inference bayésienne de génomes mitochondriaux de brochets, incluant 16 *E. lucius*, 6 *E. aquitanicus* et 4 *E. cisalpinus*, avec datation moléculaire calibrée avec des fossiles. Les valeurs aux nœuds indiquent les probabilités postérieures, les longueurs des branches sont corrélées à l'âge estimé sur l'échelle géologique (en bas) ; les barres bleues représentent les intervalles de confiance.

La révision taxonomique des brochets est finalement un cas simple d'une approche de taxonomique intégrative. Mais pour certains groupes, les données morphologiques et moléculaires ne sont pas congruentes ; c'est le cas pour les vairons (*Phoxinus* spp.) et les goujons (*Gobio* spp.) présentés dans les deux prochains chapitres.

# **CHAPITRE 5**

# DE L'UTILITE DES ROBES NUPTIALES : LE CAS DES VAIRONS *PHOXINUS* SPP

# DE L'UTILITE DES ROBES NUPTIALES : LE CAS DES VAIRONS *PHOXINUS* SPP

# **Préambule**

Les vairons *Phoxinus* spp. font également partie des taxons révisés par Kottelat & Freyhof (2007). A partir de caractères morphologiques uniquement issus de ses analyses morpho-méristiques, Kottelat (2007) a décrit deux espèces nouvelles en France. *Phoxinus bigerri* Kottelat, 2007 (Fig. 5.1a) est natif du bassin de l'Adour et se distingue par un museau busqué (Fig. 5.2a), une nageoire anale convexe (Fig 5.3a) (*vs.* museau droit (Fig. 5.2b) et une nageoire anale droite ou convexe chez *P. phoxinus* et *P. septimaniae* (Fig. 5.3b). *Phoxinus septimaniae* Kottelat, 2007 (Fig. 5.1b) est présent dans les bassins du Languedoc-Roussillon, et est caractérisé par la présence d'un plastron écailleux sous la gorge entre les nageoires pectorales (Fig. 5.4a) (*vs.* 2 blocs d'écailles à l'insertion des nageoires pectorales *P. phoxinus* et *P. bigerri* (Fig. 5.4b)). Le *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) *sensu stricto* (Fig. 5.1c), tel que Kottelat (2007) 1'a redécrit, serait présent dans les autres bassins français.

Geiger et al. (2014) ont corroboré les résultats de Kottelat (2007) à l'aide de données de séquence, confortant ainsi P. bigerri et P. septimaniae, mais incluant dans cette dernière espèce les populations supposées de P. phoxinus du bassin du Rhône. Les critères morphologiques diagnostiques définis par Kottelat (2007) et Kottelat et Freyhof (2007) ne seraient donc pas suffisamment pertinents (Bianco, 2014). Enfin, de nombreuses études génétiques soutiennent l'hypothèse de nombreuses espèces de vairons non décrites voire cryptiques en Europe (Mendel et al., 2012; Knebelsberger et al., 2015; Palandačić et al., 2015), confortant l'idée qu'une révision des vairons de France est nécessaire, et fait l'objet de ce chapitre.

J'ai ajouté aux critères morpho-méristiques et aux analyses génétiques, l'étude de la robe nuptiale. En effet, Spillmann (1961) a noté une variabilité des robes nuptiales arborées par les vairons durant la période de reproduction en fonction des régions. Cette information est importante car elle pourrait donner un élément diagnostique dans la taxonomie des vairons. Une variation de robes nuptiales pourrait avoir une incidence sur la sélection sexuelle et induire une spéciation.

Dans le cadre de cette thèse, cette étude a été réalisée en collaboration avec le Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig (ZFMK) de Bonn dans le cadre du programme européen FREDIE (<a href="http://www.fredie.eu">http://www.fredie.eu</a>), ainsi qu'avec l'Université de Lyon 1 Claude Bernard.



Figure 5.1: *Phoxinus bigerri* (a), Lausset à Cheraute ©G. DENYS, MNHN; *Phoxinus septimaniae* (en coloration nuptiale, b), Hérault à Valleraugue ©G. DENYS, MNHN; *Phoxinus phoxinus* (c), néotype NRM 55108, Agger à Lohmar ©S. WALTER, ZFMK.

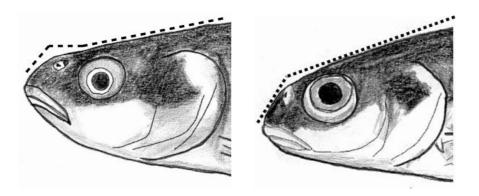


Figure 5.2: Profil de tête avec un museau busque caractéristique de *Phoxinus bigerri* (a), alors que chez *Phoxinus phoxinus* et *Phoxinus septimaniae* le museau est droit (b) ; dessins ©G. DENYS, MNHN.

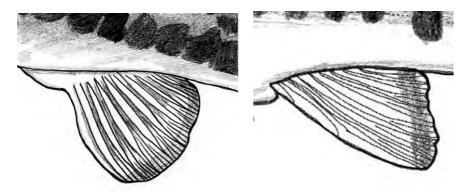


Figure 5.3: Nageoire anale convexe caractéristique de *Phoxinus bigerri* (a), alors que chez *Phoxinus phoxinus* et *Phoxinus septimaniae* leur nageoire anale est droite voire concave (b); dessins ©G. DENYS, MNHN.

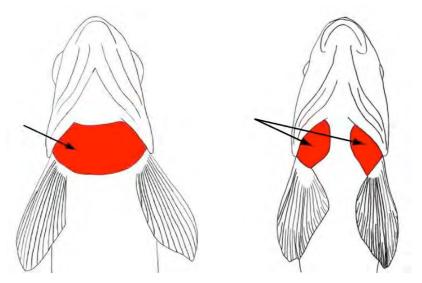


Figure 5.4: Plastron écailleux sous la gorge entre les nageoires pectorales caractéristique de *Phoxinus septimaniae* (a), alors que *Phoxinus phoxinus* et *Phoxinus bigerri* présentent 2 blocs d'écailles à l'insertion des nageoires pectorales (b) ; dessins ©G. DENYS, MNHN.

# Révision taxonomique des vairons de France *Phoxinus* spp. (Actinopterygii, Cyprinidae) selon une approche de taxonomie intégrative : évidence d'une spéciation par sélection sexuelle ?

# Article en préparation

Résumé. -. Pendant plus de deux siècles, une seule espèce de vairon, Phoxinus phoxinus, était connue en France. En 2007, une révision taxonomique sur des caractères morphologiques a permis la description de 2 autres espèces de vairons (P. bigerri et P. septimaniae). L'objectif de notre étude est de réaliser une révision taxonomique selon une approche intégrative en combinant des données moléculaires (COI) et morphologiques dont les robes nuptiales. Les analyses génétiques réalisées sur les vairons de France et d'Europe ont montré une forte structuration géographique par bassin. La comparaison des robes nuptiales montre une variation de colorations des mâles et femelles entre ces mêmes bassins. L'ensemble des résultats permet d'émettre l'hypothèse d'une spéciation des vairons allopatrique mais incluant donc une sélection sexuelle, et soutient par conséquent l'existence de 6 espèces de vairons en France : Phoxinus phoxinus (Seine-Normandie + Meuse), Phoxinus marsilii (Rhin), Phoxinus sp.1 (Loire + Vilaine + Charente), Phoxinus sp.2 (Dordogne + Garonne), Phoxinus bigerri (Adour / Eyre), et Phoxinus septimaniae (Rhône + bassins méditerranéens). Ce travail montre de nouveau les lacunes que nous avons en matière de connaissances de notre ichtyofaune, et il ouvre de nouvelles perspectives de recherche dans plusieurs disciplines en biologie.

### Mots-clés

Taxonomie intégrative, France, Cytochrome oxydase 1, Robes nuptiales, Phoxinus

# Introduction

Le vairon *Phoxinus spp* est un petit cyprinidé à répartition eurasiatique (Kottelat & Freyhof, 2007), rhéophile et cryophile vivant dans les rivières froides de montagne et dans les lacs limpides (Bănărescu & Coad, 1991; Keith et al., 2011a). En France, le vairon est autochtone sur l'ensemble du territoire à l'exception de la Corse et des lacs de montagne où il a été récemment introduit (Keith & Allardi, 2001; Keith et al., 2011a). Il est généralement décrit comme étant de couleur verte-olive, avec une ligne longitudinale plus claire au dessus des taches noires sur les flancs, et un ventre gris-blanc (e.g. Spillmann, 1961; Kottelat, 2007; Keith et al., 2011a). Comme chez la plupart des Cyprinidae, un dimorphisme sexuel s'observe lors de la reproduction, avec non seulement l'apparition de tuberbules nuptiaux sur la tête et sur la gorge (Witkowski & Rogowska, 1992; Chen & Arratia, 1996), mais également une parure de couleurs variables selon les auteurs : coloration rouge vif sur l'abdomen et les lèvres, mais aussi bleu-vert métallique avec du noir (Müller & Ward, 1995; Jacob et al., 2009; Kekäläinen et al., 2010a, 2011; Lai et al., 2013), ou coloration jaune citron (Keith et al., 2011a). Autrement dit, différents types de chromatophores sont activés durant cette période : les érythrophores (pigments rouges/oranges), les xanthophores (pigments jaunes), les leucophores (pigments blancs), les mélanophores (pigments noirs ou bruns) et les iridophores (pigments de couleurs métalliques) (e.g. Fuji, 2000). Spillmann (1961) mentionne une variabilité de robes nuptiales en fonction des régions tandis que d'autres auteurs caractérisent les robes de certains bassins. Une sélection de description de robes nuptiales par bassin versant est ainsi donnée dans le Tableau 5.1.

Or, de plus en plus d'études sur des données de séquence pointent la possibilité de nombreuses espèces de vairons non décrites voire cryptiques en Europe (Mendel *et al.*, 2012; Knebelsberger *et al.*, 2015; Palandačić *et al.*, 2015). Geiger *et al.* (2014), à l'aide du marqueur mitochondrial de la sous-unité 1 du cytochrome oxydase (COI), corrobore *P. bigerri* et *P. septimaniae* mais en incluant les populations de *P. phoxinus sensu* Kottelat (2007) du bassin du Rhône. Ainsi, les critères morphologiques diagnostiques définis par Kottelat (2007) et Kottelat et Freyhof (2007) ne seraient pas pertinents (Bianco, 2014). Mais certaines analyses en morphométrie géométrique (Bookstein, 1991) ont aussi décelé des divergences phénotypiques chez des populations de *P. phoxinus* en Asie (Paśko *et al.*, 2014), ainsi qu'entre des populations de *P. phoxinus* du Danube et *P. lumaireul* (Schinz,

1840) (Ramler *et al.*, 2015). Celles réalisées par Walter (2013) n'ont pas permis de discriminer les différents haplogroupes du bassin du Rhin (Knebelsberger *et al.*, 2015). Il a aussi été montré que la morphologie des vairons pouvait fortement être corrélée à leur environnement (Collin & Fumagalli, 2011, 2015). Ainsi, l'absence de critères diagnostiques fiables s'avère problématique pour la taxonomie des vairons malgré une recherche dynamique sur le sujet par de nombreuses publications.

L'objectif de cette étude est de réaliser une révision taxonomique des vairons de France, avec des données de séquence de COI à partir de spécimens identifiés morphologiquement selon les critères de Kottelat (2007), en incluant également des individus dont la robe nuptiale a été observée. Ce travail va donc prendre en compte à la fois la morpho-méristique, les différences génétiques et les patrons de coloration des robes nuptiales; ceci constitue par conséquent une approche de taxonomie intégrative (e.g. Padial et al., 2010). Ainsi, nous distinguerons les lignées évolutives comme espèces valides dans le cas où il y a congruence entre au moins deux de ces jeux de données. Des congruences entre la génétique et les différences de robes nuptiales ont déjà été observées chez differents groupes de téléostéens, notamment chez les Etheostomatinae (e.g. Harrington & Near, 2012) pour lesquels les robes nuptiales constituent des critères diagnostiques pour distinguer les espèces (Stepien & Haponski, 2015), mais aussi chez des Cichlidae (Pauers, 2010), et des Cyprinidae (Berendzen et al., 2009; Kraczkowski & Chernoff, 2014). Cette étude intervient alors que de nombreuses espèces de différents groupes de téléostéens ont été décrites en France durant cette dernière décennie (Freyhof et al., 2005; Kottelat & Persat, 2005; Doadrio et al., 2007; Kottelat & Freyhof, 2007; Keith et al., 2011a; Denys et al., 2013, 2014).

Tableau 5.1: Quelques descriptions de robes nuptiales de vairons dans différents bassins versants et trouvées dans la littérature.

Bassin	Descriptions de robes nuptiales
Charente	« La coloration est assez variable : le dos et les flancs sont de couleur grise, parsemés de taches foncées, ces mêmes parties possédant des reflets multicolores, chez le mâle en particulier, au moment de la reproduction. Le ventre a des teintes pourprées et toutes les nageoires sont de couleur jaune brillant. » (Yvernault, 1972)
Danube	« Durant la saison de frai en mai et juin de ce petit poisson, qui mesure au moint 3,5 pouces de long, décoré de belles couleurs, le dos est vert sombre, les côtés sont jaunes dorés, l'abdomen est cramoisi et la gorge noire, les nageoires pectorales et pelviennes sont si longues pour que le poisson puisse nager et sont colorées d'un blanc éclatant à la base. » (traduit de l'allemand; Heckel, 1836) « La coloration est particulièrement prononcée au moment du frai, surtout chez les mâles; le dos brun vert foncé, ligne noire médiane jusqu'à la nageoire caudale et bordée de jaune vert sur les côtés, reflets métalliques, commissure de la bouche rouge carmin, gorge noire, pectorales faiblement rougeâtres, bandeau noir sur l'œil et (parfois) à la base de la nageoire caudale, toutes les nageoires ne sont pas colorées sauf pour l'anale qui a des bandes noires ou grises; iris argenté voire doré. Certains mâles sont à cette époque presque entièrement noirs, sauf pour les nageoires, robe jaune-verte jusqu'à la queue, le ventre et la gorge; d'autres ne sont que partiellement tachetée de noir. Les couleurs des femelles sont toujours ternes. Pour les deux sexes, à ce moment des tubercules nuptiaux se forment sur la tête et le museau, qui émettent un signe certain de la saison de frai dans cette famille. » (traduit de l'allemand; Heckel & Kner, 1858)
Ebre	« Les mâles sont marqués par la présence de tubercules nuptiaux sur la tête pendant la saison des amours. De plus, sa coloration s'est renforcée en étant de plus en plus frappante; la bande de taches noires sur les flancs s'assombrit, la tache jaunâtre sur l'opercule apparaît ainsi qu'une coloration rougeâtre de la gorge, du ventre et de la base des nageoires paires et anale.» (traduit de l'espagnol; Leunda et al., 2010)
Loire	« tout le corps varié soit de couleur d'or ou d'argent, de nacre, d'azur, de rouge ou de noir» (Millet, 1828)  « Il est à remarquer qu'à l'époque du frai, qui a lieu en mai et en avril, toutes les nageoires inférieures de ce poisson se colorent en rouge à leur base » (Mauduyt, 1848)  « au moment du frai c'est un mélange de vert, de bronze et d'argent, avec la base des nageoires et une partie du ventre d'un beau rouge » (Villattes des Prûgnes, 1897)  « Au moment du frai, reflets bleuâtres sur le dos, bande longitudinale de même couleur sur les flancs ; lèvres, gorge, base des nageoires et une partir du ventre rouge écarlate » (Piton, 1931)  « Le mâle est alors en couleurs nuptiales très éclatantes, le ventre en rouge ou rosé, les verts de ses flancs s'avivent. Il porte sur la tête de petits tubercules cornés » (Magnan, 1982)
Rhin	« Quelques individus ont parfois le dessous du corps et la mâchoire inférieur d'un beau rouge écarlate ; d'autres enfin présentent trois lignes longitudinales variant du bleu sombre au jaune doré » (Fournel, 1836)
Rhône	« Le Vairon de la Bèze a le dessous de la mâchoire inférieure noir. Au mois d'avril on voit sur la tête du mâle des petites épines coniques; j'ai revu à la fin de mai ces mêmes caractères sur des Vairons pris dans l'Ouche, à l'aval du pont de l'hôpital. Un mâle avait sur la tête une multitude de ces petites épines coniques, si remarquables sur la majeure partie des mâles du genre Cyprin, à l'époque du frai.» (Vallot, 1837) « une tache rouge à l'angle de la bouche ; dos grisâtre, maculé de brun ou d'olivâtre ; côtés à taches bleues, jaunes et verdâtres d'un bel effet, argentins en dessous de la ligne latérale ; pectorales et ventrales à base d'un jaune rougeâtre, à sommet obtus. » (Ogérien, 1863)
Seine	« A l'époque du fraie, la coloration, surtout chez les mâles, est des plus brillantes; le dos est d'un acier bleu d'acier; le ventre est d'un jaune rougeâtre; la base des paires, ainsi que celles de l'anale, prend une teinte d'un rouge plus ou moins vif; la peau du mâle se recouvre d'espèces de tubercules, lors de la ponte la livrée de la femelle semble verdâtre; les ventrales et l'anale sont légèrement teintées de rose. » (Moreau, 1899) « Les parures nuptiales sont brillantes; à l'approche de la fraye (Vairons du Lunain, affluent du Loing) apparaissent au bas des flancs et sur le ventre des teintes vert émeraudes. Des taches d'un blanc éclatant, soulignées d'une marge noire, sont très apparentes à la base de chacune des nageoires à l'exception de la caudale. Deux taches, blanches également, sont visibles l'une à l'angle supérieur de l'opercule, l'autre à sa partie inférieure. Le dos est de teinte foncée, bleu acier ou vert avec des reflets violacés. Une ligne de teinte claire court le long des flancs, séparant le dos de la série des taches des flancs qui sont d'un noir intense. La gorge est blanc rosé. Dans les derniers temps enfin, apparaissent des teintes d'un rouge plus ou moins vif, à la mandibule, à la base des nageoires paires et de l'anale. » (Spillmann, 1961)

# Matériels et méthodes

# **Echantillonnage**

Afin de réaliser l'étude, 1036 spécimens ont été collectés dans 116 localités différentes (Fig. 5.5; Annexe 9). Les échantillonnages ont été réalisés en collaboration avec les agents de terrain de l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (Onema), des fédérations de pêche et de protection des milieux aquatiques, Henri Persat (Université Lyon 1, Claude Bernard), Mélyne Hautecoeur (MNHN), ainsi que des associations agréées de pêche et de protection des milieux aquatiques (AAPPMA). La plupart des échantillonnages ont été effectués en pêche électrique, mais aussi à la ligne (n° de permis : Wsytn56001).

Dans cet échantillonnage, 44 populations (soit 411 spécimens) ont été collectées de mai à juillet 2014, dans le but d'observer la robe nuptiale (Fig. 5.5). Les spécimens ont été placés quelques minutes dans un seau à fond sombre avec l'eau du lieu de prélèvement pour raviver les pigmentations, car les fonds clairs les dénaturent (Neuhauss, 2003). Les individus ont ensuite été pris en photo *in vivo* à l'aide d'un appareil photo numérique Nikon D3000 muni d'un objectif 18-55 mm réglé à 50 mm. La détermination du sexe a été réalisée en observant les nageoires pectorales : les mâles ont des nageoires longues, larges, épaisses et arrondies, tandis que celles des femelles sont nettement plus petites et faiblement arrondies (Frost, 1943).

Pour chaque station, 5 à 10 spécimens en moyenne ont été fixés et conservés dans de l'alcool 95°. Les 1036 vairons récoltés sur le terrain ont été identifiés morphologiquement selon les critères donnés par Kottelat (2007) :

- Phoxinus bigerri Kottelat, 2007 (Fig. 5.1a): longues bandes verticales sur le corps dépassant la moitié de la largeur, profil du museau busqué (Fig. 5.2a), bord de la nageoire anale droite ou convexe (Fig. 5.3a), 2 massifs écailleux de chaque côté de l'insertion des pectorales en vue ventrale (Fig. 5.4b), nageoire anale de même longueur que celle du pédoncule caudal;
- *Phoxinus septimaniae* Kottelat, 2007 (Fig. 5.1b) : pas de bande verticale sur le corps mais des taches carrés et des vermiculations sur le dos, profil du museau droit

(Fig. 5.2b), bord de la nageoire anale droite ou concave (Fig 5.3b), plastron écailleux sous la gorge (Fig. 5.4a), nageoire anale plus courte que la longueur du pédoncule caudal ;

• *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) (Fig. 5.1c): bandes verticales sur le corps ne dépassant pas la moitié de la largeur, profil du museau droit (Fig. 5.2b), bord de la nageoire anale droite ou concave (Fig. 5.3b), 2 massifs écailleux de chaque côté de l'insertion des pectorales en vue ventrale (Fig. 5.4b), nageoire anale plus courte que la longueur du pédoncule caudal.



Figure 5.5: Stations d'échantillonnage de vairons *Phoxinus* spp ; les carrés rouges représentent les stations où les robes nuptiales ont été observées.

Les types de différentes espèces de vairons ont été examinés notamment : *Phoxinus phoxinus* (néotype NRM 55108), *Phoxinus bigerri* (holotype MNHN 2006-1703 et

paratypes MNHN 2006-1704), *Phoxinus septimaniae* (holotype MNHN 2006-1701 et paratypes MNHN 2006-1702) et *Phoxinus marsilii* Heckel, 1836 (syntypes SMF 1980).

# Génétique

Des analyses génétiques ont également été réalisées, dans le cadre d'une analyse de taxonomie moléculaire *sensu* Tautz *et al.* (2003) en utilisant les séquences du marqueur mitochondrial de la sous-unité du cytochrome oxydase 1 (COI; 590 pb). 104 vairons ont été séquencés et enregistrés dans la base de données *Barcode of Life Data systems* (BOLD) (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Les ADNs ont été extraits à partir de fragments de nageoires prélevés et conservés dans de l'alcool à 95%, à l'aide d'un robot d'extraction epMotion 5075 (Eppendorf). Puis, pour les PCRs, nous avons suivi le protocole de Dettai et al. (2011) en utilisant les amorces COI: TelF1 5'-TCG ACT AAT CAY AAA GAY ATY GGC AC-3', TelR1 5'-ACT TCT GGG TGN CCA AAR AAT CAR AA-3' (Dettai et al., 2011), FishR1 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3' (Ward et al., 2005). Le séquençage a été réalisé selon la méthode « Sanger » (Sanger & Couson, 1975; Sanger et al., 1977) au Génoscope (Consortium National de Recherche en Génomique, Evry; http://geneoscope.cns.fr/), ou par l'entreprise Eurofins (http://www.eurofins.fr), sauf pour les individus collectés en 2014 qui ont été séquencés selon un séquençage nouvelle génération (NGS; Shendure & Ji, 2008) à l'aide du séquenceur PGM IonTorrrent. Le nettoyage des séquences obtenues en Sanger a été réalisé à l'aide du logiciel CodonCode Aligner version 2.0.6 (http://www.codoncode.com/aligner/), et avec Geneious V7.0 (Kearse et al., 2012) pour celles obtenues en NGS. Les séquences européennes ont été obtenues suivant Knebelsberger et al. (2015). Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel MUSCLE (Edgar, 2004). 463 séquences ont été ainsi obtenues et ont été rassemblées en haplotypes (voir Annexe 9) réduisant leur nombre à 212.

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées par inférence bayésienne (MrBayes 3.2, Ronquist *et al.*, 2012). Un modèle GTR+I+G partitionné par position de codon a été sélectionné par JModelTest 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012) et 4 analyses avec 10 millions de générations et un échantillonnage toutes les 200 générations ont été réalisées. 10% des arbres obtenus ont été éliminés après avoir vérifié la convergence. Les distances intra- et

inter-specifiques (p-distances) ont été calculées avec le logiciel MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

Afin d'affiner notre révision du genre *Phoxinus*, nous avons complété notre échantillonnage à l'aide de séquences de COI disponibles dans GenBank, et issus de travaux sur le barcoding des poissons d'eau douce de République tchèque (Mendel *et al.*, 2008), des bassins méditerranéens (Geiger *et al.*, 2014), et d'Allemagne (Knebelsberger *et al.*, 2015). Grâce au programme européen FREDIE (<a href="http://www.fredie.eu">http://www.fredie.eu</a>), nous avons également pu obtenir des séquences de COI répondant aux critères de qualités du Barcode of Life d'individus identifiés comme *P. phoxinus* et provenant d'autres pays et bassins européens: Angleterre, Autriche, Belgique, Bulgarie, Espagne, Estonie, Irlande, Lettonie, Lituanie, Norvège, Pologne, Russie, Slovénie, Suède, Roumanie et Ukraine (Annexe 9).

# Résultats

# **Identifications morphologiques**

Sur les 131 lots d'individus identifiés morphologiquement (cf tableau en Annexe 9), 16 lots ont été déterminés comme *P. bigerri* essentiellement dans le bassin de l'Adour (13 stations), mais également dans le bassin de l'Eyre (1 station) et dans quelques bassins méditerranéens (Aude + Tech; 2 stations). Vingt sept lots ont été déterminés comme étant *P. septimaniae*, dans les bassins du Languedoc-Roussillon (Agly, Aude, Berre, Buèges, Hérault, Lez, Massane, Tech, Têt; 24 stations), mais aussi dans une station de la Garonne proche des bassins méditerranéens (Douctouyre, 1 station), et dans 2 stations du bassin du Rhône méridional. Enfin 85 lots ont été identifiés comme *P. phoxinus*, provenant de la plupart des bassins: Charente (5 stations), Dordogne (5 stations), Garonne (12 stations), Loire-Bretagne (20 stations), Meuse (4 stations), bassins corses (2 stations), Rhin (5 stations), Rhône (11 stations), Sègre (1 station), Seine-Normandie (10 stations), bassins méditerranéens (Agly, Aude, Berre, Lez, Tech et Vidourle; 8 stations). Il y a toutefois trois lots qui posent problème. 2 lots provenant de la Salat (bassin de la Garonne) et du Tech dont les spécimens possèdent un plastron écailleux mais une ligne latérale presque complète, ont été identifiés comme *Phoxinus cf septimaniae*. Et un lot provenant du Golo a

été identifié comme *Phoxinus sp.* car les caractères ne semblaient correspondre à aucune des 3 espèces précédemment citées.

# Taxonomie moléculaire

Des analyses génétiques ont été réalisées sur 212 haplotypes (incluant des spécimens français et d'autres bassins européens) pour le marqueur mitochondrial du COI.

L'arbre phylogénétique par inférence bayésienne issu de l'analyse du COI (590 pb; Fig. 5.6) soutient la monophylie du genre *Phoxinus*, mais surtout la polyphylie de *P*. phoxinus. Il distingue en premier lieu un clade composé de 17 haplotypes de P. phoxinus des bassins de l'Oder, du Danube (République tchèque et Roumanie), de la Vistule (Pologne) et du Dniestr (Ukraine). Puis, un autre clade peu soutenu (0.78 ppv), composé de 7 haplotypes de P. phoxinus du bassin du Danube en Roumanie, se sépare d'un ensemble peu soutenu (0,78 ppv) qui est une polytomie de 5 clades. Un premier clade A, dans lequel sont séparés P. strymonicus (1 haplotype), P. strandjae (2 haplotypes), P. lumaireul (10 haplotypes) et un ensemble *P. phoxinus* du bassin du Rhin (incluant les spécimens français du Rhin) et du Danube en Autriche (46 haplotypes). Un deuxième clade B sépare un clade regroupant P. septimaniae et P. phoxinus du bassin du Rhône (21 haplotypes sans aucune structuration géographique), d'un ensemble composé d'un sous-groupe de 15 haplotypes des bassins du Rhin, de la Meuse, des bassins anglais et irlandais (le *Phoxinus sp.* du Golo est inclus dans ce clade), et d'un autre, 11 haplotypes corespondant à du P. phoxinus du bassin de la Seine et de la Normandie. Un troisième clade C est constitué de 2 groupes de P. phoxinus constituant d'une part un ensemble incluant successivement les haplotypes des bassins de la Charente (4 haplotypes), de la Vilaine (1 haplotype) et de la Loire (12 haplotypes) et, d'autre part, un clade intégrant 2 haplotypes de la Dordogne et 14 haplotypes de Garonne + la population du Sègre et celle du Tavignano en Corse. Un quatrième clade D, peu soutenu (0,52 ppv), sépare quant à lui un ensemble de 10 halotypes de P. phoxinus de l'Elbe, de la Weser et du Danube, d'un autre composé de 9 haplotypes de P. phoxinus de bassins baltes. Enfin, un dernier clade est composé de 18 haplotypes de P. bigerri.

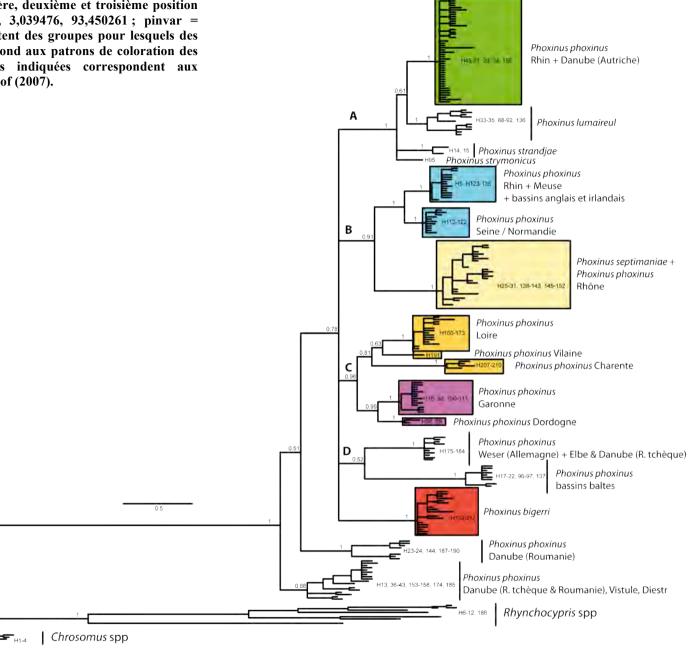
Les p-distances inter- et intra-groupes sont données dans le Tableau 5.2. Seules les haplotypes du clade (Rhin + Meuse + bassins anglais et irlandais) et ceux de la Seine, d'une part, et les haplotypes de la Garonne et de la Dordogne, d'autre part, ont une

divergence intergroupe inférieure à 2%. La structuration de l'arbre par espèces valides distinctes en groupe frère de lignées de *P. phoxinus*, et les divergences importantes pour des téléostéens suggèrent de nombreuses espèces non décrites au niveau européen. Nous nous limiterons cependant à la France.

Tableau 5.2: Matrice de p-distances entre les différents groupes d'haplotypes de *Phoxinus* spp. Les distances intra-groupes sont grisées. Les valeurs incluant des spécimens français sont en gras, et celles inférieures à 2% sont en italiques. A: *Phoxinus phoxinus* Rhin + Danube (Autriche), B: *Phoxinus lumaireul*, C: *Phoxinus strandjae*, D: *Phoxinus strymonicus*, E: *Phoxinus phoxinus* Rhin + Meuse + Angleterre + Irlande, F: *Phoxinus phoxinus* Seine/Normandie, G: *Phoxinus septimaniae* + *Phoxinus phoxinus* Rhône, H: *Phoxinus phoxinus* Loire, I: *Phoxinus phoxinus* Vilaine, J: *Phoxinus phoxinus* Charente, K: *Phoxinus phoxinus* Garonne, L: *Phoxinus phoxinus* Dordogne, M: *Phoxinus phoxinus* Elbe + Danube + Weser, N: *Phoxinus phoxinus* bassins baltes, O: *Phoxinus bigerri*, P: *Phoxinus phoxinus* Danube (Roumanie), Q: *Phoxinus phoxinus* Oder + Danube (République tchèque, Roumanie) + Vistule + Dniestr.

	Α	В	С	D	Е	F	G	Н	I	J	K	L	M	N	О	P	Q
A	0,31																
В	2,32	1,04															
С	2,34	2,67	0,5														
D	2,05	2	1,8	0													
Е	6,21	6,72	6,33	6,03	0,23												
F	5,63	6,52	6,07	5,77	1,62	0,22											
G	6,7	6,87	6,92	6,25	4,42	4,04	0,74										
Н	4,52	4,93	4,9	4,19	4,01	3,86	3,9	0,37									
I	4,49	4,82	4,5	4,2	4,3	4,15	4,89	2,46	0								
J	6,25	5,96	6,35	5,65	5,92	5,79	5,86	3,46	3,85	0,52							
K	4,94	4,95	4,91	4,2	4,29	3,87	4,72	2,79	2,7	4,1	0,31						
L	5,01	5,09	4,68	4,4	4,1	3,67	4,7	2,87	2,95	4,15	1,61	0,3					
M	5,48	5,15	5,35	4,84	4,35	4,1	5,44	4,26	4,26	5,8	3,97	4,4	0,32				
N	6,75	7,08	6,59	6	6,75	6,32	5,38	5,67	5,36	6,63	5,35	5,42	5,33	0,49			
О	5,23	5,51	5,88	5,18	5,09	4,48	6,79	4,49	4,34	5,52	4,19	4,34	5,21	7,37	0,57		
P	6,23	6,74	6,3	5,8	5,97	5,56	6,55	5,38	5,63	7,24	5,23	5,67	6,06	6,87	5,57	1,58	
Q	5,14	5,68	5,12	4,69	5,21	4,91	5,87	4,49	4,51	6,36	4,58	4,74	4,2	5,9	5,87	4,35	1,3

rnoxinus spp seion un moueie de substitution GTRTITG. Les nombres aux nœuds représentent les valeurs de probabilités postérieures. Les valeurs moyennes a posteriori des paramètres sont (respectivement pour la première, deuxième et troisième position de codon): TL = 41,952025; alpha = 0,036783, 3,039476, 93,450261; pinvar = 0,902713, 0,04218, 0,723907. Les encadrés représentent des groupes pour lesquels des individus français sont inclus; leur couleur correspond aux patrons de coloration des robes nuptiales observées. Les noms d'espèces indiquées correspondent aux déterminations selon les critères de Kottelat et Freyhof (2007).



# **Comparaison des robes nuptiales**

L'examen des robes nuptiales d'individus mâles et femelles de 44 populations dans les principaux bassins a permis de confirmer les variations de coloration des individus adultes en période de reproduction. Tous les mâles observés ont comme caractéristiques communes un changement de coloration de la tête s'assombrissant sur le museau, le dessus du crâne ainsi que la présence d'une bande noire sur l'opercule et la gorge. Les joues restent généralement blanches. Une tache jaune se forme sur l'opercule, ainsi qu'une tache blanche au dessus à l'angle supérieur. Enfin, les insertions des nageoires inférieures (pectorales, pelviennes et anale) deviennent blanches. En général, les femelles sont nettement moins colorées et parfois des tubercules nuptiaux sont observés.

Néanmoins, à l'intérieur de ces grandes trames de couleurs, 6 patrons différents de coloration mâles/femelles ont été mis en évidence.

Dans le bassin du Rhin, chez les mâles, la partie inférieure des flancs devient verte cachant ainsi les bandes longitudinales jusque sur le pédoncule caudal. Les bandes sur le pédoncule caudal restent visibles. La bouche devient rouge tout comme l'insertion des nagoires inférieures. Ces dernières restent jaunes pâles. Une bande noire relie les insertions des nageoires inférieures. Des tubercules nuptiaux se forment sur la tête (Fig. 5.7a). Les femelles présentent une coloration peu éclatante ; parfois une légère pigmentation jaune ou verte en dessous de la bande latérale noire peut être observée (Fig 5.7b, c et d).

Dans le bassin de la Seine, chez les mâles, la bande longitudinale noire verdâtre se sépare en bandes verticales minces ne dépassant pas la moitié de la hauteur du corps et colorié en vert. Tout autour de ces bandes, le corps se jaunit dans un premier temps avant de virer au jaune-vert cachant ainsi les bandes longitudinales à l'avant du corps. Les bandes sur la queue restent visibles. La bouche prend une teinte rosée, ainsi que les bases des nageoires inférieures qui sont de couleur jaune. De gros tubercules nuptiaux se forment sur la tête (Fig. 5.8a et b). Les femelles conservent leur bande longitudinale sur le corps et la partie inférieure des flancs devient verte. Notons également la présence de caractères « mâles », les taches blanches et jaune sur l'opercule, ainsi que les taches blanches à l'insertion de nageoires inférieures (Fig 5.8c et d). Les tubercules nuptiaux sont observables chez les deux sexes (plus petits chez la femelle).



Figure 5.7 : Robes nuptiales de vairons du bassin du Rhin : mâle Thur à Staffefelden (a), femelle Thur à Staffefelden (b), Eichel à Voellerdingen (c et d) ©G. DENYS, MNHN.



Figure 5.8 : Robes nuptiales de vairons du bassin de la Seine : mâle Beuvron à Ouagne (a), Ornain à Révigny sur Ornain (b), femelle Beuvron à Ouagne (c), Oise à Gergny (d). ©G. DENYS, MNHN.

Dans les bassins du Rhône et les bassins côtiers méditerranéens, chez les mâles, la bande longitudinale noire se maintient sauf en cas de stress du poisson. Aucune coloration verte n'est observée sur le corps (sauf rarement au niveau des pectorales). Les dos est de couleur brune à noire. Les flancs de part et d'autre de la bande longitudinale sont blancs ou dorés. L'insertion des nageoires inférieures jaunes-orange se colore en rouge, tout comme la bouche. Une tache jaune entre l'œil et la bouche peut être observée, tout comme une deuxième tache blanche sur l'opercule (sous la tache jaune). De nombreux tubercules nuptiaux se forment sur la tête (Fig. 5.9a à e). Les femelles possèdent la bande longitudinale médiane noire. Le dos est sombre, tandis que le ventre reste blanc. Aucune tache jaune n'est présente sur l'opercule. (Fig 5.9f et g).

Dans les bassins de la Loire et de la Charente, chez les mâles, la bande longitudinale noire se sépare en bandes verticales plus ou moins épaisses aux espacements irréguliers, faisant presque la hauteur du corps, et deviennent vertes sur la partie inférieure des flancs. Tout autour de ces bandes, le corps se colore en jaune vif. Les nageoires inférieures deviennent jaunes ou orange. Un liseré noir peut se former des nageoires pelviennes jusqu'au pédoncule caudal. Notons enfin que la tache jaune sur l'opercule est plus grande, recouvrant quasiment l'operculaire (Fig. 5.10a et b). Chez les femelles, les bandes verticales forment une bande longitudinale médiane verte sur la moitié antérieure du corps. La partie inférieure reste blanche, mais des pigmentations rouges sont observables à l'insertion des nageoires inférieures, ainsi que sur le ventre. Notons également la présence de caractères « mâles », les taches blanches et jaunes sur l'opercule, ainsi que les taches blanches à l'insertion des nageoires inférieures (Fig 5.10c, d et e). Les tubercules nuptiaux sont observables chez les deux sexes, mais plus petits chez la femelle.



Figure 5.9 (ci-contre): Robes nuptiales de vairons des bassins du Rhône et méditerranéens : mâle Hérault à Valleraugues (a), Ilouvre à Babeau-Bouldoux (b), Luech à Chamborigaud (c), Suran à Neuville sur Ain (d), Calavon à Viens (e) femelle Ilouvre à Babeau-Bouldoux (f), Galaure à Châteuneuf de Galaure (g). ©G. DENYS, MNHN.



Figure 5.10 : Robes nuptiales de vairons des bassins de la Loire et de la Charente : mâle Tardoire à Champagnac-la-Rivière (a), Nièvre à Dompierre sur Nièvre (b), femelle Tardoire à Champagnac-la-Rivière (c), Sonnette à Parzac (d), Bioron à Pionsat (e). ©G. DENYS, MNHN.

Dans les bassins de la Dordogne et de la Garonne, chez les mâles, la bande longitudinale noire se sépare en bandes verticales plus ou moins minces aux espacements irréguliers, formant une bande longitudinale médiane verte sur la moitié antérieure du corps. La partie inférieure des flancs en dessous de la bande verte se colore en jaune-vert. Les nageoires inférieures deviennent jaunes-orange. Un liseré noir peut se former des nageoires pectorales jusqu'au pédoncule caudal. Enfin, la bouche est fortement colorée en rouge (Fig. 5.11a et b). Chez les femelles, la bande longitudinale médiane noire reste plus ou moins formée. La partie inférieure en dessous de celle-ci se colore en jaune-vert jusqu'à la nagoire anale. Un liseré noir peut se former des nageoires pectorales jusqu'au pédoncule caudal. Des pigmentations rosées sont observables à l'insertion des nageoires inférieures, ainsi que sur la bouche. Le ventre reste blanc. Notons également la présence de caractères « mâles », les taches blanches et jaunes sur l'opercule, ainsi que les taches blanches à l'insertion de nageoires inférieures (Fig 5.11c et d). Les tubercules nuptiaux sont observables chez les deux sexes.

Dans le bassin de l'Adour, chez les mâles, la bande longitudinale noire se disloque en bandes verticales plus ou moins minces faisant plus de la moitié de la hauteur du corps et restent noires. Tout autour de ces bandes, le corps se colore en jaune-ocre. Les nageoires inférieures deviennent orange. Des gros tubercules nuptiaux se forment sur la tête (Fig. 5.12a et b). Les femelles possèdent également les longues bandes verticales sur le corps et noircissent (Fig 5.12c et d).



Figure 5.11 : Robes nuptiales de vairons des bassins de la Garonne et de la Dordogne : mâle Arrat-Devant à Manent-Montané (a), Ciron à Escaudes (b), femelle Couze à Bayac (c), Arrat-Devant à Manent-Montané (d). ©G. DENYS, MNHN.



Figure 5.12 : Robes nuptiales de vairons du bassin de l'Adour: mâle Adour à Estirac (a), Lausset à Chéraute (b), femelle Adour à Estirac (c), Lausset à Chéraute (d). ©G. DENYS, MNHN.

Les 6 paires de robes nuptiales que nous avons décrites correspondent à 6 clades bien distincts dans l'analyse phylogénétique (Fig. 5.6): dans l'ordre de description (i) Rhin + Danube Autrichien, (ii) Seine/Normandie + Meuse, (iii) Rhône + bassins méditerranéens, (iv) Loire, Vilaine, Charente, (v) Dordogne/Garonne, et (vi) Adour. Nous avons donc une concordance des résultats de génétique et les observations des parures nuptiales.

#### Discussion

#### L'apport des données moléculaires

Kottelat (2007) a réalisé une analyse morpho-méristique des vairons de France et a distingué 3 morphotypes correspondant à 3 espèces qu'il a décrits : *P. phoxinus*, *P. bigerri* et *P. septimaniae*. Tout comme Geiger *et al.* (2014), nos résultats en génétique valident bien *P. bigerri* et le clade *P. septimaniae* inclut également les *P. phoxinus* du bassin du Rhône. Ainsi, les critères morphologiques tels que de la présence d'un plastron écailleux au niveau de la gorge ne sont pas informatifs, ce qui rejoint la remarque de Bianco (2015) concernant la pertinence de ces caractères.

Notre arbre phylogénétique a également mis en évidence la polyphylie de P. phoxinus et la présence possible de plusieurs espèces non décrites en Europe (Mendel et al., 2012; Knebelsberger et al., 2015; Palandačić et al., 2015) et en particulier en France. Les différents clusters définis ont une forte structuration géographique, avec notamment les principaux bassins versants français qui ont chacun leur propre ensemble. Ces résultats devront être confirmés par l'utilisation de marqueurs nucléaires tels que le RAG1 (Palandačić et al., 2015). Des structurations par bassins ont déjà été observées chez d'autres groupes comme les vandoises (Costedoat et al., 2006) ou les chabots (Eppe et al., 1999, Englbrecht et al., 2000; Volckaert et al., 2002; Knapen et al., 2003), et contrairement au brochet (voir chapitre 4; Denys et al., 2014) et aux goujons (voir chapitre 6), nous observons également des clades distincts correspondant aux bassins du nord de la Loire (Seine, Meuse, Rhin). Ceci indique probablement que les vairons ont été peu impactés par les épisodes glaciaires (voir Persat & Keith, 2011), car ils auraient trouvé des zones refuges à l'intérieur de ces bassins (Costedoat & Gilles, 2009). Une étude de phylogéographie à l'échelle européenne serait intéressante pour comprendre l'évolution de ce genre.

Enfin, notre étude a apporté des précisions sur la distribution de chacune des espèces. *P. bigerri* se rencontre également dans le bassin de la Leyre et a été introduit dans l'Aude (Chastannet, comm. pers.). Un haplotype du clade (Rhin + Meuse) est retrouvé dans le Golo en Corse, et le groupe d'haplotypes Dordogne/ Garonne, est aussi rencontré dans le Sègre français et dans le Tavignano en Corse. Il paraît très probable que ce soit le

résultat des déversements pour la pêche aux Salmonidés qui sont importantes en France (Persat, comm. pers.).

#### Variabilité des robes nuptiales

Les robes nuptiales des mâles de vairons présentent une forte variation entre les bassins versants. Nous avons ainsi trouvé 6 patrons différents. La plupart de nos descriptions sont en accord avec ce qui a été publié auparavant dans les observations naturalistes anciennes ou plus récentes (Tabl. 5.1). Les différents patrons de colorations ont été décrit à l'œil nu, et l'intensité des colorations varie avec le temps. Des travaux de mesures des spectres de coloration devront être réalisées afin de quantifier les différenciations (e.g. Gumm *et al.*, 2011 ; Miyagi & Terai, 2013).

L'importance dans le choix du mâle par les femelles au sein d'une même population de la coloration des robes nuptiales de vairons est connue (Kekäläinen *et al.*, 2010a; 2011). La coloration est un indicateur de progénitures avec une plus forte viabilité, en meilleure condition, avec une croissance plus rapide, un plus grand succès quand à la prise de nourriture, et une meilleure résistance aux parasites (voir Kekäläinen *et al.*, 2010a). Les mâles les plus ornementés auraient une meilleure performance à la nage (Lai *et al.*, 2013), qui conduirait à un meilleur succès reproducteur, tout comme les plus gros et ceux possédant des tubercules nuptiaux (Jacob *et al.*, 2009). Ils sont par conséquent mieux à même de transmettre ces caractères à leur descendance, pérénisant l'espèce (Radwan, 2008; Maan & Seehausen, 2011).

La variabilité des robes nuptiales est également bien observable chez les femelles, ce qui a été jusque là peu décrit dans la littérature (Tabl. 5.1). Ainsi, il se pourrait qu'il y ait également sélection de la femelle par les mâles (e.g. Amundsen & Forsgren, 2001). Les femelles enverraient aux mâles le signal de leur disposition à pondre (Rowland *et al.*, 1991; McLennan, 1995).

Les bancs de vairons peuvent être composés uniquement de mâles ou de femelles (Kottelat 2007; Denys obs. pers.), ce qui ce qui induirait une compétition entre individus pour les deux sexes au moment de la reproduction (Barlow, 2005). L'accouplement entre les mâles et les femelles ornementés favoriserait l'efficacité de la procréation, comme chez les corégones (Kekäläinen *et al.*, 2010b).

La variabilité des colorations peuvent être induites par de nombreux facteurs, qu'ils soient génétiques (homozygotie, hétérozygotie des « bon gènes »...) ou environnementaux (prédation, régime alimentaire, parasites, etc...) (Radwan, 2008 ; Maan & Seehausen, 2011).

La sélection sexuelle favorise des phénomènes de spéciation (voir Maan & Seehausen, 2011). Nous pouvons émettre ainsi l'hypothèse que des mâles et femelles provenant d'un même bassin favoriseraient un partenaire avec des colorations caractéristiques du bassin, par rapport à un autre individu différent (venant d'un autre bassin par exemple) et ayant une coloration différente. Pour valider cette hypothèse, des études comportementales seraient nécessaires. De même, comme les déversements de vairons sont fréquents (Persat, comm. pers.), et que les individus introduits s'intègrent parfaitement dans les cohortes natives (Bernardt *et al.*, 2012), l'utilisation de marqueurs nucléaires est également nécessaire pour vérifier si, dans la nature, cette variation de robes nuptiales constitue une barrière efficace à la reproduction (données en cours d'acquisition). La séparation par bassin indiquerait une spéciation allopatrique, avec divergence et mise en place des barrières pré-zygotiques (la coloration). La perméabilité de ces barrières reste à évaluer avec des marqueurs nucléaires (Grenier *et al.*, 2013).

#### Six espèces de vairons en France

Nous avons réalisé une révision taxonomique des vairons *Phoxinus* spp de France, en utilisant des critères génétiques et morphologiques liées à la reproduction comme les robes nuptiales. Kottelat (2007) avaient réalisé seulement une étude morpho-méristique mettant en évidence l'existence de 3 espèces de vairons : *P. phoxinus*, *P. bigerri*, et *P. septimaniae*. Cependant, son échantillonnage n'était pas représentatif de l'ensemble des bassins français.

Notre phylogénie moléculaire des vairons sur le marqueur du COI montre une forte structuration géographique, mettant en évidence 8 lignées évolutives distinctes : (i) Rhin + Danube Autrichien, (ii) Seine/Normandie + Meuse, (iii) Rhône + bassins méditerranéens, (iv) Loire, (v) Vilaine, (vi) Charente, (vii) Dordogne/Garonne, (viii) Adour / Eyre. Ces entités sont structurées dans l'arbre parmi des clades incluant des espèces valides.

La comparaison des robes nuptiales a démontré une différence de colorations mâles et femelles entre ces mêmes bassins, à l'exception des bassins de la Loire, de la Vilaine et de la Charente pour lesquels aucune différence n'a été trouvée.

Enfin, la comparaison des données morpho-méristiques sur l'ensemble de la France met en évidence 6 entités distinctes. L'ensemble des résultats soutiennent par conséquent l'existence de 6 espèces de vairons en France, selon une approche de taxonomie intégrative (Padial *et al.*, 2010) (Fig. 5.5).

La localité type de *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) est la rivière Agger, un affluent du Rhin en Allemagne (Kottelat, 2007). Or les analyses génétiques sur les vairons allemands n'ont pas montré de structuration géographique par bassin comme en France, du fait des multiples manipulations des populations réalisées (Freyhof, 1998, 2003 ; Bernardt et al., 2012); par exemple le Rhin est représenté dans deux clusters différents (Walter, 2013 ; Knebelsberger et al., 2015). Ainsi, P. phoxinus vit en sympatrie avec une autre espèce de vairon dans le bassin du Rhin, y compris dans la Agger (Walter, 2013). La difficulté est que le néotype désigné par Kottelat (2007) a été fixé au formol et, par conséquent, aucune analyse génétique ne peut être effectuée pour savoir à quel cluster ce spécimen appartiendrait. Walter (2013) a réalisé une étude de morphométrie géométrique entre les individus appartenant aux différents groupes d'haplotypes du bassin du Rhin, mais n'a trouvé aucune différence significative. Heckel (1836) avait noté deux types de vairons différents en Europe se distinguant principalement par leur nombre d'écailles sur la ligne latérale : *Phoxinus laevis* Fitzinger, 1832 (synonyme de *P. phoxinus* (Kottelat, 1997)) avec 80-82 écailles et P. marsilii Heckel 1836 avec 85-90 écailles, dont la localité type est à Vienne en Autriche. Le néotype de *Phoxinus phoxinus* ayant 82 écailles sur la ligne latérale (Fig. 5.1c), nous assumons la décision d'affirmer qu'il appartiendrait au cluster dans lequel on y trouve des individus des bassins de la Rhin + Meuse + bassins anglais et irlandais + Seine-Normandie. Phoxinus phoxinus se caractérise par une longueur dorsaleanale plus faible, ainsi qu'un pédoncule caudal plus mince.

La description de la robe nuptiale des vairons de Vienne (Autriche) par Heckel & Kner (1858; Tabl. 5.1) correspond à ce que nous avons observé sur les spécimens français du Rhin qui appartiennent au même groupe d'haplotypes du Danube autrichien (Fig. 5.7). Par conséquent, les vairons français du bassin du Rhin appartiennent à l'espèce *Phoxinus marsilii* Heckel, 1836 qui devrait être re-validée. *Phoxinus marsilii* se caractérise par un plus grand nombre d'écailles sur la ligne latérale, une longueur post-dorsale plus grande, ainsi qu'un pédoncule caudal plus long.

Les vairons des bassins de l'Adour et de l'Eyre appartiennent à l'espèce *Phoxinus bigerri* Kottelat (2007) qui est valide. Notons que cette espèce a été introduite localement dans le département de l'Aude. *Phoxinus bigerri* se caractérise par le bord de la nageoire anale convexe et un museau busqué chez certains spécimens, une longueur post-dorsale plus petite, ainsi qu'un pédoncule caudal plus petit.

Ni nos analyses génétiques, ni l'étude des robes nuptiales n'arrivent à distinguer les individus identifiés morphologiquement comme *P. septimaniae* des « *P. phoxinus*» rhodaniens. Le critère du plastron écailleux sous la gorge ne serait pas diagnostique. Ainsi, les vairons du bassin du Rhône et des bassins méditerranéens appartiennent à la même espèce *Phoxinus septimaniae* Kottelat (2007). Cette espèce se caractérise par la possibilité d'avoir un plastron écailleux sous la gorge chez certains spécimens, et la présence de 8 à 9 rayons à la nageoire dorsale (rarement 7). Cependant, des analyses plus poussées nécessitent d'être réalisée car Ogérien (1863) a décrit un *Phoxinus montanus*, dont la localité type se situe dans le Jura, avec comme particularité de n'avoir que 10 rayons sur les nageoires pectorales ; ce qui a été confirmé par Blanchard (1896). Or, d'une part, aucun type de cette espèce n'est connu, et d'autre part, nos spécimens ont entre 13 et 16 rayons aux nageoires pectorales. Par conséquent, nous ne pouvons pas considérer *Phoxinus montanus* Ogérien, 1863 comme valide pour l'instant.

Les vairons des bassins de la Loire/Bretagne et de la Charente appartiennent à une même espèce *Phoxinus sp.*1, qui pour le moment n'est pas nommée. De la Pylaie (1835) a fait un inventaire des poissons de la région de Poitiers et nomma « un petit poisson également des eaux douces de la même contrée, connu sous le nom d'Able ou petit verdon sans taches » *Leuciscus obtusus*. Kottelat (1997) n'est pas certain qu'il s'agisse bien d'un vairon, compte tenu du peu d'informations qu'apporte cette description. C'est pourquoi nous décidons de ne pas considérer le taxon de de la Pylaie comme un vairon. Le *Phoxinus sp.*1 reste donc à décrire (travail en cours). Il est caractérisé par un plus faible nombre d'écailles transverses, une longueur post-dorsale plus grande, et par des longueurs prédorsale, prépectorale, prépelvienne et préanale plus faibles.

Enfin, les vairons des bassins de la Dordogne et de la Garonne, ainsi que la population du bassin de la Sègre, appartiennent à une même espèce *Phoxinus sp.*2, qui est nouvelle et dont la description est en cours. Il est caractérisé par la possession de 12 à 15 rayons à la nageoire pectorale, et une longueur prédorsale plus grande.

Un récapitulatif des états de caractères liés au robes nuptiales pour chacune des 6 espèces de vairons en donnée le Tableau 5.3.

Tableau 5.3: Liste des états de caractères liés aux robes nuptiales des 6 espèces de vairons.

		Bande longitudinale médiane	Longueur des bandes verticales	Partie inférieure des flancs	Bande longitudinale noire séparant le flanc du ventre	Couleur du ventre	Tache jaune sur l'opercule	Couleur de la bouche	Couleur de l'insertion des nageoires inférieures	Couleur des nageoires pectorales
Phoxinus marsilii	mâle	noire	ne dépasse pas la ligne latérale	verte	présente	blanc	présente	rouge	rouge	jaune
	femelle	noire et continue	dépasse la ligne latérale	pâle voire blanche	absente	blanc	présente	rosée	rosée ou blanc	jaune
	mâle	verte	dépasse la ligne latérale	jaune verdâtre	absente	blanc	présente	rosée	rosée ou blanc	jaune
Phoxinus phoxinus	femelle	noire	ne dépasse pas la ligne latérale	verte	présente	blanc	présente	rosée	rosée ou blanc	jaune
Phoxinus	mâle	noire	ne dépasse pas la ligne latérale	ocre	présente & absente	blanc	présente	rouge	rouge	jaune
septimaniae	femelle	noire et continue	ne dépasse pas la ligne latérale	blanche	absente	blanc	absente	rosée	rosée ou blanc	jaune
	mâle	verte	dépasse la ligne latérale	jaune	absente	rouge	présente	rouge	rouge	orange
Phoxinus sp. 1	femelle	verte	ne dépasse pas la ligne latérale	pâle voire blanche	absente	rouge	présente	rosée	rouge	jaune
Phoxinus sp. 2	mâle	verte	ne dépasse pas la ligne latérale	verte	présente	blanc	présente	rouge	rouge	jaune
T noxinus sp. 2	femelle	noire et continue	ne dépasse pas la ligne latérale	ocre & verte	présente	blanc	présente	rosée	rosée ou blanc	jaune
Phoxinus bigerri	mâle	noire	ne dépasse pas la ligne latérale	ocre	présente	blanc	présente	rosée	rosée ou blanc	orange
	femelle	noire	dépasse la ligne latérale	ocre	absente	blanc	absente	rosée	rosée ou blanc	jaune

#### **Conclusion**

Cette révision taxonomique des vairons *Phoxinus* spp réalisée principalement en utilisant les données de séquence (COI) et les robes nuptiales ont permis de déceler 6 espèces en France. *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) se trouve dans les bassins de la Meuse et Seine/Normandie, tandis que dans le Rhin, se trouverait une autre espèce qui pourrait être *Phoxinus marsilii* Heckel, 1836. *Phoxinus bigerii* présent dans l'Adour et la Leyre a bien été confirmée, tout comme *Phoxinus septimaniae* qui inclut désormais les populations rhodaniennes (Fig. 5.13). Enfin, deux espèces sont à nommer et décrire, l'une se trouvant dans les bassins de la Loire, Vilaine, Charente, et l'autre dans les bassins Dordogne/Garonne (travail en cours). L'utilisation des parures nuptiales comme critères de détermination supplémentaire sur le terrain semble efficace. Toutefois, en plus des critères morpho-méristiques diagnostiques, ces résultats nécessitent d'être confirmés par l'utilisation de marqueurs nucléaires afin de valider les résultats issus du COI, et de vérifier l'isolement reproductif génétique entre ces espèces (données en cours d'acquisition). Enfin, davantage de données et d'analyses sont nécessaires sur les bassins de la Vilaine et de la Charente qui sont génétiquement bien distincts.

De nouveaux champs d'investigations s'ouvrent. Les variations de robes nuptiales observées nécessiteraient une étude d'histologie comparée entre les différents groupes, de manière à déterminer les différents chromatophores mis en jeux, fournissant ainsi des caractères supplémentaires. De même, une étude en éthologie, étudiant les comportements de mâles et de femelles de bassins différents et aux livrées nuptiales différentes, permettraient de mieux comprendre le phénomène de spéciation mis en oeuvre, et de déterminer la porosité de la barrière pré-zygotique.

Enfin, une fois le travail de taxonomie complété, il sera important d'évaluer le statut de chacune des espèces de vairons de France sur la « Liste rouge des espèces menacées » (Collares-Pereira *et al.*, 2002 ; Keith & Marion, 2002). Le vairon étant produit en pisciculture et manipulé par les sociétés de pêche, il est important de conserver l'intégrité génétique de ces espèces sous peine de les voire disparaitre (Gozlan *et al.*, 2010 ; Cucherousset & Olden, 2011) et d'éviter les mélanges spécifiques comme il a pu se produire en Allemagne (Bernardt *et al.*, 2012 ; Knebelsberger *et al.*, 2015).



Figure 5.13 : Carte de répartition des populations natives des 6 espèces de vairons *Phoxinus* spp en France métropolitaine : *Phoxinus phoxinus* (bleu), *Phoxinus marsilii* (vert), *Phoxinus bigerri* (rouge), *Phoxinus septimaniae* (jaune pâle), *Phoxinus sp.* 1 (orange), *Phoxinus sp.* 2 (violet).

Nous avons vu, à travers ce chapitre, que l'observation de specimens *in vivo* était tout aussi important que le fait d'en conserver en collection. L'observation des robes nuptiales a été d'une grande utilité dans cette étude, et elle ne peut se faire que sur des animaux vivants, la coloration n'étant malheureusement pas conservée après fixation. Une partie importante de l'acquisition des données et des idées s'acquiert donc sur le terrain. Ainsi, le travail d'un taxonomiste est d'abord celui d'un naturaliste, à savoir l'observation sur le terrain des animaux vivants et de leur habitat, ce qui permet de dégager des pistes à explorer dans nos recherches. C'est également le cas pour les goujons dans le chapitre qui suit.

# CHAPITRE 6 DE L'UTILITE DE L'ECOLOGIE : LE CAS DES GOUJONS *GOBIO* SPP

### DE L'UTILITE DE L'ECOLOGIE : LE CAS DES GOUJONS *GOBIO* SPP

#### Préambule

La révision taxonomique des goujons de France par Kottelat et Persat (2005) fut l'une des premières ayant vraiment remis en cause nos connaissances sur l'ichtyofaune dulçaquicole française. Ces auteurs listent quatre espèces de goujons *Gobio* spp. dans nos eaux : le goujon commun *Gobio gobio* (Fig. 6.1a) natif dans les bassins du Rhin, de la Seine, de la Loire et du Rhône ; le goujon d'Auvergne *Gobio alverniae* Kottelat et Persat, 2005 (Fig. 6.1b) présent en tête des bassins de la Dordogne, de la Garonne et de la Loire ; le goujon de l'Adour *Gobio lozanoi* Doadrio & Madeira, 2004 (Fig. 6.1c) restreint au bassin de l'Adour uniquement ; et le goujon occitan *Gobio occitaniae* Kottelat et Persat, 2005 (Fig. 6.1d) présent de la Charente à la Garonne ainsi que dans les bassins du Languedoc-Roussillon. Cette révision taxonomique a été uniquement réalisée à partir de caractères morphologiques.

Depuis, différentes études en taxonomie moléculaire et barcoding ont été publiées et 3 de ces espèces sont également soutenues par des données génétiques : *G. gobio*, *G. lozanoi* et *G. occitaniae* (Geiger *et al.*, 2014), confortant ainsi leur statut. Seul celui de *G. alverniae* n'a pas encore été confirmé par la génétique. Néanmoins, tous les doutes sur la validité de ces taxons ne sont pas levés.

Une révision taxonomique complète des goujons est d'autant plus importante que de nombreux articles en écologie, en écotoxicologie ou en parasitologie sur les goujons ont été publiés depuis la publication de Kottelat et Persat (2005), et que la quasi-totalité de ceux-ci continue à ne considérer qu'une seule espèce, *Gobio gobio*, plus de dis anx après cette publication. Or, des individus mal identifiés par simplification impliquent des inexactitudes et des erreurs sur les travaux réalisés en écologie, et par conséquent sur la gestion ou la conservation qui devraient être mises en place (Bortolus, 2008).

C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, une révision taxonomique des goujons de France a été réalisée en collaboration avec l'Université de Lyon 1 Claude Bernard, et avec l'Office National des Eaux et des Milieux Aquatiques, dans l'objectif, d'une part de

vérifier, le nombre d'espèces présentes en France, et en particulier la validité du *G. alverniae*, et d'autre part de réaliser une étude préliminaire des niches écologiques occupées par chacune de ces espèces. Ce travail fait l'objet d'un article en préparation (voir ci-après).



Figure 6.1: *Gobio gobio* (a), ©E. Vigneux, ONEMA; *Gobio alverniae* (b), ©G. DENYS, MNHN; *Gobio lozanoi* (c), ©F. Melki, Biotope; *Gobio occitaniae* (d), ©F. Melki, Biotope.

## Intégrer les récentes découvertes taxonomiques dans les études en écologie, une évidence ; l'exemple des goujons de France *Gobio* spp. (Actinopterygii, Cyprinidae)

#### Article en préparation

Résumé. - Pendant plus de deux siècles, une seule espèce de goujon, Gobio gobio, était reconnue en France. Or en 2005, une révision taxonomique basée uniquement sur des caractères morphologiques a révélé l'existence de 3 autres espèces de goujons (G. alverniae, G. lozanoi et G. occitaniae). Néanmoins, de nombreuses études en écologie continuent à ne considérer qu'une seule espèce de goujon G. gobio. L'objectif de cette étude a été d'étudier les niches écologiques occupées par ces espèces à partir d'individus identifiés morphologiquement et génétiquement (COI, Rhodopsine, S7) et provenant 152 stations en France. Les analyses génétiques ont distingué, pour chaque marqueur utilisé, 3 espèces : G. gobio, G. lozanoi et G. occitaniae ; le G. alverniae a été généralement inclus parmi les G. occitaniae. L'étude préliminaire des niches écologiques, à partir de stations abritant des goujons dont l'identification est certaine, a démontré que G. gobio, G. lozanoi et G. alverniae occuperaient dans des niches distinguables les unes des autres : G. lozanoi serait un goujon de plaine et thermophile, G. gobio serait euryèce, enfin G. alverniae occuperait les niches situées en altitude. Cependant les niches de chacune de ces espèces ne peuvent pas être différenciées de celles occupées par G. occitaniae qui aurait un éventail d'habitats très large. L'ensemble de ces résultats nous a permis de corroborer 3 des 4 espèces de Kottelat et Persat (2005) : Gobio gobio, Gobio lozanoi et Gobio occitaniae; G. alverniae serait un morphotype montagnard de G. occitaniae. Ainsi, ce travail sur ces 3 espèces ayant des caractéristiques écologiques propres démontre qu'il est important de considérer séparément chacune des espèces pour tous les travaux en écologie.

#### Mots-clés

Taxonomie intégrative, France, Cytochrome oxydase 1, Rhodospine, S7, OMI, Gobio

#### Introduction

Depuis environ deux siècles, l'ichtyofaune dulçaquicole européenne était considérée comme connue, avec globalement une espèce valide pour chaque taxon majeur sur tout le continent (*i.e. Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758), *Gobio gobio* (Linnaeus, 1758), *Salmo trutta* Linnaeus, 1758, *Esox lucius* Linnaeus, 1758; Keith & Allardi, 2001). Mais depuis ces deux dernières décennies, nos connaissances taxonomiques ont évolué. Kottelat (1997) a réalisé une révision taxonomique de l'ensemble des poissons d'eau douce européens, prenant en compte toutes les descriptions d'espèces connues considérées comme valides ou invalides. Il a listé ainsi 358 espèces contre 170 pour Maitland (1977) et 213 pour Blanc *et al.* (1971). Dix ans plus tard, Kottelat et Freyhof (2007) ont mis à jour ce travail en intégrant les travaux les plus récents en taxonomie (dont les espèces nouvellement décrites) ainsi qu'en génétique, et appliquant le concept évolutif de l'espèce selon Wiley et Mayden (2000), cataloguant ainsi plus de 500 espèces dans toute l'Europe.

Les goujons *Gobio* spp. (Actinopterygii, Cyprinidae) font partie des nombreux taxons pour lesquels les connaissances ont évolué. Pendant longtemps, le goujon commun *Gobio gobio* (Linnaeus, 1758) a été considéré comme une espèce présentant un taux important de polymorphisme, avec des formes locales et des sous-espèces (voir Nowak *et al.*, 2008). Ces dix dernières années, plusieurs études taxonomiques ont permis de décrire de nouvelles espèces partout en Europe, ou de mettre en évidence des taxons cryptiques (Doadrio & Madeira, 2004; Vasil'eva *et al.*, 2004; Freyhof & Naseka, 2005; Kottelat & Persat, 2005; Naseka *et al.*, 2006; Mendel *et al.*, 2008; Turan *et al.*, 2012; Takács *et al.*, 2014). En appliquant en effet le concept évolutif de l'espèce, la plupart des sous-espèces de *G. gobio* ont été élevées au rang spécifique. Au final, en 40 ans, le nombre d'espèces appartenant au genre *Gobio* est passé de 14 (Bănărescu & Nalbant, 1973) à 38 (Froese & Pauly, 2015).

Quatre espèces de goujon présentes en France ont été décrites ou redécrites par Kottelat et Persat (2005): (i) le goujon commun *Gobio gobio* natif dans les bassins du Rhin, la Seine, la Loire et le Rhône ; (ii) le goujon d'Auvergne *Gobio alverniae* Kottelat et Persat, 2005 présent en tête de bassins de la Dordogne, Garonne et Loire ; (iii) le goujon de l'Adour *Gobio lozanoi* Doadrio & Madeira, 2004 restreint au bassin de l'Adour uniquement ; et (iv) le goujon occitan *Gobio occitaniae* Kottelat et Persat, 2005 présent de la Charente à la Garonne ainsi que dans les bassins du Languedoc-Roussillon.

Trois de ces taxons ont été décrits uniquement sur la base de caractères morphologiques, en suivant la taxonomie "classique" (Kottelat, 1997, 1998) ou "traditionnelle" (e.g. Winston, 1999). La validité de *G. lozanoi* a été soutenue par des analyses moléculaires et des données écologiques lors de la description de cette espèce (Doadrio & Madeira, 2004; Madeira *et al.*, 2005). Mendel *et al.* (2008) ont défini la lignée génétique de *G. gobio sensu stricto* en incluant des populations du Rhône, du Rhin, de l'Elbe et du Danube, et elle diffère des autres taxons provenant du bassin du Danube et de l'Europe orientale (voir aussi Šlechtovă *et al.*, 2005; Mendel *et al.*, 2005, 2008, 2012; Geiger *et al.*, 2014; Takács *et al.*, 2014; Knebelsberger *et al.*, 2015). Geiger *et al.* (2014) ont démontré que *G. gobio*, *G. lozanoi* et *G. occitaniae* étaient distingables sur le marqueur de la sous-unité 1 du cytochrome oxidase (COI). Ainsi, selon une approche de taxonmie integrative (e.g. Padial *et al.*, 2010) stipulant qu'une espèce n'est valide que si au moins deux sources des données indépendantes (*i.e.* morphologiques, génétiques, écologiques, biogéographiques, etc...) sont concordantes, ces trois taxons sont valides. Seule la validité de *G. alverniae* n'a pas encore été démontrée.

Cependant, ces nouvelles découvertes ne sont que très peu prises en compte par la communauté scientifique. De 2006 à janvier 2015, 72 publications en écologie, en écotoxicologie ou en parasitologie intégrant des goujons français dans leurs jeux de données ont été publiées. Seulement 8% d'entre elles (soit 6 publications) utilisent des données sur des spécimens correctement identifiés et 4% reconnaissent l'existence de plusieurs espèces de goujons mais sans les déterminer (*Gobio* spp). 87% des publications ont été réalisées à partir de spécimens identifiés *Gobio gobio* mais sans aucune expertise taxonomique (soit au-delà des 62,5% rencontrées par Bortolus (2008) dans son étude sur le nombre d'articles en écologie utilisant des spécimens correctement identifiés) dont 59% pour lesquelles les spécimens ont très probablement été identifiés à tort comme *Gobio gobio* car ils proviennent des aires de répartition des autres espèces (Fig. 6.2, Annexe 10). La non prise en compte de ces travaux taxonomiques implique donc des inexactitudes et des erreurs quant aux « espèces » étudiées, et malheureusement ceci dessert tant l'écologie que la gestion ou la conservation. Ces travaux pourtant ont été publiés dans des revues prestigieuses avec des facteurs d'impact allant de 0,622 à 42,351 (IF moyen : 4,072).

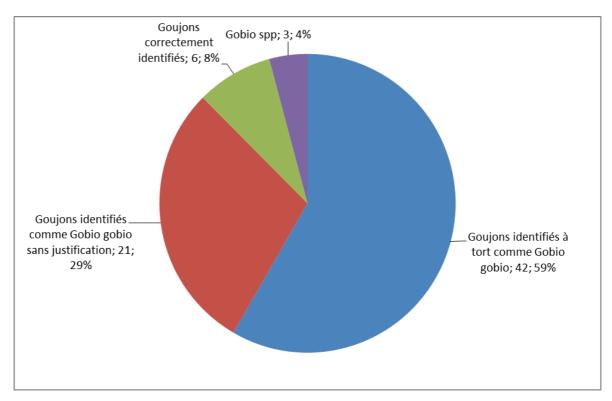


Figure 6.2: Diagramme illustrant la proportion de publications traitant d'écologie, d'écotoxicologie ou de parasitologie de goujons français et la prise en compte ou non les travaux de taxonomie de Kottelat et Persat (2005).

L'objectif de cet étude, est principalement d'explorer la validité du *G. alverniae* à partir de spécimens identifiés morphologiquement et génétiquement à partir de trois marqueurs, un mitochondrial (COI) et deux nucléaires (rétrogène de la rhodospine et S7), puis de réaliser une étude préliminaire comparant les niches écologiques occupées par chaque taxon valide dans le but de détecter d'éventuelles différences qui pourraient être utiles dans le cadre d'une approche de taxonomie intégrative (Raxworthy *et al.* 2007; Bond & Stockman 2008).

#### Matériel et méthodes

#### **Echantillonnage**

Afin de réaliser l'étude, 493 spécimens ont été collectés dans 94 localités différentes (Fig. 6.3; Annexe 11). Les échantillonnages effectués pour la plupart en pêche électrique, ont été réalisés en collaboration avec les agents de terrain de l'Onema, des fédérations de pêche, ainsi que Henri Persat (Université Lyon 1, Claude Bernard).

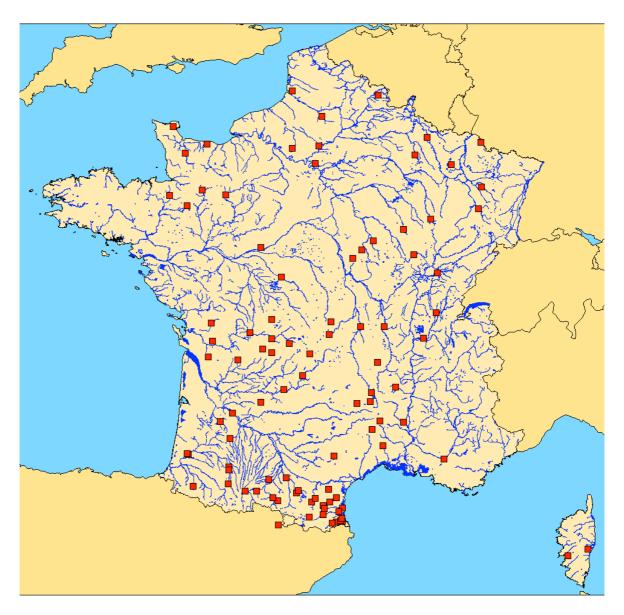


Figure 6.3 : Stations d'échantillonnage de goujons.

5 à 10 spécimens en moyenne ont été fixés et conservés dans de l'alcool 95°. Les types des taxons *G. alverniae* (MNHN 2004-2079 à 2081) et *G. occitaniae* (MNHN 2004-2084 et 2086) ont également été consultés.

Afin de compléter l'échantillonnage des goujons, 69 lots provenant des collections historiques du MNHN, ainsi que ceux cités et identifiés par Kottelat et Persat (2005) ont été intégrés dans notre jeu de données (Annexe 12).

Tous les individus ont été identifiés morphologiquement selon les critères donnés par Kottelat et Persat (2005) :

- Gobio gobio (Fig. 6.1a) : corps longiligne, pas d'écailles entre les pectorales, 6 à 7 écailles entre la ligne latérale et l'insertion de la dorsale, 3 à 4 écailles entre la ligne latérale et l'insertion des pelviennes ;
- Gobio alverniae (Fig. 6.1b) : corps trapu, présence d'écailles entre les pectorales, 3 écailles de part et d'autre de la ligne latérale au niveau du pédoncule caudal, nageoire caudale peu échancrée ;
- Gobio lozanoi (Fig. 6.1c) : corps trapu avec un dos généralement convexe, pas d'écailles entre les pectorales, 5 écailles entre la ligne latérale et l'insertion de la dorsale, 3 écailles entre la ligne latérale et l'insertion des pelviennes ;
- Gobio occitaniae (Fig. 6.1d) : corps trapu et pigmenté, présence d'écailles entre les pectorales, 2 à 3 écailles de part et d'autre de la ligne latérale au niveau du pédoncule caudal, nageoire caudale bien échancrée.

#### Analyses génétiques

Des analyses génétiques ont été réalisées dans le cadre d'une analyse de taxonomie moléculaire *sensu* Tautz *et al.* (2003) en utilisant un marqueur mitochondrial (la sous-unité 1 du cytochrome oxydase COI; 591 pb) et deux marqueurs nucléaires pour détecter d'éventuels cas d'hybridation ou d'introgression : le rétrogène de la rhodopsine (Rh; 769 pb) et le premier intron de la protétine ribosomale S7 (S7; 328 pb). L'utilisation de plusieurs marqueurs nucléaires permet aussi de valider les résultats du COI et fournit une source de données indépendante supplémentaire pour la taxonomie (Vogler & Monaghan, 2007).

Ainsi, un sous-échantillonnage de 135 spécimens a été séquencé pour les différents marqueurs utilisés et enregistrés dans la base de données *Barcode of Life Data systems* (BOLD) (Ratnasingham & Hebert, 2007). Pour élargir l'échantillonnage à l'échelle européenne, 97 séquences provenant de GenBank ont été intégrées (Annexe 13).

Les séquences ont été extraites, à partir de fragments de nageoires prélevés et conservés dans de l'alcool à 95%, à l'aide d'un robot d'extraction epMotion 5075 (Eppendorf) dont le principe de fonctionnement est détaillé par Wehrhahn (2010) en utilisant les amorces COI : TelF1 5'-TCG ACT AAT CAY AAA GAY ATY GGC AC-3', TelR1 5'-ACT TCT GGG TGN CCA AAR AAT CAR AA-3' (Dettai *et al.*, 2011), FishR1 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3' (Ward *et al.*, 2005), Rh : Rh193 5'-

CNT ATG AAT AYC CTC AGT ACT ACC-3', Rh1039r 5'-TGC TTG TTC ATG CAG ATG TAG A-3' (Chen *et al.*, 2003), S7: S7univL 5'-ACA ATT GTA AGT CGG AGA TG-3', S7univP 5'-CCC ACA AAA TAA GAT ATT AGG-3' (Mendel *et al.*, 2008). Le nettoyage des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel CodonCode Aligner version 2.0.6 (http://www.codoncode.com/aligner/). Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel MUSCLE (Edgar, 2004), hormis pour le S7 pour lequel nous avons utilisé ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) à cause des indels. Les séquences hétérozygotes de rhodopsine ont été séparées en deux allèles en utilisant des séquences homozygeotes comme guides (e.g. Sousa-Santos *et al.*, 2005; Denys *et al.*, 2013) provenant du même bassin avec les logiciels SEQPHASE (Flot, 2010) et PHASE (Stephens *et al.*, 2001). Seuls les allèles distingués selon une probabilité de plus de 90% ont été conservés pour l'analyse.

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées sur les sequences de COI et de S7 par inférence bayésienne (MrBayes 3.2, Ronquist *et al.*, 2012). Un model partitionné par position de codon a été calculé avec JModelTest 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012) et 4 analyses avec 10 millions de générations et échantillonnage toutes les 200 générations ont été réalisées. 10% des arbres obtenus ont été éliminés après avoir vérifié la convergence. Les distances intra- and inter-specifiques (p-distances), ainsi que l'analyse en maximum de vraisemblance (ML) sur les séquences de Rhodopsine ont été calculées avec le logiciel MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

#### Etude préliminaire des niches écologiques

La grande majorité de nos échantillonnages ont été réalisés sur des stations de l'ONEMA qui sont associées à des données environnementales (Banque Hydrobiologique et Piscicole) telles que l'altitude (ELE), la distance par rapport à la source (DIS), la largeur (WID), la profondeur (DEP), la pente (GRA), la surface du bassin versant (SAD), et les températures de l'air de janvier et de juillet (respectivement T<sub>january</sub> et T<sub>july</sub>). Ces données environnementales permettent notamment de calculer l'indice poisson rivière (IPR ; Oberdorff *et al.* 2002) ; elles seront utilisées dans notre étude.

Pour étudier les niches des goujons, nous utiliserons comme méthode d'analyse l'*Outlying Mean Index* (OMI) qui analyse les niches destinées aux études de gradient dans lesquelles la variance des présences des espèces est maximisée le long d'axes de coordination provenant de l'entrée de données environnementales (Dolédec *et al.*, 2000).

La marginalité ou le critère de spécialisation est la distance entre les conditions moyennes d'habitat utilisées par une espèce et les conditions moyennes d'habitat de l'aire d'échantillonnage (Dolédec *et al.*, 2000). Pour la calculer, nous utilisons le test de permutation de Monte Carlo avec 1000 itérations.

Ainsi, 152 stations de l'Onema ont été sélectionnées, pour lesquelles toutes les variables environnementales sont renseignées de 1978 à 2011, et correspondant aux localités (ou les plus proches (30 km max.)) où les goujons collectés ont été clairement identifiés morphologiquement et génétiquement. La moyenne de chacune des variables a été calculée pour chaque station afin d'intégrer les variabilités de conditions climatiques et environnementales.

Les variables environnementales ont été normalisées selon la méthode d'Oberdorff *et al.* (2001) afin de calculer l'élévation (E), le gradient longitudinal (G), la vélocité (V) et les deux variables indépendantes liées aux besoins des espèces de poissons (T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>; voir Sokal & Rohlf, 1995):

$$\begin{split} E &= log~(ELE) \\ G &= 3,015-0,347~x~log~(SAD_{Km})-0,543~x~log~(DIS_{Km}) \\ V &= log~(WID_m) + log~(DEP_m) + log~(GRA_{\%}) - log~(WID_m + 2~x~DEP_m) \\ T_1 &= T_{july} + T_{january} \\ T_2 &= T_{july} - T_{january} \end{split}$$

Une matrice de variables a été générée avec, pour chaque station, les données environnementales calculées (Annexe 14), ainsi que la présence ou absence (0 ou 1) de chaque espèce de goujon. Nous avons considéré chaque espèce identifiée morphologiquement ou génétiquement, même sous forme d'allèles, comme présente dans le milieu.

Les analyses statistiques ont été réalisées sous R (R Core Team, 2014) à l'aide du module ade4 (Chessel *et al.*, 2004 ; Dray & Dufour, 2007 ; Dray *et al.*, 2007).

#### Résultats

#### Identification morphologique

Sur les 110 lots d'individus en collection identifiés morphologiquement, 4 ont été déterminés comme G. alverniae, sur les versants Nord et Ouest du Massif Central : bassin de la Loire (3 stations), et Dordogne (1). Cinquante deux lots ont été déterminés comme étant G. gobio ; il est présent dans la plupart des bassins : Adour (1 station), Charente (1), Dordogne (4), Garonne (2), Loire (13), Meuse (1), bassins corses (2), Rhin (5), Rhône (6), et Seine-Picardie-Normandie (17). Huit lots ont été déterminés comme étant G. lozanoi : Adour (5 stations), bassins méditerranéens (Agly + Berre ; 2), et Garonne (1). Enfin, trente huit lots ont été déterminés comme étant G. occitaniae, essentiellement dans le Sud-Ouest de la France : bassins méditerranéens (Agly + Aude + Tech + Têt + Massane ; 13 stations), Charente (2), Dordogne (4), Garonne (12), Loire (1), bassins corses (1), et Rhône (5) (Annexe 10). Notons toutefois qu'un lot provenant de l'Arac (bassin de la Garonne) possède les critères morphologiques de G. alverniae, ces spécimens ont été capturés sur le versant pyrénéen et non dans le Massif Central d'où cette espèce serait endémique (Kottelat et Persat 2005) ; il a donc été identifié comme Gobio cf. alverniae. De même que les individus collectés sur le Chapeauroux (localité type du G. alverniae) possédaient davantage les caractères du G. occitaniae et ont été identifiés morphologiquement comme tel.

Enfin, des lots d'hybrides ont été suspectés. Notamment sur le Rimbez (bassin de la Garonne) où les spécimens collectés avaient les caractères propres aux espèces *G. lozanoi* et *G. occitaniae* (*i.e.* nombre d'écailles transverses du *G. lozanoi* et présence d'écailles sous la gorge du *G. occitaniae*). De même que dans l'Aude et la Charente, nous avons des goujons ne possédant pas d'écailles sous la gorge comme *G. gobio* mais présentant une forte pigmentation comme *G. occitaniae*.

#### Identification moléculaire

Des analyses génétiques ont été réalisées sur 135 individus (voir Annexe 15) pour le marqueur mitochondrial du COI et les deux marqueurs nucléaires de la rhodospine et du S7.

L'arbre bayésien issu de l'analyse du COI (144 individus ; 579 pb ; Fig. 6.4) selon le modèle de substitution GTR+I+G sépare distinctement *Gobio cynocephalus* des goujons européens. Au sein de ces derniers, nous observons une polytomie avec trois clades. Dans le premier clade A, nous distinguons une dichotomie entre des taxons d'Europe centrale (*G. obtusirostris* + *G. bulgaricus*) et un clade correspondant au *Gobio gobio*. Ce clade a une variabilité interne moyenne de 0,03%, et comprend les *G. alverniae* du bassin de la Loire, 2 *G. occitaniae* (Dronne et Ardèche), 2 *G. lozanoi* (Luy et Ruisseau de Cabanes), et un hybride supposé *G. lozanoi* X *occitaniae* du Rimbez.

Le clade B est composé essentiellement de spécimens appartenant à l'espèce G. occitaniae, mais également 6 G. alverniae (Luzège, de l'Arac et un de l'Allier), 5 G. gobio, les 4 hybrides supposés G. occitaniae X gobio (Avance, Charente, Lizonne, affluents de l'Aude), 2 G. lozanoi ainsi qu'un hybride supposé G. lozanoi X occitaniae du Rimbez. Ce clade a une variabilité intrinsèque moyenne de 0,12%, et une divergence moyenne de 3,21% par rapport au clade Gobio gobio.

Le clade C est composé essentiellement de spécimens appartenant à l'espèce G. *lozanoi*, mais également 2 hybrides supposés G. *lozanoi* X occitaniae du Rimbez. Ce clade a une variabilité interne moyenne de 0,16%, et une divergence moyenne de 3,92% par rapport au clade Gobio gobio, et de 3,75% par rapport au clade Gobio occitaniae.

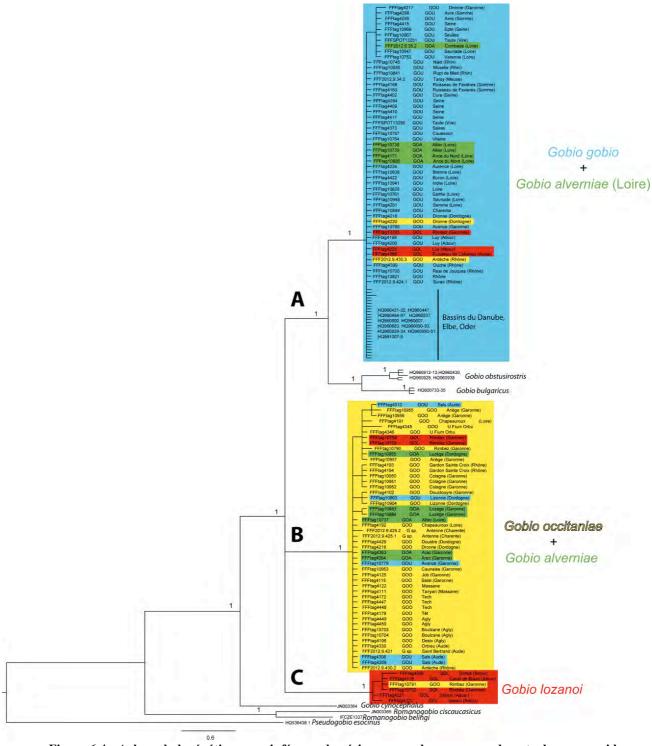


Figure 6.4: Arbre phylogénétique par inférence bayésienne avec le marqueur du cytochrome c oxidase sous-unité I (COI) pour 144 individus de goujons *Gobio spp* selon un modèle de substitution GTR+I+G. Les nombres aux nœuds représentent les valeurs de probabilités postérieures. Les valeurs moyennes a posteriori des paramètres sont (respectivement pour la première, deuxième et troisième position de codon): TL = 28,279151; alpha = 95,480980, 2,037633, 99,748777; pinvar = 0,840303, 0,940424, 0,045464. Les identifications morphologiques sont associées: bleu pour *Gobio gobio* (GOU), jaune pour *Gobio occitaniae* (GOO), vert pour *Gobio alverniae* (GOA), et rouge pour *Gobio lozanoi* (GOL). Les localités sont dans les noms de taxons.

L'arbre issu de l'analyse en maximum de vraisemblance (ML) de la rhodopsine (116 allèles pour 78 individus ; 769 pb ; Fig. 6.5) selon le modèle de substitution GTR+I+G sépare distinctement les goujons français des Gobio cynocephalus et G. coriparoides. En revanche, au sein du clade des goujons français, nous observons une polytomie composée de 9 haplotypes. Les haplotypes 1 à 3 forment un même clade soutenu par une synapomorphie moléculaire T en position 675 (Tabl. 6.1), et n'est composé que d'allèles d'individus identifiés morphologiquement comme G. gobio. Ce clade a une variabilité intrinsèque moyenne de 0,13%. Les haplotypes 4 à 8, à l'inverse, ne forment pas un clade unique mais sont constitués principalement d'allèles appartenant à des individus identifiés morphologiquement comme étant G. occitaniae et G. alverniae. Il comporte également des allèles d'individus identifiés comme G. gobio provenant des bassins de la Loire aval, de la Seine, du Rhône et aussi se trouvant dans les aires de répartitions de ces deux espèces, mais également de spécimens de G. lozanoi du Rimbez et du Luy. La variabilité interne est de 0,07%, et de 0,33% par rapport au G. gobio, n'est caractérisée par l'association des deux synapomorphies moléculaires : A en position 169 et C en position 675. Enfin l'haplotype 9 forme un clade soutenu par une synapomorphie C au lieu de A en position 169, et n'est consitué que d'individus identifiés morphologiquement comme G. lozanoi ou d'hybrides G. lozanoi X occitaniae du Rimbez.

Ainsi, le marqueur de la rhodopsine permet de différencier 3 des quatres espèces de goujons de Kottelat et Freyhof (2005). Seuls *G. occitaniae* et *G. alverniae* ne sont pas distinguables.

Tableau 6.1 : Alignement des haplotypes et les bases diagnostiques de séquences de rhodopsine représentatifs des différents taxons appartenant au genre *Gobio*.

TAYON	LIADI OTVOE									POSI	TIONS								
TAXON	HAPLOTYPE	16	169	195	231	327	351	399	411	471	520	521	549	564	576	660	675	687	732
	H1	С	Α	С	Т	С	G	С	С	Т	G	Т	G	Α	С	С	Т	Т	Т
Gobio gobio	H2	С	Α	Т	Т	С	G	С	С	С	G	Т	G	Α	С	С	Т	Т	Т
	Н3	С	Α	С	Т	С	G	С	С	С	G	Т	G	Α	С	С	Т	Т	Т
	H4	С	Α	С	Т	С	G	С	С	С	G	Т	G	Α	Т	С	С	Т	Т
Gobio	H5	С	Α	С	Т	С	G	С	С	С	G	Т	G	Α	С	С	С	Т	Т
occitaniae + Gobio	Н6	С	Α	С	Т	С	G	С	С	С	G	Т	Α	Α	С	С	С	Т	Т
alverniae	H7	С	Α	С	Т	С	G	С	Α	С	G	Т	G	Α	С	С	С	Т	Т
	Н8	С	Α	C	Т	С	G	С	Т	C	G	Т	G	Α	С	С	С	Т	Т
Gobio Iozanoi	Н9	С	С	С	Т	С	G	С	С	С	G	Т	G	А	С	С	С	Т	Т
Gobio cynoce	phalus	С	Α	С	Α	С	Α	С	С	С	G	Т	G	А	С	Т	С	С	Т
Gobio coripar	oides	Α	С	С	Т	Т	Т	Т	Α	С	Т	G	G	G	С	Т	С	С	С

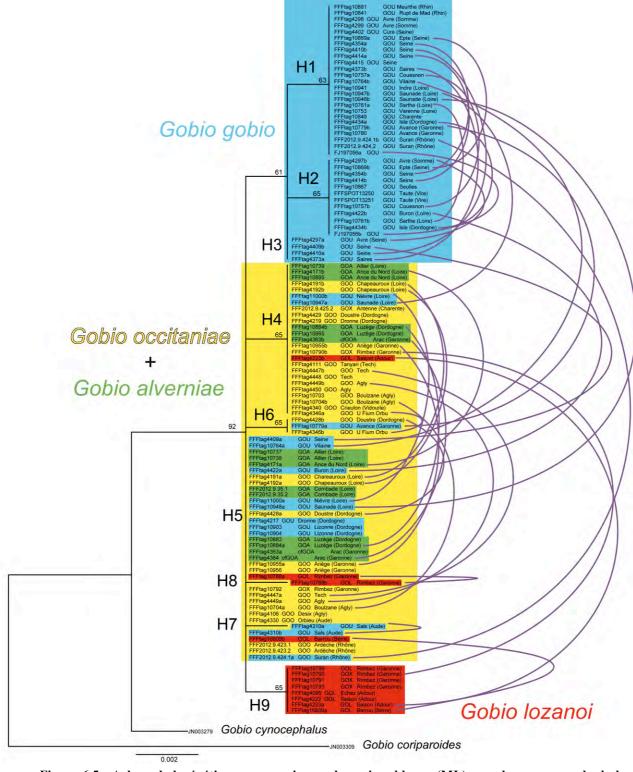


Figure 6.5: Arbre phylogénétique par maximum de vraisemblance (ML) avec le marqueur de de la Rhodopsine pour 116 allèles représentant 165 individus de goujons *Gobio spp* selon un modèle de substitution GTR+I+G. Les nombres aux nœuds représentent les bootstrap. Les identifications morphologiques sont associées: bleu pour *Gobio gobio* (GOU), jaune pour *Gobio occitaniae* (GOO), vert pour *Gobio alverniae* (GOA), et rouge pour *Gobio lozanoi* (GOL). Les individus hétérozygotes sont représentés par les arcs violets regroupant les deux allèles qu'ils portent. Les localités sont dans les noms de taxons.

L'arbre bayésien issu de l'analyse de la protéine ribosomale S7 (165 individus ; 328 pb ; Fig. 6.6) selon le modèle de substitution HKY sépare distinctement deux clades A et B. Dans le premier clade A, nous distinguons une dichotomie entre *G. cynocephalus* et une polytomie composée de plusieurs groupes distinguant chacun distinctement *G. occitaniae*, *G. lozanoi*, *G. insuyanus*, *G. skadarensis* + *G. ohridanus*, *G. carpathicus* et *G. obtusirostris*. Le clade correspondant au *G. occitaniae* a une variabilité interne moyenne de 0,01%, et comprend tous les individus identifiés comme *G. alverniae*, mais également un *G. lozanoi* de l'Agly, 8 *G. gobio* (Borrèze, Lizonne, Aude, Louge mais également de la Varenne et la Vilaine), ainsi qu'un hybride supposé *G. lozanoi* X *occitaniae* du Rimbez et *G. occitaniae* X *gobio* de la Charente et de l'Aude.

Le clade correspondant au *G. lozanoi* a une variabilité interne moyenne de 0,34%, et une divergence moyenne de 0,65% par rapport au clade des *G. occitaniae*. Il comprend tous les individus provenant du Rimbez, de l'Echez, du Saison et du Barrou.

Le clade B est composé d'une dichotomie séparant *G. volgensis* d'un clade irrésolu comprenant *G. gobio*, *G. caucasicus*, *G. brevicirris*, *G. delyamurei* et *G. krymensis*. Au sein des *G. gobio*, comprenant également un *G. lozanoi* du Ruisseau de Cabanes (bassin de l'Adour), la variabilité intrinsèque moyenne de 0,18%, et une divergence moyenne de 4,41% par rapport au clade *Gobio occitaniae*, et de 5,06% par rapport au clade *Gobio lozanoi*.

Le S7 ne permet pas de distinguer toutes les espèces de *Gobio* mais néanmoins, ce marqueur est aussi utile pour diagnostiquer les taxons grâce aux indels (Mendel *et al.*, 2008). En réalisant un alignement des séquences par haplotype (Tabl. 6.2), nous pouvons voir que les 3 espèces *G. occitaniae*, *G. lozanoi* et *G. gobio* ont des indels qui leurs sont propres.

Ainsi 6 haplotypes différents caractérisent *G. occitaniae* par des indels en position 43, 114, 201 à 207, 236 à 240, 278 à 279. Tous les *G. alverniae* partagent ces indels.

Trois haplotypes différents caractérisent *G. lozanoi* par des indels en position 73 à 78, 114, 201 à 207, 236 à 240, 278 à 279.

Enfin 4 haplotypes caractérisent *G. gobio*, mais en deux ensembles. Le premier (Haplotype 1) a des indels en position 43, 68 à 79, 114, et 201 à 207. Le second (Haplotypes 3 à 4) a des indels en position 33 à 51, 68 à 79, 114, 164 à 166, 201 à 207 et 236 à 240. Il n'y a pas de relation entre les différents haplotypes et la localisation de leur échantillonnage.

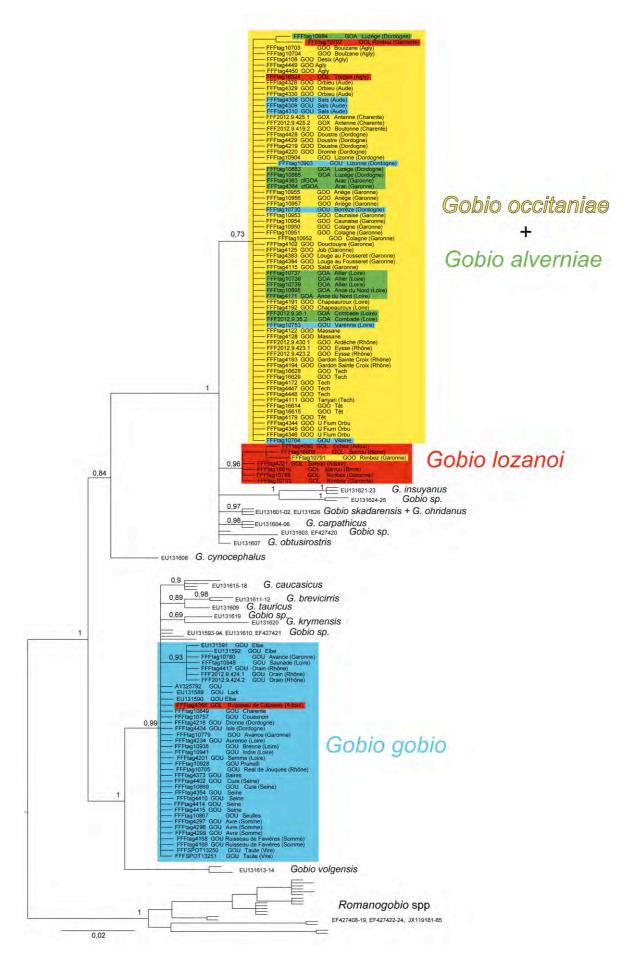


Tableau 6.2: Alignement des haplotypes de séquences de S7 représentatifs des différents taxons appartenant au genre Gobio. Les numéros indiquent la position des bases dans la séquence.

appartenant au genre	Got	10.	Les	nui	mer	0S 1	ndig		t la				es t	pases		1			ence.
	1	6	21	22	23	26	28	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
Gobio brevicirris	Α	С	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio carpathicus	G	С	A	T	T	С	С	A	A	С	С	A	A	T	T	A	A	A	-
Gobio caucasicus Haplotype 1	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio caucasicus Haplotype 2	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	С	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio caucasicus Haplotype 3	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio cynocephalus	G	Т	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio gobio Haplotype 1	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio gobio Haplotype 2	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gobio gobio Haplotype 3	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gobio gobio Haplotype 4	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gobio insuyanus	G	С	Α	Т	T	G	С	Т	Α	С	С	Α	Α	Т	T	Α	Α	Α	-
Gobio krymensis	G	С	Α	Т	Т	С	T	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	T	Α	Α	Α	
Gobio lozanoi Haplotype 1	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	Α
Gobio lozanoi Haplotype 2	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	Α
Gobio lozanoi Haplotype 3	G	С	Α	т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	т	т	Α	Α	Α	Α
Gobio obtusirostris	G	С	Α	Т	т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	т	т	Α	Α	Α	-
Gobio occitaniae Haplotype 1	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio occitaniae Haplotype 2	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio occitaniae Haplotype 3	G	С	Α	т	т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio occitaniae Haplotype 4	G	С	Α	Т	т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio occitaniae Haplotype 5	G	С	Α	Т	Т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Т	Т	Α	Α	Α	-
Gobio occitaniae Haplotype 6	G	С	Α	Т	т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	т	т	Α	Α	Α	-
Gobio ohridanus	G	С	Α	т	т	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	т	т	Α	Α	Α	-
Gobio skadarensis	G	С	-	- 1	-	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Ť	Ť	Α	Α	Α	-
Gobio tauricus	G	С	Α	Т	Т	С	C	Α	Α	С	C	Α	Α	Ť	Ť	Α	Α	Α	-
Gobio volgensis	G	С	Α	Ť	T	С	С	Α	Α	С	С	Α	Α	Ť	Ť	Α	Α	Α	-
		_	_				1		_		_		_				_		$\overline{}$
	44	45	46	47	48	49	50	51	58	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
Gobio brevicirris	44 G	45 G	46 G	47 A	48 A	49 C	50 A	51 G	58 G	68 -	69 -	70 -	71 -	72 -	73 -	74 -	75 -	76 -	77 -
Gobio brevicirris Gobio carpathicus			_																
	G	G	G	Α	Α	С	Α	G	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gobio carpathicus	G G	G T	G T	A A	A A	C C	A A	G G	G G	- C	- A	Т	- А	- A	T	- A	Т	- T	-
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1	G G G	G T G	G T G	A A A	A A A	C C	A A A	G G G	G G G	- C	- A	Т	- А	- A	T	- A	Т	- T	-
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2	G G G	G T G G	G T G G	A A A	A A A	C C C	A A A	G G G	G G G	- C -	- A	Т	- А	- A	T	- A	Т	- T	-
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3	G G G	G T G G	G T G G	A A A A	A A A A	C C C	A A A A	G G G G	G G G G	- C - -	- A - -	- T - -	- A - -	- A - -	- T - -	- A - -	Т	- T	- A - -
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus	G G G G	G T G G	G G G	A A A A A	A A A A A	C C C C	A A A A	G G G G	G G G G	- C - - -	- A A	- T - - -	- A A	- A - - - A	- T - -	- A A	Т	- T	- A - -
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1	G G G G	G T G G	G G G	A A A A A	A A A A A	C C C C	A A A A	G G G G	G G G G G	- C - - -	- A A	- T - - -	- A A	- A - - - A	- T - -	- A A	Т	- T	- A - -
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2	G G G G	G T G G	G G G	A A A A A	A A A A A	C C C C	A A A A	G G G G	G G G G G	- C - - -	- A A	- T - - -	- A A	- A - - - A	- T - -	- A A	Т	- T	- A - -
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2	G G G G	G T G G	G G G G	A A A A A	A A A A A	C C C C C	A A A A A	G G G G G	G G G G G	- C - - C - -	- A A	- T - - -	- A A	- A - - - A	- - - - C	- A A	Т	- T	- A - -
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3	G G G G G	G G G T G	G G G G	A A A A A -	A A A A A	C C C C -	A A A A A	G G G G G	G G G G G	- C - - - C - -	- A	- T - - T -	- A	- A	- T - - C - -	- A	- T - - T - -	- T - - T - -	- A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4	G G G G G	G G G T G	G G G G T	A A A A A -	A A A A A -	C C C C C C	A A A A A A	G G G G G	G G G G G G	- C - - C - - -	- A A A	- T - - T - -	- A A A	- A A	- T	- A A A	- T - - T - - -	- T - - T - -	- A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis	G G G G G G	G G G T G	G G G G G	A A A A A - - A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	A A A A A -	G G G G G	G G G G G C	- - - - - - - - -	- A A A A	- T - - T - -	- A A A A	- A A A A A A	- T T -	- A A A A	- T - - T - - - -	- T - - T - - - -	- A A A A A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1	G G G G G G G	G T G G T G T G T	G G G G T T G T	A A A A A A A A	A A A A A A A A	C C C C C C C	A A A A A A A A A	G G G G G G G	G G G G G G G G	- C C - C - C	- A A - A	- T T - T	A A A A - A	A - A A	- T	- A A A A	- T T	- - - - - - - - - - -	- A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1	G G G G G G G	G T G T G T T	G G G G T T T T	A A A A A A A	A A A A A A A A	C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G	G G G G G G G G G G	- C C C C C	- A A A A A	- T T T T	A A A - A A	A A - A A	- T T	- A A	- - - - - - - - - - - - - - - - - - -	T	- A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2	G G G G G G G	G T G T G T T T T	G T G G G T T T T	A A A A A A A	A A A A A A A A A	C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A	G G G G G G G	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	- C C - C C C C C	- A A A A A A	- T T T T T T	A A A A A A	A A A A A	- T T	- A	- T	- T - - - - - - - - - - - - - - - - -	- A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio lozanoi Haplotype 3	G G G G G G G	G T G G T T T T T T	G T G G G T T T T T	A A A A A A A A A	A A A A A A A A A	C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G	G G G G G G G G G G	- C C C C C C C	- A A A A A A A	- T T T T T T	A A A A A A A	A A A A A A A	- T T T	- A A A A A A A	- T	- T T T	- A A A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 1	G G G G G G G T	G T G G T T T T T T T T	G T G G G T T T T T	A A A A A A A A	A A A A A A A A A	C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A	G G G G G G G G G		- C C C C C C C C	- A A A A A A A A	- T T T T T T T	- A A A A A A A A	- A A - A A A A A	- T T T T	- A A A A A A	- T	- T T T T	- A A A A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 2	G G G G G G T G	G T G T T T T T T T	G T G G G T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A		G G G G G G G G G	- C C C C C C C C C	- A A A A A A A A	- T T T T T T T T T	- A A A A A A A A	A A A A A A A A	- T T T T T	- A A A A A A	- T T T T T	- T T T T T	- A A A A A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 2 Gobio occitaniae Haplotype 2	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	G T G T T T T T T T	G T G G G T T T T T T	A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A	C C C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G		- C C C C C C C C C C	- A A A A A A A A A A	- T - - T - - T T T T T	A A A A A A A	A A A A A A A	- T T T T T T	A A A A A A A	- T T T T T T	- T T T T T T	- A A A A A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio occitaniae Haplotype 3	G G G G G T G G G G	G T G T T T T T T T T T T T T T T T	G T G G G T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A			- C - C C C C C C C C C C C	- A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A	A A A A A A A A	- T T T T T T T T	- A A A A A A A A	- T T T T T T T	- T T T T T T T T T	- A A A A A A A A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 4	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	G T G T T T T T T T T T T T T T T T	G T G G G T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A			- C - C C C C C C C C C C C C C C C C C	- A A A A A A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	- A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A	- T T T T T T T T T	- T T T T T T C C	- A A A A A A A A A A A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 5	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	G T G T T T T T T T T T T T T T T T	G T G G G T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A			- C - C C C C C C C C C C C C C C C C C	- A A A A A A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	- T T T T T T T T T T T T T T T	- A A A A A A A A A A A A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 6 Gobio occitaniae Haplotype 6	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	G T G T T T T T T T T T T T T T T T	G T G G T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A			- C - C C C C C C C C C C C C C C C C C	- A A A A A A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	- A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A	- T T T T T T T T T	- T T T T T T C C	- A A A A A A A A A A A A
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 5	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	G T G T T T T T T T T T T T T T T T	G T G G G T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A			- C - C C C C C C C C C C C C C C C C C	- A A A A A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	- T T T T T T T T T T T T T T T T	- T T T T T T T T T T T T T T T	- A A A A A A A A A A A A A A

	78	79	84	85	88	90	91	101	106	107	108	114	123	128	147	152	157	162	164
Gobio brevicirris	-	-	Α	С	Т	Т	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Т	G	Α	Т	Т
Gobio carpathicus	Т	G	Α	Т	Т	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Α	G	С	Т	Т
Gobio caucasicus Haplotype 1	-	-	Α	С	Т	Т	С	С	G	Α	Α	-	Α	G	Т	G	Α	Т	Т
Gobio caucasicus Haplotype 2	-	-	Α	С	Т	т	С	С	G	Α	Α	-	С	G	т	G	Α	Т	Т
Gobio caucasicus Haplotype 3	-	-	Α	С	Т	т	С	С	G	Α	Α	-	С	G	т	G	Α	Т	Т
Gobio cynocephalus	Т	G	G	С	Т	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	т	G	С	Т	Т
Gobio gobio Haplotype 1	-	-	Α	С	Т	Т	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Т	G	Α	Т	Т
Gobio gobio Haplotype 2	-	-	Α	С	Т	т	С	С	G	Α	Т	-	С	G	т	G	Α	Т	-
Gobio gobio Haplotype 3	-	-	Α	С	Т	т	С	С	G	Α	Т	-	С	G	т	G	Α	Т	-
Gobio gobio Haplotype 4	-	-	Α	С	Т	т	С	С	G	Α	Т	-	С	G	т	G	Α	G	-
Gobio insuyanus	Т	G	Α	Т	Т	С	С	Α	-	-	Т	-	С	G	Α	G	С	Т	Т
Gobio krymensis	-	-	Α	С	Т	Т	Α	С	G	Α	Т	-	С	Α	Т	Т	Α	Т	Т
Gobio lozanoi Haplotype 1	-	G	Α	Т	Т	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Α	G	С	Т	Т
Gobio lozanoi Haplotype 2	-	G	Α	Т	т	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Α	G	С	Т	Т
Gobio lozanoi Haplotype 3	-	G	Α	т	т	С	С	С	G	Α	т	-	С	G	Α	G	С	т	т
Gobio obtusirostris	Т	G	Α	T	T	С	С	С	G	A	T	-	С	G	Α	G	C	T	T
Gobio occitaniae Haplotype 1	Т	G	Α	Ť	T	С	С	С	G	A	T	-	С	G	Α	G	C	T	T
Gobio occitaniae Haplotype 2	т	G	Α	т	Т	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Α	G	С	т	т
Gobio occitaniae Haplotype 3	Т	G	A	Т	T	С	С	С	G	A	Т	-	С	G	A	G	С	T	Т
Gobio occitaniae Haplotype 4	Т	G	Α	Т	Т	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Α	G	С	Т	Т
Gobio occitaniae Haplotype 5	Т	G	Α	Т	т	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Α	G	С	Т	Т
Gobio occitaniae Haplotype 6	т	G	Α	Т	т	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Α	G	С	Т	Т
Gobio ohridanus	Т	G	Α	Т	Α	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Α	G	С	Т	Т
Gobio skadarensis	Т	G	Α	Т	Α	С	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Α	G	С	Т	Т
Gobio tauricus	-	-	Α	С	Т	Т	С	С	G	Α	Т	-	С	G	Т	G	Α	Т	Т
Gobio volgensis	-	-	Α	С	Т	T	С	С	G	Α	Т	Α	С	G	Т	G	С	Т	Т
	165	166	167	168	169	173	182	186	107	190	192	197	201	202	203	204	205	206	207
			107	100	103			_	10/	190	132	137	201	-0-	203	204	203		لنت
Gobio brevicirris	Т	Α	Т	Т	G	G	С	С	T	С	Α	G	-	-	-	-	-	-	-
Gobio carpathicus	Т	A A	T T	T T	G G	G T	C	C C	T C	C C	A A	G G	-	-		-	-	-	-
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1	T T	A A A	T T T	T T T	G G G	G T G	T T	C C	T C T	C C	A A G	G G G	- -					-	-
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2	T T	A A A	T T T	T T T	G G G	G T G G	T T	C C C	T C T	C C C	А А <b>G</b> А	G G G	-	-			-	-	-
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3	T T T	A A A A	T T T T	T T T	G G G G	G T G G	T T T	C C C	T C T T	C C C	А А <b>G</b> А А	G G G	- - - -	-		- - - -	- - - -	- - - -	-
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus	T T T T	A A A A	T T T T	T T T	G G G G	G T G G G	T T T T	C C C C	T C T T	C C C	A A G A A	G G G G	- - - -	-	-	-	- - -	-	- - - -
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1	T T T T T	A A A A	T T T T	T T T	G G G G G	G G G G	T T T	C C C C	T C T T C T	C C C C	А А <b>G</b> А А	G G G G	- - - -	-		- - - -	- - - -	- - - -	
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2	T T T T	A A A A	T T T T	T T T	G G G G	G T G G G	T T T T	C C C C	T C T T	C C C C	A A G A A	G G G G A	- - - -	-		- - - -	- - - -	- - - -	-
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3	T T T T T	A A A A	T T T T	T T T	G G G G G	G G G G	T T T T T T	C C C C	T C T T T T	C C C C	A A G A A	G G G G	- - - -	-		- - - -	- - - -		
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4	T T T T T	A A A A A	T T T T T T T T	T T T T T T T T	G G G G G G	G G G G G	T T T T T T	C C C C C	T C T T T T T T	C C C C C C	A A A A A A	G G G G A G	- - - -	-		- - - -	- - - -		-
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A -	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T	G G G G G G G	G G G G G G	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		T C T T T T T C C	C C C C A A C	A A A A A A	G G G G A G G	- - - - - - - -		- - - - - - -	- - - -	- - - - - - - -	- - - - - - -	
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis	T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T   T   T   T   T   T   T   T   T   T		G G G G G G	C T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		T C T T C T T T T C T T T T C T T T T C T	C C C C C C A A	A A A A A A A	G G G G G G	- - - - - - - - - -		- - - - - - - - -		- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	G G G G G G G G G	G G G G G G T	C T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		T C T T T T C T C T C C	C C C C A A C C C	A A A A A A A A A	G G G G G G G G G			- - - - - - - - -				
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1	T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	G G G G G G G G G	G T G G G G T T G T T T	C T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		T C T T T T C T C C C C C	C C C C A A C C C C	A A A A A A A A A	G G G G G G G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G G G G T T T	C T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		T C T T T T C T T C C T C C C C C	C C C C A A C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio obtusirostris	T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	G T G G G G G T T T T	C T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		T C T T T C C T C C C C C C	C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio obtusirostris Gobio occitaniae Haplotype 1	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G G G T T T T T T T T T T T T T T	C T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	T C T T T C C C C C C C C	C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 2	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G G G T T T T T	C T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		T C T T T C C C C C C C C C	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 2	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G G G T T T T T T T T T T T T T T	C		T C T T T T C C T C C C C C C C C C	C C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 2	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G T T T T T T T T T T T T T T T T	C		T C T T T C C C C C C C C C C C	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G A							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio occitaniae Haplotype 3	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G G G T T T T T T T T T T T T T T	C		T C T T T C C C C C C C C C C C C C C C		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G A G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 6	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G G G T T T T T T T T T T T T T T	C		T C T T T T C C C C C C C C C C C C C C		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 6 Gobio ohridanus	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G G G T T T T T T T T T T T T T T	C		T C T T T T C C C C C C C C C C C C C C	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 6 Gobio ohridanus Gobio skadarensis	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G G G T T T T T T T T T T T T T T	C		T C T T T T C C C C C C C C C C C C C C	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G							
Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 6 Gobio ohridanus	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		G T G G G G T T T T T T T T T T T T T T	C		T C T T T T C C C C C C C C C C C C C C	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G							

	214	218	219	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	264	269	272	274	275	276
Gobio brevicirris	С	Т	G	Т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	G	Α	Α	С	Α	Α
Gobio carpathicus	С	Т	G	Т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	-	-
Gobio caucasicus Haplotype 1	С	Т	G	Т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	С	Α	Α
Gobio caucasicus Haplotype 2	С	Т	G	т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	С	Α	Α
Gobio caucasicus Haplotype 3	С	т	G	т	Α	Α	G	_	_	_	_	_	С	т	Α	Α	С	Α	Α
Gobio cynocephalus	С	т	G	т	А	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio gobio Haplotype 1	С	Т	G	Т	Α	Α	G	т	Т	Α	Α	G	С	T	Α	Α	С	Α	Α
Gobio gobio Haplotype 2	С	Т	G	Т	Α	Α	G	_	_	_	_	_	С	Т	Α	Α	С	Α	Α
Gobio gobio Haplotype 3	C	T	G	T	A	Α	G			_	_		С	T	A	Α	С	A	A
Gobio gobio Haplotype 4	С	Т	G	T	A	Α	G	-	-	-	-	-	С	T	A	A	C	A	A
Gobio insuyanus	С	C	G	T	A	Α	G	-	-	-	-	-	С	T	A	A	T	A	A
Gobio krymensis	C	ļ .	G	Ţ	A	A	G	-	-	-	-	-	C	T	A	A	C	A	A
Gobio lozanoi Haplotype 1	С	'		Т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio lozanoi Haplotype 2	С	Т		Т.	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio lozanoi Haplotype 3	С	Т	G	Т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio obtusirostris	С	Т	G	Т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio occitaniae Haplotype 1	С	Т	G	С	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio occitaniae Haplotype 2	С	Т	G	С	Α	Α	G	-	-	-	-	-	Т	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio occitaniae Haplotype 3	Т	т	G	С	Α	Α	G	-	-	-	-	-	Т	т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio occitaniae Haplotype 4	С	Т	G	С	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio occitaniae Haplotype 5	С	Т	G	С	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio occitaniae Haplotype 6	С	Т	G	С	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio ohridanus	С	Т	G	Т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio skadarensis	С	Т	G	Т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Α	Α	Т	Α	Α
Gobio tauricus	С	Т	G	Т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	G	Α	Α	С	Α	Α
Gobio volgensis	С	Т	G	т	Α	Α	G	-	-	-	-	-	С	Т	Т	т	С	Α	Α
			)		,,		,						_						
J	277	_	279	281	291	299	301	303	304	305	311	318	321	322					
Gobio brevicirris	_	_				_		303 A	<b>304</b> A	305 T	311 G	318 A	<b>321</b>	322 T					
	277	278	279	281	291	299	301						_		325				
Gobio brevicirris	277 T	278 T	279 T	<b>281</b> A	291 T	299 C	301 C	Α	Α	T	G	Α	Α	Т	325 T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus	277 T	278 T	279 T	<b>281</b> A A	291 T T	299 C A	301 C A	A A	A C	T A	G G	A A	A A	T T	325 T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1	277 T -	278 T	279 T - T	281 A A A	291 T T T	299 C A C	301 C A C	A A A	A C A	A T	G G G	A A A	A A A	T T T	325 T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2	277 T - T	278 T	279 T - T T	281 A A A	7 T T T	299 C A C	301 C A C	A A A	A C A	T A T	G G G	A A A	A A A	T T T	325 T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus	277 T - T	278 T	7 T T T	281 A A A A	7 T T T T	299 C A C C	301 C A C C	A A A A	A C A A	T A T T	G G G G	A A A A	A A A A	T T T	325 T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3	277 T - T T T T	278 T	T - T T T	281 A A A A A	291 T T T T T	299 C A C C	301 C A C C C	A A A A	A C A A A	T A T T T	G G G G	A A A A	A A A A A	T T T T	325 T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2	277 T - T T T T	278 T	T - T T T	281 A A A A A A	291 T T T T T	299 C A C C C	301 C A C C C	A A A A A	A C A A A	T A T T T T T	G G G G	A A A A A	A A A A A	T T T T	325 T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3	7 T T T T T T T T	7 T T T T T T	T - T T T T T T	A A A A A A A A	7 7 7 7 7 7 7 7	299 C A C C C C C	301 C A C C C C C	A A A A A A	A C A A A A A	T A T T T T T T	G G G G A G	A A A A A A	A A A A A A	T T T T T T	325 T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4	277 T - T T T T T T T T	7 T T T T T T T	7 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A A A A A A A A	291 T T T T T T T T	299 C A C C C C C	301 C A C C C C C C	A A A A A A	A C A A A A A A	T A T T T T T T T	G G G A G G	A A A A A A	A A A A A A	T T T T T T T	325 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus	277 T T T T T T T T T T T	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	7 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A	291 T T T T T T T T T T T	299 C A C C C C C C	301 C A C C C C C C	A A A A A A	A A A A A A A	T A T T T T T T A	G G G G G G G G	A A A A A A A	A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325 T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278 T T T T T T T T	279 T - T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A	291	299 C A C C C C C C C	301 C A C C C C C C C	A A A A A A A	A A A A A A A	T A T T T T T T A	G G G G G G	A A A A A A A	A A A A A A A	T T T T T T T	325 T T T T T T T T T T T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	279 T - T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A A A	291  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T	299 C A C C C C C C A A C A	301 C A C C C C C C C C C	A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T A T A	G G G G G G G G	A A A A A A A A A A	A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278   T	279 T - T T T T T T - T	281 A A A A A A A A T T	291  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T	299 C A C C C C C C C A A A A	301 C A C C C C C C C C C C A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A T A A A	G G G G G G G G C	A A A A A A A A A	A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278   T	279   T	281 A A A A A A A A T T T	291 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	299 C A C C C C C C C A A A A A	301 C A C C C C C C C C C C C A A A A A A	A A A A A A A T A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A A A A A	G G G A G G G C C	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278   T	279   T	281 A A A A A A A A A T T T A	291	299 C A C C C C C C C A A A A A	301 C A C C C C C C C C C C A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 1	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278   T	279   T	281 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	291 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	299 C A C C C C C C A A A A A A	301 C A C C C C C C C C C A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325 T T T T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 3	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278   T	7 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	291   T	299 C A C C C C C C A A A A A A A A	301 C A C C C C C C C C A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 2	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278   T	7 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	291   T	299 C A C C C C C C A A A A A A A A	301 C A C C C C C C C A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325 T T T T T T T T T T T T T T T				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 2 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278 T T T T T T T	7 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	291 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	299 C A C C C C C A A A A A A A A A	301 C A C C C C C C C C A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio occitaniae Haplotype 3	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278 T T T T T T T	7 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	291  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T  T	299 C A C C C C C A A A A A A A A A A A A	301 C A C C C C C C C A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 4	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278 T T T T T T T	7 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	291	299 C A C C C C C A A A A A A A A A A A A	301 C A C C C C C C C A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 6 Gobio ohridanus	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278   T	7 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	291 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	299 C A C C C C C A A A A A A A A A A A A	301 C A C C C C C C C A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 2 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio cynocephalus Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 6 Gobio ohridanus Gobio skadarensis	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278 T T T T T T	77 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	291 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	299 C A C C C C C A A A A A A A A A A A A	301 C A C C C C C C C A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325				
Gobio brevicirris Gobio carpathicus Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio caucasicus Haplotype 3 Gobio caucasicus Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 1 Gobio gobio Haplotype 2 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 3 Gobio gobio Haplotype 4 Gobio insuyanus Gobio krymensis Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio lozanoi Haplotype 2 Gobio lozanoi Haplotype 1 Gobio occitaniae Haplotype 3 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 4 Gobio occitaniae Haplotype 5 Gobio occitaniae Haplotype 6 Gobio ohridanus	277 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	278   T	7 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	281 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	291	299 C A C C C C C A A A A A A A A A A A A	301 C A C C C C C C C A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T A T T T T T T A A A A A A A A A A A A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	325				

Une synthèse des identifications moléculaires sur les 3 marqueurs COI, rhodospine et S7 est fournie en Annexe 15. Nous constatons ainsi que sur 24 stations, au moins 2 espèces sont identifiés. Le *G. gobio* est en sympatrie avec le *G. lozanoi* dans le ruisseau de Cabanes (bassin de l'Adour), et avec le *G. occitaniae* dans les bassins de la Charente, Dordogne, Garonne, Aude et Rhône. *G. lozanoi* est en sympatrie avec *G. occitaniae* dans le bassin de l'Aude. Enfin, dans le Luy (Adour) et le Rimbez (Garonne), 3 espèces sont représentées (*G. lozanoi*, *G. gobio* et *G. occitaniae*). Sur le bassin de la Loire, les individus identifiés morphologiquement et génétiquement appartiennent à l'espèce *G. gobio*, sauf à partir d'environ 700 m d'altitude où le *G. alverniae* le supplante mais ces spécimens sont identifiés comme *G. gobio* sur le COI et *G. occitaniae* sur les marqueurs nucléaires. Ce n'est qu'en tête de bassin (*i.e.* dans l'Allier à Saint-Haon, à 1200 m d'altitude), que les *G. alverniae* sont génétiquement déterminés comme *G. occitaniae* sur le COI.

#### Etude préliminaire des niches écologiques

Les différentes identifications morphologiques et moléculaires ont permis d'établir une matrice d'occurrences des différentes espèces de goujon et des espèces accompagnatrices (Annexe 16).

L'analyse OMI explique 60,7% de la marginalité de tous les taxons (respectivement 36,5 et 24,2% pour les axes 1 et 2). Le premier axe est caractérisé par une forte élévation (E), ainsi qu'une vélocité (V) et un T1 (= T<sub>july</sub> + T<sub>january</sub>) élevé. Le deuxième axe est essentiellement associé au gradient longitudinal (G) mais considère peu T2 (= T<sub>july</sub> - T<sub>january</sub>) (Fig. 6.7). Si l'on observe la distribution des localités dans l'hyperespace des variables environnementales, nous constatons que l'axe 1 distingue nettement les stations se situant en altitude et celles proches de l'embouchure, ainsi que les stations des Pyrénées à courants élevés, et celles ayant des températures élevées toute l'année. Alors que l'axe 2 répartit les stations selon leur position dans le bassin versant : de la tête de bassin à l'embouchure (Fig. 6.8). Les valeurs de chaque variable environnementale par station est donnée en Annexe 14.

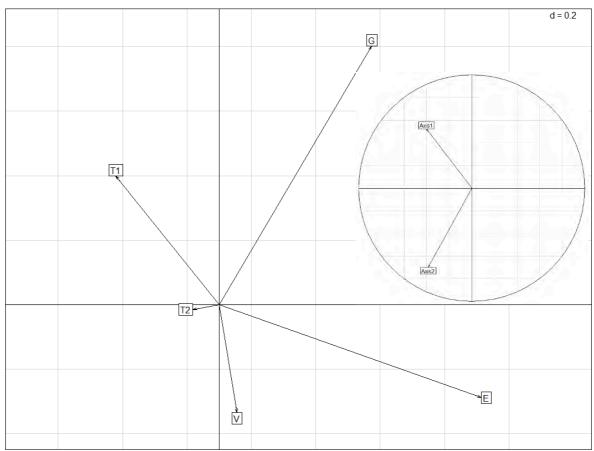


Figure 6.7 : Les deux premiers axes de l'analyse OMI (à droite) et les pondérations canoniques des variables environnementales considérées (centre) ; E : élévation, G : gradient longitudinal, V : vélocité, T1 : température de juillet + température de janvier, T2 : température de juillet - température de janvier.

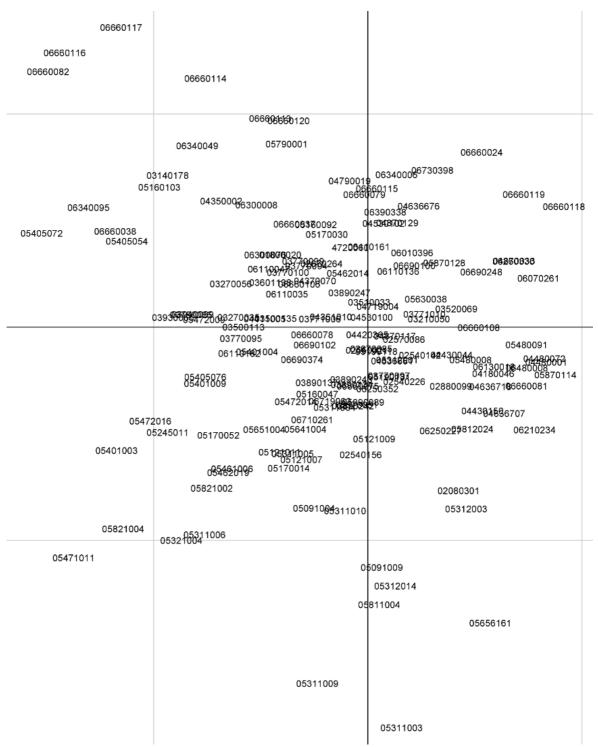


Figure 6.8 : Distribution des 152 stations dans une espace bidimensionnel défini par l'analyse OMI. La correspondance des numéros de stations est donnée dans l'Annexe 14.

La marginalité moyenne de tous les taxons (espèces accompagnatrices comprises) est très significative (p = 0,001), révélant une forte association entre la composition de l'assemblage d'espèces et les variables environnementales décrivant le milieu de vie, et justifiant la présence des taxons sur un diagramme de distribution (Fig. 6.9).

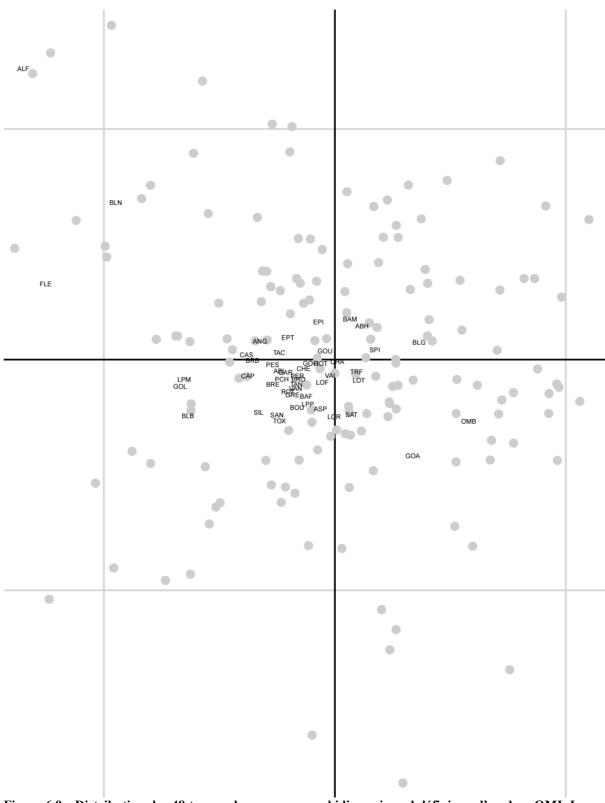


Figure 6.9 : Distribution des 48 taxons dans une espace bidimensionnel défini par l'analyse OMI. Les points gris représentent les stations. La correspondance des noms de taxons est donnée dans le Tableau 1.3.

L'objectif de cette analyse n'étant pas de décrire les habitats des 48 taxons, mais de se focaliser sur le genre *Gobio*. Les résultats généraux de l'analyse OMI sont donnés en Annexes 16 et 17.

Trois espèces (*G. gobio*, *G. alverniae* et *G. lozanoi*) se distinguent significativement en occupant des niches différentes (marginalité significative p < 0,05). Et les deux dernières ont un indice OMI très élevé (> 30), indiquant une forte spécialisation dans le choix des habitats. En revanche *G. occitaniae* ne se distingue pas des 3 autres espèces, avec une marginalité non significative, et a un faible indice OMI, ce qui signifie que cette espèce est ubiquiste dans son choix d'habitat. Néanmoins, les valeurs très élevées de tolérance résiduelle indiquent l'existence d'une source inconnue d'hétérogénéité autre que nos variables environnementales considérées (Tabl. 6.3).

Tableau 6.3 : Composition, nombre de sites et paramètres d'analyse outilying mean index (OMI) pour les 4 espèces de goujons de Kottelat et Persat (2005) recensées sur 152 stations Onema en France.

TAXON	N	Valeur d'OMI	Inertie	Tolérance	Tolérance résiduelle	p value du test de permutation Monte-Carlo	
Gobio alverniae GOA	11	31,30	4,90	4,40	64,30	0,010	**
Gobio gobio GOU	88	1,90	3,76	11,30	86,80	0,026	*
Gobio lozanoi GOL	8	40,30	3,90	4,20	55,60	0,032	*
Gobio occitaniae GOO	78	0,70	6,37	8,80	90,50	0,235	

p < 0.05; \*\*p < 0.01

La représentation des niches occupées par les 4 espèces de Kottelat et Persat (2005) indiquent que le *G. alverniae* suit davantage l'axe 1 avec une correspondance avec l'élévation et la vélocité, elle se trouverait dans une aire où les milieux sont majoritairement courants et serait donc l'espèce la plus rhéophile (Fig. 6.10). *G. lozanoi* suit également l'axe 1 avec une relation avec les températures élevées, mais aussi l'axe 2 indiquant qu'il se situe assez bas dans le gradient longitudinal et serait plutôt thermophile et nettement moins rhéophile. *G. gobio* a une position centrée avec une position moyenne en altitude et en température, ainsi qu'une vélocité modérée, il serait euryèce et moins rhéophile que *G. alverniae*. Enfin, la distribution des populations de *G. occitaniae* ne suit aucun axe sur le graphique; cette espèce semble être euryèce.

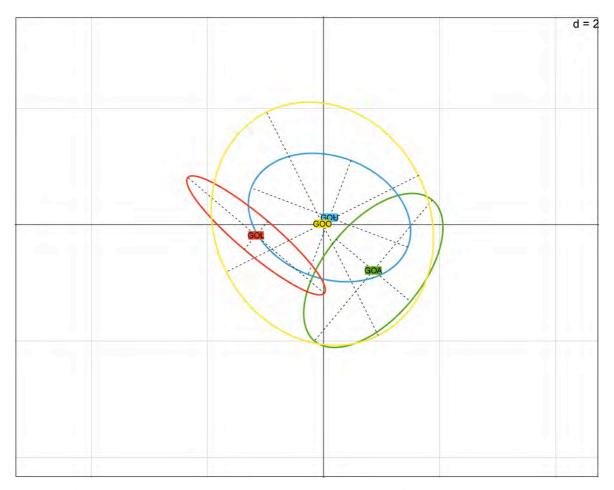


Figure 6.10 : Diagramme représentant les niches occupées par les 4 espèces de goujons de Kottelat et Persat (2005). GOA : *Gobio alverniae*, GOL : *G. lozanoi*, GOO : *G. occitaniae*, GOU : *G. gobio*.

#### **Discussion**

## Identifications des goujons Gobio spp en France

Tous les 493 spécimens collectés ont été identifiés morphologiquement. Des difficultés ont été rencontrées quant à la différenciation des espèces entre *G. occitaniae* et *G. alverniae*. Kottelat et Persat (2005) admettent que ces deux espèces doivent être des « espèces sœurs », et que leur variabilité morphologique ne permettait pas toujours de les distinguer, mais soutiennent qu'en l'absence de données phylogénétiques, ces 2 espèces devaient être considérées comme distinctes.

C'est pourquoi nous avons également réalisé des analyses génétiques en utilisant 3 marqueurs : un mitochondrial (COI) et deux nucléaires (rhodopsine et S7). L'analyse du

COI ne distingue très nettement que 3 des quatre espèces supposées de Kottelat et Persat (2005), *G. gobio*, *G. occitaniae* et *G. lozanoi*, et confirme les résultats déjà obtenus sur les marqueurs mitochondriaux (Doadrio & Madeira, 2004; Madeira *et al.*, 2005; Geiger *et al.*, 2014). Les individus identifiés morphologiquement comme *G. alverniae* appartiennent souvent au même groupe d'haplotypes que le *G. occitaniae* (à l'exception de ceux du bassin de la Loire; discuté plus loin). L'analyse phylogénétique sur le marqueur S7 et l'observation des indels confirment leur utilisation comme caractères diagnostiques (Mendel *et al.*, 2008), et soutient bien les données morphologiques. La rhodopsine, quant à elle, regroupe les allèles correspondant aux *G. gobio* et *G. lozanoi* par rapport à l'identification morphologique, mais pas celles de *G. occitaniae* ni *G. alverniae*. Néanmoins, ce marqueur permet de différencier 3 des quatres espèces de goujons de Kottelat et Freyhof (2005), et nos résultats confirment l'intérêt de ce marqueur pour la taxonomie (e.g. Sevilla *et al.*, 2007; Lautrédou *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2012; Rehbein, 2013).

Les observations morphologiques et les analyses génétiques ont démontré que ces espèces pouvaient parfois s'hybrider entre elles. Les périodes de reproduction des différentes espèces de goujon ont été très bien étudiées, à l'exception du *G. alverniae* pour lequel il n'existe aucune donnée à notre connaissance. Ces études étant, pour la plupart, antérieures à la publication de Kottelat et Persat (2005), ont été réalisées sur des populations dont la localisation permet de déterminer *a priori* l'espèce de *Gobio* étudiée. La reproduction du goujon commun *Gobio gobio sensu stricto* se produit d'avril à juillet, avec un pic en mai-juin (Braken & Kennedy, 1967; Mathews, 1971; Mann, 1980; Kestemont, 1990, 2007). Tandis que pour le goujon de l'Adour *G. lozanoi*, sa période de reproduction est plus longue: mi mai – début juin à fin juillet – début août en Espagne (Lobón-Cerviá & Torres, 1984) et de juin à août dans la Nivelle en France (Bernet, 1960). Enfin, la période de reproduction du goujon occitan *G. occitaniae* va de mi-avril jusqu'à fin juin voire septembre pour les eaux froides (Brunet & Hoestlandt, 1972). Les périodes de reproduction pour chacune des espèces se chevauchent, permettant les hybridations sur les sites où elles vivent en sympatrie.

Ces hybridations pourraient être dues en majorité à l'activité humaine, car le goujon est très manipulé, et est souvent inclus dans les opérations de rempoissonnement (Kiener & Ollier, 1970 ; Brunet & Hoestlandt, 1972 ; Kiener *et al.*, 1981 ; Kiener, 1985 ; Kottelat & Persat, 2005). Ainsi, le goujon commun *G. gobio* est également présent dans les bassins du

Sud-Ouest, où il n'est pas natif. De même, le goujon de l'Adour *G. lozanoi* a été identifié dans l'Aude car les gestionnaires se fournissent auprès d'un pisciculteur des Pyrénées-Atlantiques (Chastanet, comm. pers.). Les pêcheurs se trouvant en bordure de bassin et qui utilisent le goujon comme vifs peuvent introduire des espèces non natives (Keith *et al.*, 2011a); c'est le cas pour le Rimbez, ainsi que les bassins de la Dordogne et de la Charente. Cela serait l'une des explications sur nos 2 ensembles d'haplotypes différents sur le S7 chez *G. gobio* sans qu'il n'y ait de relation avec la géographie, l'autre étant un phénomène de coalescence profonde (voir Edwards, 2009).

L'étude des gènes nucléaires a également révélé la présence d'haplotypes correspondant au *G. occitaniae* dans d'autres bassins que l'aire de répartition indiquée par Kottelat et Persat (2005), tels que la Loire aval, la Vilaine, le Rhône versant Massif Central et la Seine. Deux hypothèses sont possibles : soit il s'agit du résultat des campagnes de repeuplement, soit le *G. occitaniae* avait une aire de répartition plus large avant les épisodes glaciaires et comparable à l'aire de répartition actuelle de la vandoise rostrée *Leuciscus burdigalensis* Valenciennes 1844 (Costedoat *et al.*, 2006 ; Costedoat & Gilles, 2009). Des analyses génétiques complémentaires avec des marqueurs plus précis sont nécessaires pour étudier la phylogéographie des goujons et pour résoudre ce problème (Grenier *et al.*, 2013).

# Etude préliminaire des niches écologiques

Les analyses génétiques ont démontré la présence de plusieurs espèces de goujons dans la plupart de bassins. Nous pouvons considérer qu'il y a sympatrie entre les espèces, justifiant ainsi la possibilité d'utiliser une OMI pour étudier les habitats de chaque espèce de goujon. De même, dans cette discussion, nous considérons les 4 taxons de Kottelat et Persat (2005).

L'analyse OMI a démontré que *G. gobio*, *G. alverniae* et *G. lozanoi* occupaient des niches différentes. Elles se distinguent ainsi du preferendum « goujon » défini par l'OMI de Tales *et al.* (2004) sur des populations provenant de 738 stations en France, à savoir une espèce rhéophile et tolérante face aux écarts de températures ce qui a eu un impact direct sur l'utilisation de l'Indice Poisson Rivière. En revanche *G. occitaniae* ne se distingue pas des 3 autres espèces, et peut occuper un large éventail d'habitats. Le *G. alverniae* serait

donc le plus rhéophile habitant dans les zones à truite et à ombre (sensu Huet, 1959) partageant son habitat avec la truite de rivière Salmo trutta, le chabot d'Auvergne Cottus duranii, la loche franche Barbatula barbatula, la lamproie de Planer Lampetra planeri et les vairons *Phoxinus sp* 1 et 2. (voir le chapitre 5) (pour la Loire, Lasne *et al.*, 2007). Le G. lozanoi, au contraire, se situe assez bas dans le gradient longitudinal, et serait plutôt thermophile et nettement moins rhéophile. Ce goujon vit donc dans des rivières de plaines (Doadrio & Madeira, 2004 ; Leunda et al., 2012). Il s'abrite en été derrière des herbiers, branches ou racine sur un substrat de galets avec des vitesses de courant nulles et moyennes (Mastrorillo et al., 1996). Cette espèce est fortement associée au vairon béarnais Phoxinus bigerri (Mastrorillo et al., 1996; Oscoz et al., 2006) mais pas avec la loche franche (Mastrorillo et al., 1996). Le G. gobio serait moins rhéophile que G. alverniae. Néanmoins, il est fréquemment rencontré depuis la zone à ombre à la zone à brème et souvent associé au vairon Phoxinus spp. et à la loche franche Barbatula barbatula (essentiellement dans les zones à ombre et barbeau), ainsi qu'avec le chevesne Squalius cephalus et le gardon Rutilus rutilus (Lasne et al., 2007). Cette espèce peut s'adapter en milieu lacustre (Chappaz et al., 1988). Enfin, le G. occitaniae semble, quant à lui, pouvoir supporter toutes les conditions extrêmes possibles pour un goujon : présent en plaine comme en tête de bassin (y compris en altitude ; jusqu'à 1500m d'altitude (Aude à Matemale)), supportant également les rivières à faibles et fortes vélocités, ainsi que les différences de températures ; cette espèce est donc euryèce (Park et al., 2006). Il préfère néanmoins les milieux lotiques (Hutagalung et al., 1997). Céréghino et al. (2005) ont démontré que la présence de goujon dans le bassin de la Garonne était corrélée positivement avec l'élévation et négativement avec la pente, et par conséquent se rencontre de préférence dans les zones de piedmont. Ce goujon a différents habitats selon les saisons. Sur l'Ariège, en hiver, il préfère les microhabitats à forts recouvrements de sable et de marne, alors qu'en été il recherche les abris avec des branches et racines sur un substrat mixte de galets, graviers et sable (Mastrorillo et al., 1996). Dans le bassin de la Garonne, cette espèce est fortement associée au vairon *Phoxinus sp.* 2, parfois avec la loche franche Barbatula barbatula (Mastrorillo et al., 1996; Céréghino et al., 2005; Park et al., 2006), mais également avec la vandoise rostrée Leuciscus burdigalensis (Santoul et al., 2005).

Ainsi, nos résultats préliminaires assurent que si ce genre est rhéophile, certaines espèces le sont plus que d'autres, et des différences significatives ont été observées. *G. gobio*, *G. lozanoi* et *G. alverniae* occupent chacun des niches différentes, mais *G. occitaniae* a la possibilité de toutes les occuper. Nous assumons le fait de ne pas pousser

davantage l'analyse et l'interprétation des résultats de l'OMI compte tenu de l'absence de données relatives à l'abondance. L'objectif de cette analyse préliminaire était uniquement de démontrer les différences de niches écologiques potentielles entre les différentes espèces de goujons, et non de les caractériser. Nous sommes également conscient qu'il y a un fort biais géographique dans analyse, et qu'avec seulement 60,7% de la marginalité expliquée par notre OMI et les valeurs très élevées de tolérance résiduelle, ce travail mérite d'être approfondi. D'une part, il serait par conséquent nécessaire d'inclure davantage de stations, et d'autres variables environnementales comme la nature du substrat, la végétation, la pression anthropique, les macroinvertébrés etc... (Marzin *et al.*, 2013). De même que d'autres analyses sont possibles, comme notamment le module biomod2 sous R (Thuiller *et al.*, 2013), et qu'il serait nécessaire de comparer les différents résultats de chacune ces analyses (Laffaille, comm. pers.).

#### Validation de trois espèces de goujons *Gobio* spp en France

Nous avons réalisé une révision taxonomique des goujons *Gobio* spp de France, en utilisant des critères morphologiques, génétiques, écologiques et liées à la reproduction dans notre jeu de données. Kottelat et Persat (2005) avaient réalisé seulement une étude morphoméristique mettant en évidence l'existence de 4 espèces de goujons : *G. gobio*, *G. lozanoi*, *G. occitaniae* et *G. alverniae*. Cependant ils affirment que la distinction entre *G. occitaniae* et *G. alverniae* n'est pas nette, ce qui serait du, selon eux, à de l'introgression.

Chaque marqueur génétique que nous avons utilisé distingue 3 espèces : *G. gobio*, *G. lozanoi* et *G. occitaniae*. Le *G. alverniae* était généralement inclus parmi les *G. occitaniae*, sauf pour les spécimens du bassin de la Loire qui sont identifiés comme *G. gobio* jusqu'à 1200m d'altitude où ils ont l'haplotype du goujon occitan. L'étude préliminaire des niches écologiques à partir de stations abritant des goujons dont l'identification est certaine, a démontré que *G. gobio*, *G. lozanoi* et *G. alverniae* occuperaient des niches particulières et distingables les unes des autres. Cependant les niches de chacune de ces espèces ne pourraient pas être différenciables de celles occupées par *G. occitaniae* qui a un éventail d'habitats très large. Enfin, les marqueurs nucléaires affirment la possibilité d'hybridation entre les espèces, sans différencier *G. alverniae* et *G. occitaniae* 

L'ensemble de ces résultats nous permet donc de valider 3 des 4 espèces de Kottelat et Persat (2005) selon une approche de taxonomie intégrative : *Gobio gobio* (Linnaeus, 1758), *Gobio lozanoi* Doadrio & Madeira, 2004 et *Gobio occitaniae* Kottelat & Persat, 2005.

Le goujon d'auvergne *G. alverniae* ne se distingue du *G. occitaniae*, que faiblement en morphologie, pas du tout avec nos marqueurs génétiques, et peuvent occuper les mêmes niches écologiques (en altitude). L'unique caractéristique écologique du *G. alverniae* étant l'altitude, nous pensons que ce taxon pourrait être un morphotype « montagnard » (adapté à son habitat en altitude) du *G. occitaniae*. Bănărescu (1999) a observé des différences morphologiques entre les populations rhéophiles (*i.e.* pédoncule caudal plus large) et les limnophiles et pensait qu'il s'agissait de « variations écologiques », plus précisément dûes à une adaptation à l'habitat. Kottelat et Persat (2005) ont réfuté cette hypothèse en affirmant que Banarescu ne tenait pas compte de la géographie et qu'il observait des critères taxonomiques. Nos résultats donnent raison à Bănărescu (1999) concernant *G. alverniae* et *G. occitaniae*.

En conséquence, au vu de l'Article 24.2.1 du Code International de Nomenclature Zoologique, nous assumons le fait que *Gobio alverniae* Kottelat et Persat 2005 doit être considéré comme un synonyme junior de *Gobio occitaniae* Kottelat et Persat 2005.

#### Impact sur l'écologie et la conservation des goujons en France

L'espèce de goujon peuplant le bassin de la Loire est majoritairement le goujon commun *G. gobio*, sauf à partir d'environ 700 m d'altitude où le morphotype goujon d'Auvergne *G. « alverniae* » le supplante. En génétique, nous avons constaté qu'en tête de bassin (à 1200 m d'altitude), les individus de morphotype « *alverniae* » étaient génétiquement déterminés comme *G. occitaniae* et qu'à 700 m ils étaient identifiés comme *G. gobio* sur le COI. Plus en aval, tous les individus sont identifiés *G. gobio* sur le COI mais les marqueurs nucléaires indiquent la présence de *G. occitaniae* (Fig. 6.11). Ceci suggère qu'il y aurait une zone d'introgression entre *G. gobio* et *G. occitaniae* aux alentours de 700m d'altitude, *G. gobio* n'ayant pas de niche plus en en altitude (on observe le même phénomène dans l'Ardèche). D'avantages d'échantillonnages, selon un gradient amont-aval sur le bassin de la Loire, et davantages d'analyses sont nécessaires pour affiner ce résultat et valider l'hypothèse de la nativité du *G. occitaniae* sur ce bassin. Si cette

dernière est confirmée, cela signifie que le goujon commun serait plus compétitif que le goujon occitan, et qu'il pourrait représenter une menace pour les espèces autochtones, comme il l'est pour *Romanogobio benacensis* (Pollini, 1816) en Italie (Bianco & Ketmaier, 2005).

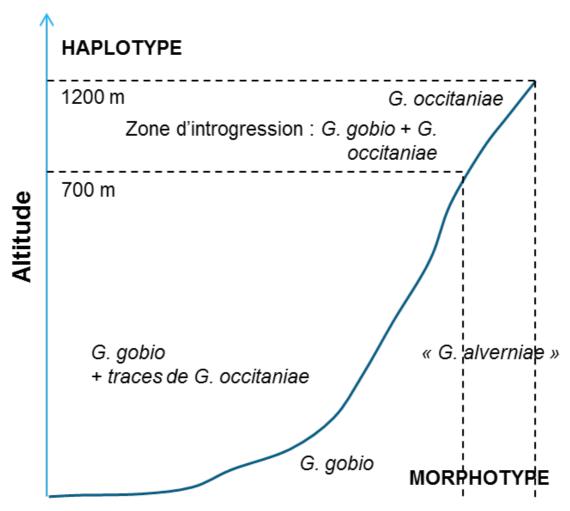


Figure 6.11 : Schéma illustrant les identifications morphologiques et moléculaires des goujons observés sur le bassin de la Loire.

Une quatrième espèce de goujon, le goujon d'Ukraine *Romanogobio belingi* (Slastenenko, 1934), est potentiellement présente en France dans le bassin du Rhin (Freyhof *et al.*, 2000) mais aucun spécimen n'a pour le moment été signalé (Keith *et al.*, 2011a). Cependant, des spécimens collectés dans l'aquarium du SIAAP à Colombes ont été identifiés comme appartenant à cette espèce (MNHN 2014-0016). Ils ont été fournis par une pisciculture néerlandaise sous la dénomination de *Gobio gobio*. Il n'est par conséquent pas à exclure que le goujon d'Ukraine ait été introduit dans plusieurs cours d'eau en France

autre que le bassin du Rhin, ce qui pourrait davantage menacer les espèces natives de part son fort potentiel invasif (Freyhof *et al.*, 2000).

Toutes les espèces de goujons de France sont actuellement classées comme préoccupation mineure sur la liste rouge IUCN (2014). En France, aucune d'entre elles n'a de statut faute de données (UICN France *et al.*, 2010). Compte tenu de l'intérêt du goujon pour la pêche récréative, des départements dans le Sud-Ouest de la France ont instauré des périodes de fermeture de la pêche durant la reproduction, et des opérations de soutien d'effectifs sont réalisées dans le but de maintenir des populations importantes (Keith *et al.*, 2011a). Or, les populations introduites pour le repeuplement sont souvent d'origine plus ou moins lointaine (par conséquent appartiennent à une autre espèce). Sachant qu'il n'y a nulle barrière à la reproduction, les risques d'introgression sont majeurs et peuvent menacer les populations natives (*e.g.* Gozlan *et al.*, 2010 ; Ribeiro & Leunda, 2012). Ainsi, il serait important de ré-évaluer rapidement le statut de chacune des espèces de goujon de France sur la Liste rouge des espèces menacées (Collares-Pereira *et al.*, 2002 ; Keith & Marion, 2002). De même il est fortement recommandé de privilégier la production locale en vue des repeuplements et de la gérer en circuit fermé à l'échelle des bassins d'origine (Keith *et al.*, 2011a).

Enfin, nos résultats confirment que les études en écologie ont tort de ne considérer qu'une espèce de goujon en France (cf Annexe 10). Bortolus (2008) a listé les risques que la non-considération des travaux en taxonomie pouvait engendrer sur les études en écologie, en gestion et en socioéconomie. Il est arrivé notamment que des taxons natifs et endémiques disparaissent à cause de cela (e.g. Geller, 1999). Heureusement qu'il existe beaucoup d'études pour lesquelles les résultats n'influent pas sur les conclusions finales (voir Bortolus, 2008). Mais n'oublions pas que la gestion de l'environnement ne serait pas possible sans des études en écologie, qui ne seraient pas également possibles sans taxonomie, et que cette structure est ce qui fait la robustesse des sciences en biologie (May, 1990; Bortolus, 2008).

#### **Conclusion**

Ce travail sur les goujons de France a révisé les 4 espèces de goujons définis par Kottelat et Persat (2005): *G. gobio, G. alverniae, G. lozanoi* et *G. occitaniae*. L'identification des 494 spécimens collectés sur le terrain et l'examen des spécimens de collection ont montré que la distinction entre *G. alverniae* et *G. occitaniae* n'était pas évidente. Les données génétiques sur 3 marqueurs ont bien séparés 3 d'entre elles (G. *gobio, G. lozanoi* et *G. occitaniae*) mais n'ont pas distingué *G. alverniae* des *G. occitaniae*. De même, elles ont montré la possibilité d'hybridation entre les espèces confirmant certaines observations morphologiques. Il ne restait plus que les données écologiques pour vérifier la validité du *G. alverniae*. L'analyse OMI des niches occupées par les 4 espèces supposées sur 152 stations de goujons a mis en évidence que 3 d'entre elles (G. *gobio, G. lozanoi* et « *G. alverniae* ») avaient des caractéristiques qui leurs étaient propres mais qu'elles n'étaient pas distinguables de celles que pouvait occuper *G. occitaniae*. En définitive, selon notre approche de taxonomie intégrative, seulement G. *gobio, G. lozanoi* et *G. occitaniae* sont valides. *G. alverniae* a été invalidée, et est désormais considérée comme synonyme junior du *G. occitaniae*.

Cette étude a mis en évidence les différentes niches écologiques que ces taxons pouvaient occuper : *G. lozanoi* est un goujon de plaine et thermophile, *G. gobio* est plus rhéophile et supporte d'avantage les écarts de température, enfin *G. occitaniae* peut occuper toutes les niches des espèces précédentes mais elle est la seule à pouvoir occuper celles situées en altitude. Ainsi, il est désormais nécessaire de réaliser des études en écologie à partir de spécimens bien identifiés, de manière à savoir de quelle(s) espèce(s) il s'agit et d'éliminer un biais susceptible de fausser les résultats. Il y a 3 espèces de *Gobio* en France et non une seule. Les études en écologie qui en découleront seront ainsi bénéfiques à la gestion et/ou la conservation des espèces.

Ceci est vrai aussi pour tous les autres taxons découverts ou réactualisés, qui sont parfois endémiques en France, et qui, surtout, ont désormais une valeur patrimoniale importante.

# CHAPITRE 7 SYNTHESE ET CONCLUSION

#### SYNTHESE ET CONCLUSION

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse selon une approche de taxonomie intégrative ont permis d'apporter un éclairage nouveau sur l'ichtyofaune d'eau douce de France.

Dans cette synthèse, nous discuterons dans un premier temps de l'utilité de l'approche intégrative pour réaliser les révisions taxonomiques. Puis dans un deuxième temps, nous comparerons les aires de répartition des différentes espèces, et tenterons de les rapporter aux évènements biogéographiques présentés en introduction. Enfin, après avoir fait un état actualisé des connaissances sur l'ichtyofaune de France, nous discuterons de l'impact de ces nouvelles découvertes quant aux différentes disciplines en biologie fondamentale, mais également à la gestion et la conservation.

# Application de l'approche de taxonomie intégrative pour les poissons d'eau douce de France

Durant cette thèse, nous avons révisé 5 genres de poissons téléostéens d'eau douce de France selon une approche de taxonomie intégrative (e.g. Padial *et al.*, 2010). Les différences entre des groupes d'individus ont été étudiées à partir de plusieurs jeux de données indépendants, en vérifiant la congruence des résultats : données morphologiques, moléculaires, liées à la reproduction, ou à la génétique.

Ces 5 genres étaient considérés, il y a encore 15 ans, comme étant monospécifiques en France (e.g. Keith & Allardi, 2001). Cette approche a permis de confirmer 9 espèces parmi celles reconnues dans Kottelat et Freyhof (2007) pour ces 5 genres, d'en proposer d'en invalider 2, et d'en rajouter 5 dont 3 nouvelles pour la science (Tabl. 7.1).

Tableau 7.1 : Liste des changements taxonomiques apportés par cette thèse par rapport à l'Atlas des poissons d'eau douce de France de Keith & Allardi (2001) et au catalogue des poissons d'eau douce européens de Kottelat et Freyhof (2007).

	Keith & Allardi, 2001	Kottelat & Freyhof, 2007	Denys, 2015
Goujon	Gobio gobio (Linnaeus, 1766)	Gobio gobio (Linnaeus, 1758) Gobio alverniae Kottelat & Persat, 2005 Gobio occitaniae Kottelat & Persat, 2005 Gobio lozanoi Doadrio & Madeira, 2004	Gobio gobio (Linnaeus, 1758) Gobio occitaniae Kottelat & Persat, 2005 Gobio lozanoi Doadrio & Madeira, 2004
Vairon	Phoxinus phoxinus (Linnaeus, 1766)	Phoxinus phoxinus (Linnaeus, 1758) Phoxinus bigerri Kottelat, 2007 Phoxinus septimaniae Kottelat, 2007	Phoxinus phoxinus (Linnaeus, 1758) Phoxinus bigerri Kottelat, 2007 Phoxinus septimaniae Kottelat, 2007 Phoxinus marsilii Heckel, 1836 Phoxinus sp.1 Phoxinus sp.2
Chevesne	Leuciscus cephalus (Linnaeus, 1766)	Squalius cephalus (Linnaeus, 1758) Squalius laietanus Doadrio et al., 2007	Squalius cephalus (Linnaeus, 1758) Squalius laietanus Doadrio et al., 2007
Brochet	Esox lucius Linnaeus, 1766	Esox lucius Linnaeus, 1758	Esox lucius Linnaeus, 1758 Esox cisalpinus Bianco & Delmastro, 2011 Esox aquitanicus Denys et al., 2014
Epinoche	Gasterosteus aculeatus Linnaeus, 1766	Gasterosteus gymnurus Cuvier, 1829	Gasterosteus aculeatus Linnaeus, 1758

Il s'agit des premières révisions taxonomiques sur les poissons téléostéens d'eau douce de France réalisées selon une approche intégrative et pour lesquels les différentes analyses ont été effectuées sur les mêmes individus. Jusque là, en effet, les nouvelles espèces décrites l'ont été uniquement sur la morphologie (Kottelat & Persat, 2005; Kottelat, 2007), ou bien en ajoutant des données moléculaires mais sans faire de liens avec les individus étudiés pour la morphologie ou la morphométrie. Ce fut le cas par exemple du *Gobio lozanoi*, où des populations de l'Adour ont été intégrées dans les analyses phylogénétiques, mais aucun spécimen de ce bassin n'avait été intégré dans l'analyse morphométrique (Doadrio & Madeira, 2004). Inversement, pour *Squalius laietanus*, des spécimens français ont été désignés comme paratypes, il n'existait pas de données moléculaires correspondantes (Doadrio *et al.*, 2007). D'autres auteurs ont des données moléculaires et morphologiques sur des spécimens distincts mais provenant des mêmes

localités. C'est le cas de Freyhof *et al.* (2005) qui ont fait une révision taxonomique des chabots de France *Cottus* spp. à partir de caractères morphologiques en s'appuyant sur des travaux réalisées en génétique pour certains de leurs taxons (Eppe *et al.*, 1999; Englbrecht *et al.*, 2000; Volckaert *et al.*, 2002; Knapen *et al.*, 2003). De même, Kottelat et Freyhof (2007) ont revalidé *Leuciscus burdigalensis* Valenciennes, 1844 en s'appuyant sur les travaux en génétique de Chappaz *et al.*, (1998) et de Costedoat *et al.* (2006). Le fait de réaliser des révisions taxonomiques en utilisant différentes sources de données, et ce, sur les mêmes individus, comme dans le cadre de cette thèse donne davantage de rigueur aux résultats, en particulier lorsqu'il y a un risque d'hétérogénéité entre les spécimens.

Cette approche intégrative met également en évidence la difficulté de délimiter une espèce si l'on n'utilise pas un maximum de jeux de données indépendants. Elle permet aussi de mieux comprendre la biologie évolutive du groupe révisé (Schlick-Steiner *et al.*, 2010, 2014). Par exemple, nous avons pu constater que les plaques latérales des épinoches *Gasterosteus aculeatus* n'étaient pas un critère taxonomique (chapitre 3 ; Denys *et al.*, 2015), mais que leur présence était corrélée à la salinité du milieu de par l'activation du gène *Eda*. Inversement, la spéciation des vairons *Phoxinus* spp est probablement liée à une spéciation allopatrique et présente maintenant des variations de parures nuptiales entre les mâles et les femelles (chapitre 5).

Ce travail de révision taxonomique des poissons d'eau douce de France devra être étendu à l'ensemble des genres natifs, tels les chabots *Cottus* spp, ou les épinochettes *Pungitius* spp, afin d'aller au bout de la démarche de vérification de nos connaissances.

La taxonomie n'est pas une science figée. Avec l'accumulation des données génomiques grâce à l'émergence du séquençage nouvelle génération (Andrew *et al.*, 2013), des nouvelles données moléculaires aux résolutions sans précédent vont être de plus en plus disponibles, et apporter de nouvelles informations permettant d'expliquer l'évolution des taxons. Ainsi, grâce à l'ajout de génomes mitochondriaux complets ou de RAD-seqs, les délimitations des espèces seront améliorées au fil du temps (Schlick-Steiner *et al.*, 2014). Cependant, ceci dépend de la précision des métadonnées accompagnant les données de séquence. De trop nombreuses séquences sont encore générées et publiées sans lien vers un spécimen ou même une localité de capture, limitant considérablement leur utilisation dans de futures révisions (Hinsinger *et al.*, sous presse). L'exemple le plus remarquable est celui des truites, où de nombreuses données de séquence ont été générées sans aucun lien avec des spécimens, et de nombreux déversements ont été réalisés brouillant le paysage génétique, il paraît impossible de réaliser une révision taxonomique des truites en Europe;

ce qui constitue une « honte pour l'ichtyologie européenne » (Kottelat & Freyhof, 2007). Pour les taxons sur lesquels portent ce travail, ce problème se présente également. Pour la séquence d'*E. lucius* (NC\_004593.1), aucune localité ni spécimen ne sont indiqués ni dans la publication (Ishiguro *et al.*, 2003), ni accompagnant la séquence. Pour *G. gobio* (NC\_008662.1), il y a une localité générale (République tchèque), or d'autres espèces ont été décelées dans cette région (e.g. Mendel *et al.*, 2008). Pour *P. phoxinus* (NC\_020358.1), il y a une localité précise, mais celle-ci correspond davantage à la répartition du *P. lumaireul* (Kottelat & Freyhof, 2007), il faudrait revenir au spécimen, mais ce dernier n'est pas indiqué.

# De la taxonomie à l'explication phylogéographique

Nous avons réalisé une révision taxonomique de 5 genres pour lesquels la majorité des espèces sont natives en France : *Gasterosteus* (1 espèce), *Esox* (2 espèces natives + 1 probablement introduite), *Squalius* (2 espèces), *Gobio* (3 espèces) et *Phoxinus* (6 espèces). Les multiples évènements biogéographiques ont façonné les peuplements ichtyologiques français. Grâce aux progrès technologiques (comme le séquençage nouvelle génération NGS) et l'utilisation d'une approche intégrative (combinant la morphologie, le moléculaire et l'écologie), nous pouvons retracer l'histoire de ces taxons. Les distributions des espèces pour chacun de ces genres présentent des similarités mais également des différences qui pourraient être liées à la biologie du taxon et à la biogéographie. Tout d'abord, il est important de classer ces genres en fonction de leur tolérance à la salinité du milieu (Myers, 1938; Bănărescu, 1990), car les moyens et stratégies de dispersions sont différents. Sur les 5 genres, nous en avons 3 qui sont dits « primaires » car strictement intolérants aux eaux salées (*Squalius*, *Gobio* et *Phoxinus*), un dit « secondaire » car plutôt confiné aux eaux douces mais avec une tolérance pour la salinité (*Esox*), et un vicariant (*Gasterosteus*) car d'origine marine mais non diadrome (Myers, 1938; Bănărescu, 1990).

#### Les taxons primaires

#### Les chevesnes

Il y a 2 espèces de chevesnes *Squalius* spp en France. Le chevesne commun *Squalius cephalus* est natif dans la majorité des bassins versants (Persat & Keith, 1997), à l'exception de la Corse et des Pyrénées Orientales. Dans les bassins des Pyrénées Orientales (Agly, Tech, Têt, Massane), on trouve une autre espèce native, *Squalius laietanus* (Fig. 7.1a). La phylogéographie de ce genre a été très étudiée (Durand *et al.*, 1999, 2000; Doadrio & Carmona, 2003; Sanjur *et al.*, 2003; Seifertová *et al.*, 2012). Les différentes données génétiques s'accordent sur le fait que les populations appartenant à la grande majorité des bassins français sont très proches (Durand *et al.*, 1999, 2000; Seifertová *et al.*, 2012; Denys *et al.*, 2013), tandis que celles des bassins des Pyrénées Orientales sont proches de celles du bassin de l'Ebre (Denys *et al.*, 2013) formant ainsi le

clade *S. laietanus*. Cette espèce est incluse dans une lignée regroupant les taxons grecs (Durand *et al.*, 2000 ; Doadrio & Carmona, 2003 ; Sanjur *et al.*, 2003 ; Doadrio *et al.*, 2007 ; Perea *et al.*, 2010 ; Seifertová *et al.*, 2012 ; Denys *et al.*, 2013).

Seifertová et al. (2012) ont estimé que ces deux lignées ont divergé l'une de l'autre durant le Pléistocène. Or, ils n'ont pas tenu compte de la taxonomie, considérant S. cephalus comme l'unique espèce en Europe, et par conséquent ont mal calibré leur datation en utilisant le plus ancien fossile de S. cephalus connu comme le plus ancien point de calibration. En réalité, ces deux lignées ont certainement divergé il y a environ 4 millions d'années (Doadrio & Carmona, 2003). S. laietanus appartient à la lignée nord-méditerranéenne sensu Denys et al. (2013) ou Egéenne sensu Durand et al. (2000), et qui aurait profité de la crise messinienne pour coloniser la Catalogne avant d'être isolée par le retour de la mer durant le Pliocène (Doadrio & Carmona, 2003; Sanjur et al., 2003). De son côté, S. cephalus est d'origine danubienne, et aurait profité de la période interglaciaire du Riss-Würm (-100 000 ans), de l'abaissement du niveau marin, de sa capacité potamodrome (de migration dans les eaux douces; Froese & Pauly, 2015), et de son aptitude à occuper un large éventail d'habitats (Tales et al., 2007) pour coloniser la France jusqu'à la fin du Würm, il y a 10 000 ans (Fig. 7.1b; Durand et al., 1999).

#### Les goujons

Au cours de cette thèse, nous avons corroboré l'existence de 3 espèces de goujons *Gobio* spp en France. Le goujon commun *Gobio gobio* est natif dans les bassins du Rhin, de la Meuse, de la Seine, de la Loire et du Rhône. *Gobio occitaniae* est présent dans les bassins de la Charente, de la Dordogne, de la Garonne, du Languedoc-Roussillon et de Catalogne (où la nativité n'est pas reconnue ; Aparicio *et al.*, 2013), et des versants Massif-Central des bassins de la Loire et du Rhône. Enfin, *Gobio lozanoi* est présent dans le bassin de l'Adour (Fig. 7.1b), mais également dans les bassins ibériques (Doadrio & Madeira, 2004 ; Geiger *et al.*, 2014). Néanmoins, des doutes subsistent quant à la nativité des populations ibériques (Madeira *et al.*, 2005).

Aucune étude phylogéographique n'a été publiée sur ce genre. Le genre *Gobio* était déjà présent en Europe à la fin du Miocène (Rutte, 1962). Notre travail montre que *Gobio occitaniae* et *Gobio lozanoi* ont probablement évolué à partir de ces premières populations. Kottelat et Persat (2005) estiment leur spéciation allopatrique et remontant aux glaciations.

Il est cependant intéressant de réaliser un calcul approximatif à l'aide de données moléculaires, une étude plus approfondie n'étant pas possible au cours de cette thèse. Sachant que nos travaux donnent pour les 2 espèces une divergence moyenne de 3,75% sur le COI, et que Zardoya et Doadrio (1999) ont estimé un taux d'évolution du cytochrome b de 0,76% par million d'années (Ma), nous avons calculé un rapport de taux de mutations COI/cytb de 70% à partir de nos génomes mitochondriaux complets obtenus sur plusieurs espèces de Gobio (données non publiés). Par conséquent, le taux d'évolution du COI serait de l'ordre de 0,53% par Ma. L'ancêtre commun entre G. occitaniae et G. lozanoi est donc estimé aux alentours de 7 Ma, et l'évènement vicariant se situerait à la fin du Miocène. La mer étant présente au Pliocène dans la vallée du Rhône (voir Fig. 6), ce qui pourrait expliquer pourquoi Gobio occitaniae est présent uniquement sur le versant Massif-Central. Ces résultats permettent de supposer que cette espèce aurait pu avoir une aire de répartition plus étendue, sur le bassin de la Loire voire de la Seine. Et ce, jusqu'à ce que les périodes glaciaires du Pléistocène éradiquent les populations au Nord de la Loire (Bănărescu, 1992; Kottelat & Persat, 2005). Gobio gobio appartient à une autre lignée, d'Europe centrale (Schreiber, 2002; Mendel et al., 2005, 2008; Šlechtová et al., 2005; Takács et al., 2014). Cette espèce serait arrivée durant la période interglaciaire du Riss-Würm (-100 000 ans), et aurait colonisé les bassins du Rhin, de la Meuse, de la Seine, du Rhône et de la Loire.

#### Les vairons

Grâce aux données génétiques et morphologiques dont les robes nuptiales, nous avons pu délimiter 6 espèces de vairons *Phoxinus* spp en France. *Phoxinus phoxinus* se trouve dans les bassins de la Meuse et Seine/Normandie, tandis que dans le Rhin, se trouve une autre espèce qui doit être revalidée, *Phoxinus marsilii. Phoxinus bigerii* est présent dans l'Adour et la Leyre. Enfin, *Phoxinus septimaniae* est présent dans les bassins méditerranéens ainsi que dans celui du Rhône (Fig. 7.1c).

Aucune étude phylogéographique n'a encore été publiée sur les vairons. Ce genre est présent en Europe depuis l'Oligocène (Reichenbacher & Weidmann, 1992; Mödden *et al.*, 2000). Les spéciations ont probablement eu lieu lors des différentes déconnections entre les bassins du Miocène au Pliocène. Contrairement aux goujons, les vairons sont suffisament cryophiles pour avoir pu résister aux différents épisodes glaciaires, et avoir trouvé des zones refuges à l'intérieur de ces bassins (Costedoat & Gilles, 2009).

L'abaissement du niveau de la mer durant le Pléistocène a pu permettre au *P. septimaniae* de conquérir les bassins côtiers méditerranéens. L'arrivée du *P. marsilii* dans le Rhin daterait de la dernière glaciation, lorsque le Rhin alpin s'est déconnecté du Danube pour se connecter au Rhin alsacien (Clauzon, 1999).

## Un taxon secondaire: les brochets

Les brochets *Esox* spp font parti des taxons secondaires car ils possèdent une certaine tolérance à la salinité (9 – 14 ppt; Jacobsen *et al.*, 2007), à tel point qu'il est rencontré en Mer Baltique (Froese & Pauly, 2015), voire le long des côtes à l'occasion de grandes crues de fleuves (Soldo, données non publiées). Un fossile de brochet a été retrouvé dans des fouilles archéologiques datant du Magdalénien supérieur (-15 000 ans) sur la côte basque espagnole (Roselló-Izquierdo *et al.*, 2015). Nous pensons que les brochets auraient pu coloniser certains bassins versants à l'occasion de crues augmentant le débit des rivières et réduisant la salinité aux embouchures et le long des côtes.

Nous avons listé trois espèces de brochets en France. *E. cisalpinus*, présent dans les lacs périalpins durant le XIXème siècle, n'est probablement pas natif. En revanche, *E. aquitanicus* est endémique des bassins de la Charente à l'Adour, et *E. lucius* est, quant à lui, natif dans les bassins du Rhin, de la Meuse, de la Seine, de la Loire, et de la Saône (Fig. 7.1d; Persat & Keith, 1997).

Skog *et al.* (2014) ont réalisé une étude phylogéographique d'*E. lucius* avec deux marqueurs mitochondriaux (cytochrome b et d-loop) et ont estimé les âges de divergence à partir du taux de mutation moyen des téléostéens (3% par Ma). Ils ont estimé une arrivée en Europe depuis l'Asie durant le Pléistocène (-260 000 ans). Ils ont également démontré l'existence de 3 lignées évolutives dont l'origine remonte à différentes périodes glaciaires : une nord-européenne, une sud-européenne (danubienne), et une lignée circumpolaire. Cependant, selon Grande (1999), les premiers fossiles de brochets du sous-genre *Esox* en Europe occidentale datent du Miocène moyen, et la découverte de nouvelles espèces, *E. aquitanicus* et *E. cisalpinus* (Bianco & Delmastro, 2011 ; Lucentini *et al.*, 2011 ; Denys *et al.*, 2014), change le scénario de l'arrivée des brochets en Europe. Nous avons retracé la phylogéographie des brochets de France à partir de génomes mitochondriaux complets (Hinsinger *et al.*, in prep). Notre datation moléculaire par calibration avec des fossiles de brochets estime leur arrivée en Europe par l'Est au Miocène moyen (Fig. 5.9),

probablement grâce au réchauffement climatique global (voir You et al., 2009). Puis, à la fin du Miocène, les brochets auraient profité de la très longue période de précipitations en Europe (Böhme et al., 2008) favorisant de très nombreuses crues de rivières pour coloniser le Sud-Ouest de la France, la séparation subséquente favorisant la spéciation d'E. aquitanicus. L'ancêtre commun entre E. cisalpinus et E. lucius est estimé au Pliocène supérieur, or la fin du Pliocène est marquée par le début des glaciations et l'Italie a été isolée du reste de l'Europe durant les épisodes glaciaires (Bianco, 1995), permettant une spéciation allopatrique. Puis, les différents épisodes glaciaires du Pléistocène ont façonné les différentes lignées d'E. lucius détectées par Skog et al. (2014). Durant un épisode interglaciaire, une des lignées s'est dispersée très rapidement en Amérique du Nord via le détroit de Béring (Senanan & Kapuscinski, 2000; Wooler et al., 2015), de même que E. aquitanicus aurait pu gagner le bassin de l'Adour durant cette période.

# Un taxon vicariant : l'épinoche

En France, il n'y a qu'une seule espèce d'épinoche *Gasterosteus aculeatus*, native dans tous les bassins Français et en Corse (Denys *et al.*, 2015). La phylogéographie de cette espèce a été largement étudiée (e.g. Ortí *et al.*, 1994; Mäkinen & Merilä, 2008; Lucek & Seehausen, 2015; Sanz *et al.*, 2015).

L'épinoche peut aussi bien vivre en eau douce qu'en eau de mer. Par conséquent, le milieu marin ne représente pas un obstacle à sa dispersion. La lignée ancestrale était marine (Bell & Foster, 1994; McKinnon & Rundle, 2002). Elle est arrivée en Atlantique depuis le Pacifique il y a entre 90 000 et 260 000 ans (Ortí *et al.*, 1994; Mäkinen & Merilä, 2008; Lucek & Seehausen, 2015). Puis, entre la fin du Pléistocène et le début de l'Holocène (-15 000 à -10 000 ans) sont apparues les premières formes dulçaquicoles (Bell & Foster, 1994; McKinnon & Rundle, 2002). A partir de là, des colonisations multiples de la mer vers les rivières ont eu lieu (Mäkinen *et al.*, 2006).

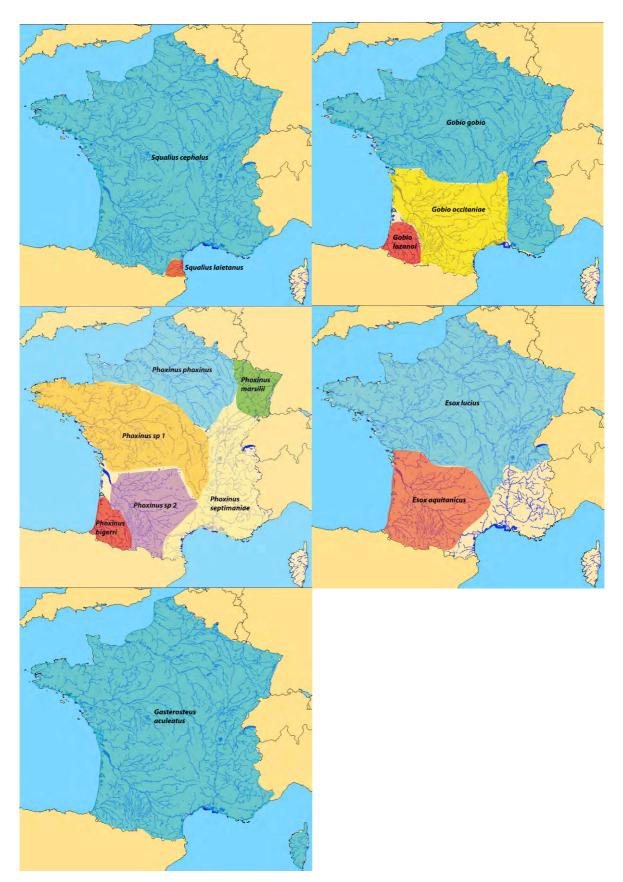


Figure 7.1 : Cartes de répartition actuelle des populations natives des 5 genres étudiés lors de cette thèse : les chevesnes *Squalius* spp (a), les goujons *Gobio* spp (b), les vairons *Phoxinus* spp (c), les brochets *Esox* spp (d) et l'épinoche *Gasterosteus aculeatus* (e).

# Etat actuel de nos connaissances sur l'ichtyofaune française

Cette thèse a permis de montrer de grandes lacunes dans nos connaissances sur l'ichtyofaune dulçaquicole de France pour ces cinq genres, notamment par rapport aux ouvrages de Kottelat et Freyhof (2007) et Keith *et al.* (2011) (Tabl. 7.1).

Par ailleurs, à la lueur de nos travaux, il est intéressant de revoir rapidement les connaissances actuelles sur d'autres genres de l'inventaire de Kottelat et Freyhof (2007), pour évaluer si ces problèmes sont présents également pour d'autres groupes.

Dans le cas des corégones, de fortes variabilités morphologiques ont été observées (e.g. Fatio, 1888 a et b, 1890; Jurine, 1825; Dottrens & Quartier, 1949; Dottrens, 1950; Spillmann, 1958), au point que Kottelat et Freyhof (2007) considèrent 5 espèces de corégones en France: *Coregonus lavaretus* (Linnaeus, 1758), *C. fera* Jurine, 1825, *C. hiemalis* Jurine, 1825, *C. palaea* Cuvier, 1829 et *C. bezola* Fatio, 1888. Or les travaux en moléculaire ne distinguent pas les différentes espèces décrites en France (Østbye *et al.*, 2005). Spillmann (1961) affirme que les deux espèces sympatriques *C. fera* et *C. hiemalis* avaient des lieux et des périodes de pontes différentes. Or, ces deux espèces sont éteintes (Kottelat & Freyhof, 2007) et les populations actuelles du Léman sont issues des alevinages intensifs de *C. « palaea »* provenant du lac de Neuchâtel depuis 1923 (Spillmann, 1961; Kottelat & Freyhof, 2007). En l'absence d'informations supplémentaires, il ne resterait qu'une seule espèce de corégone en France *Coregonus lavaretus* (Linnaeus, 1758).

Kottelat et Freyhof (2007) distinguent 3 espèces de truites en France : *Salmo trutta* Linnaeus, 1758 dans les bassins Atlantique, Manche, Mer du Nord, *S. rhodanensis* Fowler, 1974 dans les bassins méditerranéens, et *Salmo cettii* Rafinesque, 1810 en Corse. Or la truite rhodanienne « *Salmo rhodanensis* » appartient à la même lignée évolutive que la truite de rivière *Salmo trutta* qui s'est différenciée de la lignée atlantique il y a 10 000 – 15 000 ans (Hamilton *et al.*, 1989 ; García-Marín *et al.*, 1999 ; Bernatchez, 2001), et ne serait donc pas une espèce différente. En revanche, la truite corse appartient à une lignée évolutive adriatique, plus ancienne et différente de *S. trutta* (Bernatchez, 2001 ; Schöffmann *et al.*, 2007 ; Berrebi, 2015). Plusieurs auteurs l'ont attribué à *S. cettii* (Kottelat & Freyhof, 2007 ; Bianco, 2014 ; Gratton *et al.*, 2014). Cependant, Kottelat et Freyhof (2007) concluent que l'attribution du nom *S. cettii* n'est pas certaine et que *Salmo ghigii* Pomini, 1941 serait plus adéquat. Bianco (2014) considère *S. ghigii* comme

synonyme de *Salmo farioides* Karaman, 1938 qui est valide. Des études complémentaires sont nécessaires, en attendant la truite corse pourrait être *Salmo cf cettii*.

Pour les vandoises *Leuciscus* spp, Kottelat et Freyhof (2007) retiennent 4 espèces : *Leuciscus leuciscus* (Linnaeus, 1758), *L. bearnensis* (Blanchard, 1866), *L. burdigalensis* Valenciennes, 1844, *L. oxyrrhis* (La Blanchère, 1873), mais les différentes analyses génétiques réalisées ne séparent que 2 espèces : *L. leuciscus* (bassins du Rhône, Rhin et Seine), et *L. burdigalensis* (bassins de la Loire, Garonne, Adour, et Languedoc-Roussillon) (Chappaz *et al.*, 1998 ; Costedoat *et al.*, 2006).

Pour les chabots Cottus spp, 8 espèces sont listées par Kottelat et Freyhof (2007) : Cottus gobio Linnaeus, 1758, C. petiti Bacescu & Bacescu-Mester, 1964, C. hispaniolensis Bacescu & Bacescu-Mester, 1964, C. aturi Freyhof et al., 2005, C. perifretum Freyhof et al., 2005, C. rhenanus Freyhof et al., 2005, et C. rondeleti Freyhof et al., 2005 (Freyhof et al., 2005; Kottelat & Freyhof, 2007; Keith et al., 2011a). Des études génétiques semblent soutenir les délimitations d'espèces (Eppe et al., 1999; Englbrecht et al., 2000; Follot, 2001; Volckaert et al., 2002; Knapen et al., 2003; Nolte et al., 2005; Sonnenberg et al., 2007). Mais Geiger et al. (2014) ont trouvé très peu de différences génétiques entre C. gobio, C. petiti et C. rondeleti, tandis que Persat et al. (1996) ont noté des différences entre C. petiti et C. gobio en ce qui concerne la reproduction. Enfin, les croisements entre C. perifretum x C. rhenanus produisent un hybride qui ne se reproduit pas avec les espèces parentales (Nolte et al., 2005, 2006, 2009; Stemshorn et al., 2011). Sideleva (2009) a décrit une autre espèce de chabot Cottus sabaudicus sur des caractères morphologiques et qui n'existerait qu'en Savoie, qui n'a pas été étudiées sur des données moléculaires. Mais en l'absence de données complémentaires, nous ne pouvons pas considérer cette espèce comme valide. Ainsi, nous considérons pour le moment les 8 espèces de Kottelat et Freyhof (2007). Néanmoins, une révision taxonomique de type intégratif est nécessaire afin de valider chacune d'entre elle.

En ce qui concerne les loches franches *Barbatula* spp, Kottelat et Freyhof (2007) distinguent *Barbatula barbatula* (Linnaeus, 1758) et *B. quignardi* (Băcescu-Mester, 1967) sur des caractères uniquement morphologiques pour l'instant peu convaincants. Or, aucune analyse génétique ni biogéographique n'ont été publiées. Par conséquent, nous ne considérons qu'une seule espèce pour le moment : *Barbatula barbatula*. En revanche, les dernières études en génétique ont montré la possibilité d'avoir plusieurs espèces non

décrites au sein du genre en Europe (Šedivá *et al.*, 2008 ; Knebelsberger *et al.*, 2015). Une révision taxonomique des loches franches est par conséquent nécessaire.

Pour les épinochettes *Pungitius* spp, Kottelat & Freyhof (2007) considèrent la présence ou l'absence de carène sur le pédoncule caudal comme critère taxonomique. Ils discriminent ainsi deux espèces en Europe : *Pungitius pungitius* (Linnaeus, 1758) avec une carène et présente de l'Allemagne à l'Europe de l'Est, et *Pungitius laevis* (Cuvier, 1829) sans carène et présente en Europe de l'Ouest. Or, une récente étude génétique réalisée sur des individus identifiés morphologiquement a démontré, d'une part, l'existence de 3 groupes distincts de *Pungitius* spp en France (un dans le Nord de la France correspondant à *P. pungitius*, un deuxième sur la bassin de la Loire, et un dernier dans les bassins Atlantique), mais ce travail a aussi montré la polyphylie de *P. laevis*, et que la présence ou l'absence de carène sur le pédoncule caudal n'était pas un critère taxonomique (Wang *et al.*, 2015). Ces différentes lignées évolutives auraient divergé durant le Pléistocène (Wang *et al.*, 2015). Une révision taxonomique sur des caractères morphologiques et écologiques est alors nécessaire. Dans l'attente, nous ne considérons qu'une seule espèce d'épinochette *P. pungitius*.

Comme on peut le voir, les autres genres nécessitent également un travail de taxonomie intégrative, et révélant potentiellement des espèces supplémentaires ou en moins.

Enfin, des éléments nouveaux en nomenclature et en extension d'aires de distributions d'espèces arrivées en France ont également été apportés par rapport à l'atlas de Keith *et al.* (2011a) (Manné, comm. pers. ; Manné *et al.*, 2013 ; Perea *et al.*, 2010 ; Thiret, comm. pers.).

Une synthèse de toutes les espèces de poissons d'eau douce de France, avec leur répartition est donnée en Tableau 7.2, ceci devrait constituer la nouvelle base du référentiel des poissons d'eau douce de France.

Ainsi, cette thèse constitue à ce jour le dernier inventaire de l'ichtyofaune d'eau douce de France qui compte 108 espèces : 72 sont natives dont 14 endémiques, et 36 ont été introduites ou arrivées en France par extension de leur aire de distribution. Ce nombre va très probablement s'accroître avec la révision taxonomique de l'ensemble des taxons présents en France.

# Impacts sur la conservation

La synthèse du Tableau 7.2 nous permet de confirmer que les plus grands bassins (Seine, Adour, Rhône, Loire, Dordogne/Garonne) sont ceux pour lesquels les richesses spécifiques sont les plus élevées (Fig. 7.3a) (voir pour les explications, Hugueny et al., 2010). En revanche, les bassins de la moitié sud de la France présentent les plus faibles proportions en espèces natives (31 à 48%; Fig 7.3b). Alors que ces mêmes bassins sont ceux qui possèdent les taux d'endémicité les plus élevés (14 à 29% par rapport aux espèces natives ; Fig. 7.3c), car ils ont été préservés des épisodes glaciaires du Pléistocène (Oberdorff et al., 1995, 1999; Tedesco et al., 2011). Or, ces bassins ont un fort taux d'espèces introduites et les conséquences de ces introductions peuvent être désastreuses (e.g. Crivelli, 1995; Gozlan et al., 2010; Cucherousset & Olden, 2011; Ribeiro & Leunda, 2012; Tricarico, 2012). En effet, outre les compétitions interspécifiques et les prédations (Almeida & Grossman, 2012), l'introduction d'espèces non-natives peut aller de paire avec celle de maladies ou de parasites ayant un impact sur les populations natives (e.g. Gozlan et al., 2010; Cucherousset & Olden, 2011; Ribeiro & Leunda, 2012). Par exemple, le copépode parasite Tracheliastes polycolpus (von Norman, 1832) qui impacte fortement la vandoise rostrée L. burdigalensis (e.g. Loot et al., 2004) ainsi que d'autres Cyprinidés du Sud-Ouest de la France (Lootvoet et al., 2013), a été introduit en 1920 dans le centre de la France avec l'introduction de l'ide mélanote L. idus (Rey et al., 2015). Mais la principale menace est l'hybridation et l'introgression (e.g. Berrebi, 1997; Gozlan et al., 2010 ; Cucherousset & Olden, 2011 ; Ribeiro & Leunda, 2012). Nos différentes études sur les chevesnes, goujons et brochets ont montré qu'il n'y avait pas de barrière complète à la reproduction entre les différentes espèces. Or, l'introduction massive d'individus d'espèces distinctes capables de s'hybrider avec les populations natives, peut entraîner une fréquence suffisamment importante d'allèles allospécifiques susceptibles pour prendre le dessus sur les allèles natifs (Hubbs, 1955; Molofsky et al., 2001). C'est ainsi que les populations de barbeaux méridionaux Barbus meridionalis et de toxostomes Parachondrostoma toxostoma sont menacés par respectivement le barbeau fluviatile Barbus barbus et le hotu Chondrostoma nasus (Crespin & Berrebi, 1994; Costedoat et al., 2004, 2005, 2007), tout comme le brochet aquitain E. aquitanicus si l'on continue de repeupler les bassins du Sud-Ouest de la France avec de l'E. lucius. Les introgressions peuvent avoir une importance évolutive, pouvant aller jusqu'à la disparition d'espèces endémiques voire à la formation d'espèces nouvelles (Berrebi, 1997; Nolte & Tautz, 2010; Abbott *et al.*, 2013).

Il est par conséquent important d'appliquer un système de gestion adapté, et ce par bassin

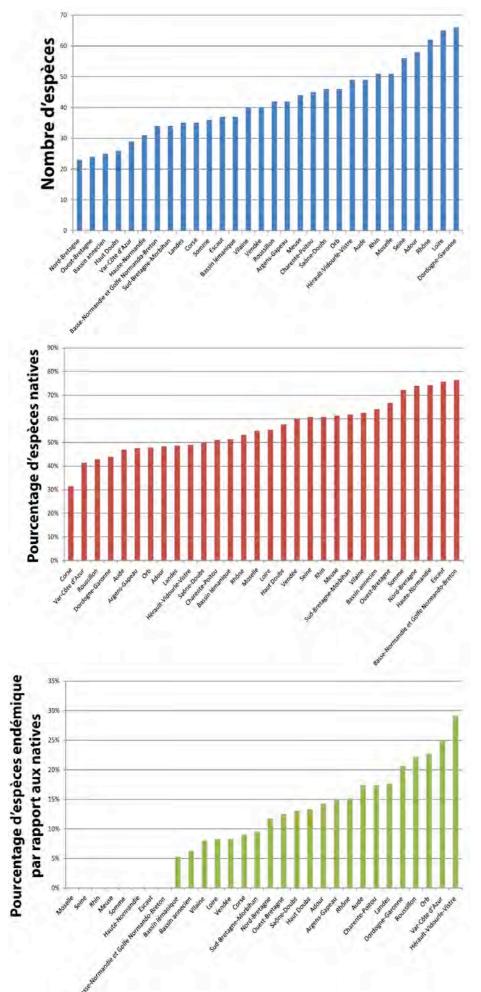
La gestion de l'environnement ne serait pas possible sans des études en écologie, qui ne seraient également pas possibles sans taxonomie. Cette base scientifique fait la robustesse des sciences en biologie (May, 1990; Bortolus, 2008). Tous les acteurs, du scientifique au gestionnaire en passant par le pêcheur amateur, doivent prendre en compte les travaux en taxonomie. La non-prise en compte des résultats de la taxonomie, qui délimitent l'objet d'étude des autres disciplines et de la gestion, peut augmenter considérablement le risque d'erreur pour les études en écologie, en gestion et en socioéconomie (Bortolus, 2008), et peut même résulter dans la disparition d'espèces natives et endémiques (e.g. Geller, 1999). Nous avons démontré chez les goujons que les différentes espèces avaient des propriétés écologiques qui leur étaient propres (chapitre 6). Par conséquent, les indices biotiques tels que les indices Poisson Français (IPR; Oberdorff et al. 2002) et Européen (EFI; Pont et al. 2007) doivent être réactualisés. Les études en écologie doivent considérer les différentes espèces récemment décrites ou revalidées, pour permettre ainsi une meilleure gestion et/ou la conservation (Hey et al., 2003; Mace, 2004; Dudgeon et al. 2006).

Il sera aussi nécessaire de ré-évaluer rapidement le statut de chacune des espèces de poissons de France étudiée dans cette thèse dans le cadre de la Liste rouge des espèces menacées (Collares-Pereira *et al.*, 2002 ; Keith & Marion, 2002), pour ensuite, rétablir des priorités pour des mesures de conservation de cette diversité spécifique à sans conteste un intérêt patrimonial (Maire *et al.*, 2013 ; Maire, 2014).

La protection et la gestion des habitats nécessaires à ces espèces est aussi une priorité. Maire *et al.* (2013) suggère d'agir en priorité sur les plaines inondables des parties aval des bassins versants, ce qui s'est avéré efficace dans le Pas-de-Calais (Maire *et al.*, 2015). Cette mesure est en effet nécessaire pour la conservation du brochet par exemple. La protection des têtes de bassin sera primordiale dans d'autres cas comme pour les goujons ou les vairons. Si la conservation des habitats est importante, la conservation du patrimoine génétique l'est aussi (e.g. Crispo *et al.*, 2011; Pauls *et al.*, 2014). La création des canaux, et surtout les alevinages et repeuplements à partir de populations non-natives (pouvant être aussi d'autres espèces), ont des incidences sur les populations natives. En

effet, nous avons pu constater que dans le Sud-Ouest de la France, les repeuplements de goujons (*Gobio* ssp) et de brochets (*E. lucius*) étaient fréquents, alors qu'il faudrait éviter pour protéger les espèces natives sont *G. occitaniae*, *G. lozanoi* (dans l'Adour) et *E. aquitanicus*. Certaines stations présentaient des cas d'hybridation, avec des individus ayant des allèles de plusieurs espèces. Nous recommandons fortement aux gestionnaires de privilégier la production locale en vue des repeuplements, de la gérer en circuit fermé à l'échelle des bassins d'origine (Keith *et al.*, 2011a), et de protéger les cours d'eau dans lesquels l'activité humaine n'a pas encore influé sur le peuplement ichtyologique.

L'année 2010 fut l'année internationale de la biodiversité, et c'est aux alentours de celle-ci que nous avons vraiment pris conscience de la richesse taxonomique des bassins versants français. Cette richesse pourrait être encore plus élevée si on généralisait la révision taxonomique à l'ensemble des taxons natifs. Pendant des décennies, notre manque de connaissances sur l'ichtyofaune de France a pénalisé la mise en place de mesures adaptées pour protéger des espèces pourtant endémiques et patrimoniales. La mise en place d'une politique de gestion par bassin est nécessaire si nous voulons avoir plus de chance de préserver plus de 20 millions d'années d'histoire évolutive locale.



**Figure** 7.3: Histogrammes représentant le nombre d'espèces de poissons d'eau douce présentes dans les différents bassins et sousbassins de France métropolitaine (a), ainsi que les pourcentages en espèces natives (b), pourcentages espèces en endémiques françaises par rapport aux natives (c). Les valeurs sont triées par ordre croissant.

Tableau 7.2: Tableau listant les différentes espèces de poissons d'eau de France avec leurs distributions suivant les données de Keith *et al.* (2011a) et de cette thèse: native (N), endémique (E), introduite (I), statut ou présence à vérifier (?). Les nominations des bassins et sous-bassins suivent celles de Persat et Keith (1997): Rhin (30), Moselle (304), Meuse (305), Escaut (33), Seine (40), Basse-Normandie et Golfe Normando-Breton (41), Haute-Normandie (42), Somme (43), Nord-Bretagne (45), Ouest-Bretagne (46), Loire (60), Sud-Bretagne-Morbihan (61), Vilaine (62), Vendée (63), Charente-Poitou (64), Dordogne-Garonne (70), Landes (71), Adour (72), Rhône (50), Bassin lémanique (501), Bassin annecien (502), Haut Doubs (503), Saône-Doubs (504), Hérault-Vidourle-Vistre (51), Orb (52), Aude (53), Roussillon (54), Argens-Gapeau (57) et Var-Côte d'Azur (58).

													P	rovir	ices t	oiogé	ogra	phiqu	ues								_			
Taxons		hin – l Mer di				Sei	ne - l	Man	che			èvre		tagne rtaise nte			dour				Rhôn	ne			Ba	ssins	méd	literra	ınéens	5
	30	304	305	33	40	41	42	43	45	46	60	61	62	63	64	70	71	72	50	501	502	503	504	51	52	53	54	57	58	Corse
Petromyzontidae																														
Petromyzon marinus Linnaeus, 1758	N			N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N						N	N	N		N		
Lampetra fluviatilis (Linnaeus, 1758)				N	N	N	N	N			N				N	N	N	N												
Lampetra planeri (Bloch, 1784)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N				N							
Acipenseridae																														
Acipenser sturio Linnaeus, 1758																N														
Acipenser baerii Brandt, 1869					I						I	I				I			I	I										
Acipenser ruthenus Linnaeus, 1758																I								I						
Anguillidae																														
Anguilla anguilla (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			?	N	N	N	N	N	N	N
Clupeidae																														
Alosa alosa (Linnaeus, 1758)	N				N	N				N	N	N	N		N	N		N												
Alosa fallax (Lacépède, 1803)											N	N	N		N	N		N	N					N	N	N	N	N		N
Cyprinidae																														
Rhodeus amarus (Bloch, 1782)	N	N	N	N	N			N			I		I			I		I	Ι				I	I		I				
Gobio gobio (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	?	I		I	N	N	N	N	N	I	I	I	I	N	N	I
Gobio lozanoi Doadrio & Madeira, 2004																I		N								I				
Gobio occitaniae Kottelat & Persat, 2005											?				E	Е	E	I	Е					Е	E	E	E			I
Romanogobio belingi (Slastenenko, 1934)	?																													
Pseudorasbora parva (Temminck & Schlegel, 1846)	I	I	I	I	I						I					I		I	I				I	I	I	I		I		
Barbus barbus (Linnaeus, 1758)	N	N	N		N			N			N			N	N	?		?	N	N	N		N	N	N	N		N	N	
Barbus meridionalis Risso, 1827																Е			Е					Е	E	E	E	E	E	

Carassius auratus (Linnaeus, 1758)	Ιī	ī	ī	ī	Ιī			ī			ı			ī	ī	Ιī	I	т	Ιī	ī		ī	I	Ιī	Ī	ī	I	ī	ī	ī
Carassius carassius (Linnaeus, 1758)	I	Ī	Ī	Ī	I			Ī			I			I	I	I	Ī	Ī	ī	Ī		Ī	Ī	I	Ī	Ī	Ī	Ī	Ī	Ī
Carassius gibelio (Bloch, 1782)	I	I	I	I	I			I			I			I	I	I	I	I	I	I		I	I	I	I	I	I	I	I	I
Cyprinus carpio Linnaeus, 1758	I	I	Ι	Ι	Ι	Ι	Ι	Ι		Ι	I	Ι	Ι	Ι	Ι	I	Ι	Ι	I	I		I	Ι	I	Ι	Ι	Ι	I	I	I
Abramis brama (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
Ballerus sapa (Pallas, 1814)	I																													
Blicca bjoerkna (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N			N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
Alburnoides bipunctatus (Bloch, 1782)	N	N	N		N						N	N	N			Ι			N	N	N		N	I		Ι		Ι		
Alburnus alburnus (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N		
Chondrostoma nasus (Linnaeus, 1758)	N	N	N		N						N								N				N	N						
Parachondrostoma toxostoma (Vallot, 1837)											I				I	N		N	N				N	N	N	N				
Ctenopharyngodon idella (Valenciennes, 1844)	I	I			Ι		Ι				I		Ι			I		Ι	I				Ι				Ι	I		
Hypophthalmichthys molitrix (Valenciennes, 1844)					Ι						I							Ι					Ι							
Hypophthalmichthys nobilis (Richardson, 1845)											I																			
Leucaspius delineatus (Heckel, 1843)	I	Ι	I	I	I	I	I	Ι	I		I	Ι	Ι	Ι	Ι	I		Ι	I				I							
Squalius cephalus (Linnaeus, 1758)	N	N	N		N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	I	N	N	I
Squalius laietanus Doadrio, Kottelat & de Sostoa, 2007																											N			
Leuciscus aspius (Linnaeus, 1758)	I	I	Ι		Ι						I																			
Leuciscus burdigalensis Valenciennes, 1844									Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е						Е	Е	Е	Е			
Leuciscus idus (Linnaeus, 1758)	I	I	I		I						I		I						I				I							
Leuciscus leuciscus (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N											N			N	N	N						
Pachychilon pictum (Heckel & Kner, 1858)																I		I							I					
Phoxinus phoxinus (Linnaeus, 1758)			N	N	N	N	N																							I
Phoxinus bigerri Kottelat, 2007																	N	N							I					
Phoxinus septimaniae Kottelat, 2007																			Е	?	?	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	
Phoxinus marsilii Heckel, 1836	N	N																												
Phoxinus sp.1									Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е															
Phoxinus sp.2																Е														
Pimephales promelas Rafinesque, 1820			I								I																			I
Rutilus rutilus (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N	I	Ι	N	I	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	I	I	I
Scardinius erythrophthalmus (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	I	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		I
Telestes souffia (Risso, 1827)					I													Е	Е	E	E	Е	E	Е				Е	Е	
Telestes muticellus (Bonaparte, 1837)																													N	
Vimba vimba (Linnaeus, 1758)	I																													
Tinca tinca (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		I
Neimacheilidae																														
Barbatula barbatula (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
Cobitis bilineata Canestrini, 1865																			I											
Cobitis taenia Linnaeus, 1758	N	N	N	N	N						N								I											

Misgurnus fossilis (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	N					ĺ	N								N					I						
Ictaluridae																														
Ameiurus melas (Rafinesque, 1820)	I	I		I	Ι			I			I			I	I	I	I	I	I	I			I			I	I	I		I
Siluridae																								1						
Silurus glanis Linnaeus, 1758	I	I	I		I	I					I		I	I	I	I		I	I	I		I	I	I	I	I	I	I		I
Esocidae																														
Esox lucius Linnaeus, 1758	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	I	I	I	I	N	N	N	N	N	I	I	I	I	I		I
Esox aquitanicus Denys et al., 2014															Е	Е	E	Е												
Esox cisalpinus Bianco & Delmastro, 2011																				I	I									
Umbra pygmaea (De Kay, 1842)					I																									
Osmeridae																														
Osmerus eperlanus (Linnaeus, 1758)						N					N					N		N												
Salmonidae																														
Salmo salar Linnaeus, 1758	N	I	I	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			N		N												
Salmo trutta Linnaeus, 1758	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	I N	N	N	I
Salmo cf. cettii Rafinesque, 1810																														E
Oncorhynchus mykiss (Walbaum, 1792)	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Salvelinus fontinalis (Mitchill, 1814)		I	I		I		I				I		I			I	I	I	I		I		I			I			I	I
Salvelinus namaycush (Walbaum, 1792)											I					I		I	I										I	
Salvelinus umbla (Linnaeus, 1758)		I														I		I	I	N	N								I	
Hucho hucho (Linnaeus, 1758)																				I			I							
Thymallus thymallus (Linnaeus, 1758)	N	N	N		I						N					I		I	N	N	N	N	N			I				
Coregonus lavaretus (Linnaeus, 1758)	N	I														I		N	N	N										
Gadidae																														
Lota lota (Linnaeus, 1758)	N	N	N		N						N								N	N	N		N							
Atherinidae																														
Atherina boyeri Risso, 1810											N			N		N			N					N	N	N	I N	N	N	N
Cyprinodontidae																														
Aphanius fasciatus (Valenciennes, 1821)																														N
Aphanius iberus (Valenciennes, 1846)																										?	?			
Gambusia holbrooki Girard, 1859												I	I	I	I	I	I	I	I					I	I	I		I		I
Valencia hispanica (Valenciennes, 1846)																								╙			?			
Gasterosteidae																														
Gasterosteus aculeatus Linnaeus, 1758	N	N	N	N	N			N	N	N		N	N	N	N	N		N	N	?	?		N	N	N	N	I N	N	N	N
Pungitius pungitius (Linnaeus, 1758)		N	N	N	N	N	N				N			N	N	N							N	丄						
Mugilidae																														
Chelon labrosus (Risso, 1827)					N						N		N	N	N	N	N	N	N					N		N			N	N
Liza aurata (Risso, 1810)				N				N											N					N	N	N		N		N

Liza ramada (Risso, 1827)				N	N	N		N	N		N	N	N	N	N	N		N	N					N	N	N	N	N	N	N
Mugil cephalus Linnaeus, 1758																		N	N					N	N	N	N	N		N
Percidae																														
Gymnocephalus cernua (Linnaeus, 1758)	N	N	N	N	I	I		I			I	I	I	I	I	I	I		I	I		I	I	I	I		I	I		I
Perca fluviatilis Linnaeus, 1758	N	N	N	N	N	N	N	N	N :	N	N	N	N	N	?	I	I	I	I	I	I	N	N	I	I	I	I	I	I	I
Sander lucioperca (Linnaeus, 1758)	I	I	I	I	I	I	I	I		I	I	I	I	I	I	I	I	I	I			I	I	I	I	I	I	I		I
Zingel asper (Linnaeus, 1758)																			E				E							
Centrarchidae																														
Ambloplites rupestris (Rafinesque, 1817)											I																			
Lepomis gibbosus (Linnaeus, 1758)	I	I	I		I	I	I	I			I	I	I	I	I	I	I	I	I	I			I	I	I	I	I	I	I	
Micropterus salmoides (Lacépède, 1802)		I			I					I	I		I	I	I	I	I	I	I				I	I	I	I	I	I	I	
Blennidae																														
Salaria fluviatilis (Asso, 1801)																I			N	I	I					N	N	N	N	N
Gobiidae																														
Pomatoschistus microps (Kroyer, 1838)											N			N		N	N	N	N					N	N	N	N		N	N
Pomatoschistus minutus (Pallas, 1770)					N			N			N		N	N	N	N		N												
Neogobius fluviatilis (Pallas, 1814)		I																												
Neogobius melanostomus (Pallas, 1814)	I	I																												
Ponticola kessleri (Günther, 1861)	I	I																												
Proterorhinus semilunaris (Heckel, 1837)	I																													
Cottidae																														
Cottus aturi Freyhof, Kottelat & Nolte, 2005																		Е												
Cottus duranii Freyhof, Kottelat & Nolte, 2005											E					Е														
Cottus gobio Linnaeus, 1758	N																		N	N	N	N	N	?	?	?			?	
Cottus hispaniolensis Bacescu & Bacescu-Mester, 1964																N														
Cottus perifretum Freyhof, Kottelat & Nolte, 2005		?	?	N	N	N	N	N	N :	N	N	N	N	N	N	N														
Cottus petiti Bacescu & Bacescu-Mester, 1964																								Е						
Cottus rhenanus Freyhof, Kottelat & Nolte, 2005		N	?																											
Cottus rondeleti Freyhof, Kottelat & Nolte, 2005																								Е	Е					
Pleuronectidae																														
Platichthys flesus (Linnaeus, 1758)				N	N	N	N	N	N :	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N					N	N	N	N			

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABBOTT R., ALBACH D., ANSELL S., ARNTZEN J.W., BAIRD S.J.E., BIERNE N., BOUGHMAN J., BRELSFORD A., BUERKLE C.A., BUGGS R., BUTLIN R.K., DIECKMANN U., EROUKHMANOFF F., GRILL A., CAHAN S.H., HERMANSEN J.S., HEWITT G., HUDSON A.G., JIGGINS C., JONES J., KELLER B., MARCZEWSKI T., MALLET J., MARTINEZ-RODRIGUEZ P., MÖST M., MULLEN S., NICHOLS R., NOLTE A.W., PARISOD C., PFENNIG K., RICE A.M., RITCHIE M.G., SEIFERT B., SMAJDA C.M., STELKENS R., SZYMURA J.M., VÄINÖLÄ R., WILF J.B.W. & ZINNER D., 2013. Hybridization and speciation. *J. Evol. Biol.*, 26: 229-246.
- ACLOQUE A., 1896-1900. Faune de France, contenant la description des espèces indigènes, disposées en tableaux analytiques, et illustrée de figures représentant les types caractéristiques des genres. 4 vol. Paris : J.B. Baillière et fils.
- AGAPOW P.-M., BININDA-EMONDS O.R.P., CRANDALL K.A., GITTLEMAN J.L., MACE G.M., MARSHALL J.C. & PURVIS A., 2004. The Impact of Species Concept on Biodiversity Studies. *Q. Rev. Biol.*, 79: 161-179.
- AGASSIZ L., 1833-1844. Recherches sur les poissons fossiles. 5 vol. Neuchâtel: Petit-Pierre.
- ALLARDI J. & KEITH P., 1991. Atlas préliminaire des poissons d'eau douce de France. 232 p. Paris : Publications scientifiques du Muséum national d'histoire naturelle.
- ALLARDI J., KEITH P. & MAURIN H., 1997. Inventaire de distribution des poissons d'eau douce de France. *Cybium*, 21: 7-15.
- ALLGAYER R., 1991. Un naturaliste et son oeuvre oublié: Léonard Baldner (1612-1694). *Rev. Fr. Aqua.*, Supplément 1. 12 p.
- ALMEIDA D. & GROSSMAN G.D., 2012. Utility of direct observational methods for assessing competitive interactions between non-native and native freshwater fishes. *Fisheries Manag. Ecol.*, 19: 157-166.
- ALVAREZ W., COCOZZA T. & WEZEL F.C., 1974. Fragmentation of the Alpine orogenic belt by microplate dispersal. *Nature*, 248: 309-314.
- AMUNDSEN T. & FORSGREN E., 2001. Male mate choice selects for female coloration in a fish. PNAS, 98: 13155-13160.
- ANDERSSON L., 1990. The driving force: Species concepts and ecology. *Taxon*, 39: 375–382
- ANDREW R.L., BERNATCHEZ L., BONIN A., BUERKLE C.A., CARSTENS B.C., EMERSON B.C., GARANT D., GIRAUD T., KANE N.C., ROGERS S.M., SLATE, J., SMITH H., SORK V.L., STONE G.N., VINES T.H., WAITS L., WIDMER A. & RIESEBERG L.H., 2013. A road map for molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 22: 2605-2626.
- ANGEL F., 1948. Petit atlas des poissons. Tome III. Poissons des eaux douces, espèces françaises. 137 p. Paris: N. Boubée.
- ANTOINE P., COUTARD J.P., GIBBARD P., HALLEGOUET B., LAUTRIDOU J.-P. & OZOUF J.-C., 2003. The Pleistocene rivers of the English Channel region. *J. Quaternary Sci.*, 18: 227-243.
- APARICIO E., CARMONA-CATOT G., KOTTELAT M., PEREA S. & DOADRIO I., 2013. Identification of Gobio populations in the northeastern Iberian Peninsula: first record of the non-native Languedoc gudgeon Gobio occitaniae (Teleostei, Cyprinidae). *BioInvasions Rec..*, 2: 163-166.
- APRIL J., MAYDEN R.L., HANNER R.H. & BERNATCHEZ L., 2011. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA*, 28: 10602-10607.

- ARGAND E., 1924. La tectonique de l'Asie. *In*: Comptes Rendus du 13<sup>ème</sup> Congrès Géologique International. pp. 171-372. Paris: Congrès géologique international.
- AUSONIUS D.M., 310-333. The Mosella. Traduit en anglais par E.H. Blakeney (1933). 74 p. London: Eyre and Spottiswoode.
- AVISE J.C., 1975. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Biol., 23: 465-481.
- AVISE J.C., 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. 511 p. New York: Chapman & Hall.
- AVISE J.C. & BALL R.M., 1990. Principles of genealogical concordance in species species concepts and biological taxonomy. *Oxf. Surv. Evol. Biol.*, 7: 45-67.

#### B

- BAKKER T.C.M. & SEVENSTER P., 1988. Plate Morphs of *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus (Pisces: Gasterosteidae): Comments on Terminology. *Copeia*, 3: 659-663.
- BALDNER L., 1666. Recht naturlische Beschreibung und Abmahlung der Wasservögel, Fischen, Vierfüssigen Tiere, Inseketen und Gwürl so beo Strasburg in den Wasserne seynt, die Ich selbst geschossen, und die Pisch gefangen auch alles in meiner Handt gehabt. Manuscrit, Strassburg.
- BĂNĂRESCU P., 1960. Einige Fragen zur Herkunft und Verbreitung der Süsswasserfischfauna der Europäisch-mediterranen Unterregion. *Arch. Hydrobiol.*, 57: 16-134.
- BĂNĂRESCU P., 1990. Zoogeography of freshwater. General distribution and dispersal of freshwater animals. Tome I. 511 p. Wiesbaden: Aula Verlag.
- BĂNĂRESCU P., 1992. Zoogeography of freshwater. Distribution and dispersal of freshwater animals in North America and Eurasia. Tome II. pp. 519-1091. Wiesbaden: Aula Verlag.
- BĂNĂRESCU P., 1999. The Freshwater fishes of Europe. Vol. 5, part 1, Cyprinidae vol. 2, part 1: *Rhodeus* to *Capoeta*. 426 p. Wiesbaden: AULA-Verlag,
- BĂNĂRESCU P. & NALBANT T.T., 1973. Pisces, Teleostei. Cyprinidae (Gobioninae). *Das Tierreich*, 93: 1-304.
- BĂNĂRESCU P. & COAD B.W., 1991. Cyprinids of Eurasia. *In*: Cyprinid Fishes Systematics, biology and exploitation, Fish and Fisheries (I.J. Winfield & J.S. Nelson, Eds.). Series 3. pp 127-155. London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall.
- BĂNĂRESCU P. & PAEPKE H.-J., 2002. The freshwater fishes of Europe. Cyprinidae 2, Part III: *Carassius* to *Cyprinus*. Gasterosteidae. 305 p. Wiesbaden: Aula-Verlag.
- BARBELLION P., 1952. La pêche au lancer. *In*: Le grand livre de la pêche et des poissons (E. Dottrens & T. Burnand, Eds.). pp. 189-216. Monaco: Union européenne d'éditions; Paris, Bruxelles, Genève, Zurich: R. Kister & G. Schmid.
- BARLOW G.W., 2005. How do we decide that a species is sex-role reversed? *Q. Rev. Biol.*, 80: 28-35.
- BARRETT R.D.H., 2010. Adaptative evolution of lateral plates in three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*: a case study in functional analysis of natural variation. *J. Fish. Biol.*, 77: 311-328.
- BARUT' V. & OLIVA O., 1995. Fauna CR a SR. Mihulovci Petromyzontes a ryby Osteichthyes. 2 vol. Prague: Academia, Nakladatelství Akademie věd České republiky.
- BAUM D.A. & SHAW K.L., 1995. Genealogical perspectives on the species problem. *In*: Experimental and molecular approaches to plant biosystematics (P.C. Hoch & A.G. Stephenson, Eds.). pp. 289-303. St. Louis: Missouri Botanical Garden.

- BELL M.A., 2001. Lateral plate evolution in the threespine stickleback: getting nowhere fast. *Genetica*, 112: 445-461.
- BELL M.A. & FOSTER S.A., 1994. Introduction to the evolutionary biology of the threespine stickleback. *In*: The Evolutionary Biology of the Threespin Stickleback (M.A. Bell & S.A. Foster, Eds.). pp. 1-26. Oxford: Oxford University Press.
- BELLIARD J., DITCHE J.M. & ROSET N., 2008. Guide pratique de mise en oeuvre des opérations de pêche à l'électricité. 24 p. Rapport ONEMA.
- BELON P., 1555. La nature et diversité des poissons, avec leurs pourtraicts, representez au plus près du naturel. 448 p. C. Estienne, Imprimeur ordinaire du Roy. M.D.LV.
- BERENDZEN P.B., OLSON W.M. & BARRON S.M., 2009. The Utility of Molecular Hypotheses for Uncovering Morphological Diversity in the *Notropis rubellus* Species Complex (Cypriniformes: Cyprinidae). *Copeia*, 2009: 661-673.
- BERG L.S., 1933. Les poisons des eaux douces de l'URSS et des pays limitrophes. 903 p. Leningrad.
- BERG L.S., 1949. Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries. Traduit par O. Ronen (1965). 1510 p. Jerusalem: IPST Press.
- BERGER J.-P., REICHENBACHER B., BECKER D., GRIMM M., GRIMM K., PICOT L., STORNI A., PIRKENSEER C., DERER C. & SCHAEFER A., 2005. Paleogeography of the Upper Rhine Graben (URG) and the Swiss Molasse Basin (SMB) from Eocene to Pliocene. *Int. J. Earth Sci. (Geol. Rundsch.)*, 94: 697-710.
- BERMINGHAM E., MCCAFFERTY S.S. & MARTIN A.P., 1997. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. *In*: Molecular Systematics of Fishes (T.D. Kocher & C.A. Stepien, Eds.). pp. 113–128. San Diego: Academic Press.
- BERNHARDT B., LAMPERT K.P., LEESE F., MAYER C. & TOLLRIAN R., 2012. Are shoals of minnow *Phoxinus phoxinus* formed by close kin? *J. Fish Biol.*, 80: 713-721.
- BERNATCHEZ L., 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55: 351-379.
- BERNET B., 1960. Recherches biologiques sur les populations de *Gobio gobio* (Linné, 1758) de la Nivelle. *Annls. Stn. Cent. Hydrob. Appl.*, 8: 127-180.
- BERREBI P., 1997. Introduction d'espèces dans les milieux aquatiques d'eau douce: les impacts génétiques. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 344/345: 471-487.
- BERREBI P., 2015. Three brown trout Salmo trutta lineages in Corsica described through allozyme variation. *J. Fish Biol.*, 86: 60-73.
- BERTIN L., 1925. Recherches bionomiques, biométriques et systématiques sur les épinoches (Gastérostéidés). *Ann. Inst. Océanogr. Monaco*, 2: 1-204.
- BIANCO P.G., 1995. Factors affecting the distribution of freshwater fishes especially in Italy. *Cybium*, 19: 241-259.
- BIANCO P.G., 2014. An update on the status of native and exotic freshwater fishes of Italy. *J. Appl. Ichthyol.*, 30: 62-77.
- BIANCO P.G. & KETMAIER V., 2005. Will the Italian endemic gudgeon, *Gobio benacensis*, survive the interaction with the invasive introduced *Gobio gobio? Folia Zool.*, 54: 42-49.
- BIANCO P.G. & DELMASTRO G.B., 2011. Recenti novità tassonomiche riguardanti i pesci d'acqua dolce autoctoni in Italia e descrizione di una nuova specie di luccio. *Res. Wildl. Conserv.*, 2 (suppl.), pp. 14.
- BICHOT F., 2004. Les relations entre le bassin de la Dive et celui de la Haute Sèvre Niortaise Synthèse des connaissances. 41 p. Rapport BRGM RP-52865-FR.

- BILLARD R., 1983. Le brochet: gestion dans le milieu naturel et élevage. 374 p. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- BILLARD R., 1996. Reproduction of pike: gametogenesis, gamete biology and early development. *In:* Pike: Biology and exploitation (J.F. Craig, Ed.), Fish and Fisheries Series 19, pp. 13-43, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall.
- BILLARD R., 1997. Les poissons d'eau douce des rivières de France : identification, inventaire et répartition des 83 espèces. 192 p. Lausanne : Delachaux & Niestlé.
- BISCHOFF A., FREYHOF J. & STAAS S., 1998. Nachweise des Zobels *Abramis sapa* (Pallas 1811) (Teleostei: Cyprinidae) im Rhein. *Lauterbornia*, 33 : 5-8.
- BLACHE J., 1943. Captures comparées. La vallée morte de la Bar et les cas voisins. *Rev. Géographie alpine*, 31 : 1-37.
- BLANC M., BĂNĂRESCU P., GAUDET J.-L. & HUREAU J.-C., 1971. European inland water fish. A multilingual catalogue. 1 vol. London: Fishing News.
- BLANCHARD E., 1866. Les poissons des eaux douces de la France : anatomie, physiologie, description des espèces, mœurs, instincts, industrie, commerce, ressources alimentaires, pisciculture, législation concernant la pêche. 656 p. Paris : Baillière.
- BLOCH M.E., 1785-1797. Ichtyologie ou histoire naturelle, générale et particulière des poissons : avec des figures enluminées, dessinées d'après nature. 16 vol. Berlin : M.E. Bloch & F. de la Garde.
- BOCQUET C., GENERMONT J. & LAMOTTE M., 1976. Introduction à la notion d'espèce dans le règne animal. *In* : Les problèmes de l'espèce dans le règne animal (C. Bocquet, J. Génermont & M. Lamotte Eds.). Tome 1. pp. 17-28. Paris: Société Zoologique de France.
- BOCQUET C., GENERMONT J. & LAMOTTE M. (Eds.), 1976-1980. Les problèmes de l'espèce dans le règne animal. 4 vol. Paris: Société Zoologique de France.
- BOGUTSKAYA N.G. & NASEKA A.M., 2004. Catalogue of agnathans and fishes of fresh and brackish waters of Russia with comments on nomenclature and taxonomy. 389 p. Moscou: KMK Scientific Press.
- BOERO F., 2010. The Study of Species in the Era of Biodiversity: A Tale of Stupidity. *Diversity*, 2: 115-126.
- BOERO F. & BERNARDI G., 2014. Phenotypic vs genotypic approaches to biodiversity, from conflict to alliance. *Mar. Genomics*, 17: 63-64.
- BÖHME M. & ILG A., 2003. fosFARbase. www.wahre-staerke.com.
- BÖHME M., ILG A. & WINKLHOFER M., 2008. . Late Miocene « washhouse » climate in Europe. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 275: 393-401.
- BOMER P., 1979. Les Piedmonts du Bassin de l'Ebre (Espagne). *Méditerranée*, 36: 19-25.
- BOND J.E. & STOCKMAN A.K., 2008. An Integrative Method for Delimiting Cohesion Species: Finding the Population-Species Interface in a Group of Californian Trapdoor Spiders with Extreme Genetic Divergence and Geographic Structuring. *Syst. Biol.*, 57: 628-646.
- BOOKSTEIN F.L., 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. 435 p. New York: Cambridge University Press.
- BORCHERDING J., STAAS S., KRÜGER S., ONDRACKOVA M., ŠLAPANSKÝ L. & JURAJDA P., 2011. Non-native Gobiid species in the Lower Rhine River (Germany): recent range extensions and densities. *J. appl. Ichthyol.*, 27: 153-155.
- BORTOLUS A., 2008. Error cascades in the biological Sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *Ambio*, 37: 114-118.

- BRACKEN J.J. & KENNEDY M.P., 1967. A Key to the identification of the eggs and young stages of coarse fish in fish in Irish Waters. *Scient. Proc. R. Dubl. Soc.*, B2: 99-108.
- BROWN W.M., GEORGE M. Jr & WILSON A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA*, 76: 1967-1971.
- BRUNET R. & HOESTLANDT H., 1972. Recherches biologiques et pisciculture expérimentale du goujon (*Gobio gobio* L.). *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 246: 5-32.
- BUFALINO A.P. & MAYDEN R.L., 2010. Phylogenetic relationships of North American phoxinins (Actinopterygii: Cypriniformes: Leuciscidae) as inferred from S7 nuclear DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, 55, 143-152.

 $\mathbf{C}$ 

- CAFFREY J.M., AVECEDO S., GALLAGHER K. & BRITTON R., 2008. Chub (*Leuciscus cephalus*: a new potentially invasive fish species in Ireland. *Aquatic Invasions*, 3: 201-209.
- CANO J.M., MÄKINEN H.S., LEINONEN T., FREYHOF J. & MERILÄ J., 2008. Extreme neutral genetic and morphological divergence supports classification of Adriatic three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations as distinct conservation units. *Biol. Cons.*, 141: 1055-1066.
- CANTINO P.D. & DE QUEIROZ K., 2007. International code of phylogenetic nomenclature. Version 4b. pp 1-97. <a href="http://www/ohio.edu/PhyloCode">http://www/ohio.edu/PhyloCode</a>.
- CARVALHO D.C., OLIVEIRA D.A., POMPEU P.S., LEAL C.G., OLIVEIRA C. & HANNER R., 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondr. DNA*, 22: 80–86.
- CASSELMAN J.M., CROSSMAN E.J., IHSSEN P.E., REIST J.D. & BOOKE H.E., 1986.

   Identification of muskellunge, northern pike, and their hybrids. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, 15: 14-46.
- CAVALO O. & GAUDANT J., 1987. Observations complémentaires sur l'ichtyofaune des Marnes Messiniennes de Cherasco (Piémont), implications géodynamiques. *Bull. Soc. Paleont. Ital.*, 26: 177-198.
- CEREGHINO R., SANTOUL F., COMPIN A., FIGUEROLA J. & MASTRORILLO S., 2005. Co-occurrence Patterns of Some Small-bodied Freshwater Fishes in Southwestern France: Implications for Fish Conservation and Environmental Management. *Ambio*, 34: 440-444.
- CHAKRABARTY P., WARREN M., PAGE L.M. & BALDWIN C.C., 2013. GenSeq: An updated nomenclature and ranking for genetic sequences from type end non-type sources. *ZooKeys*, 346: 29-41.
- CHANGEUX T., 2011. La pêche fluviale en France. *In*: Les Poissons d'eau douce de France (P. Keith, H. Persat, E. Feunteun, J. Allardi Eds.), pp. 196-207, Collection Inventaires & biodiversité, Mèze : Biotope Editions, Paris : Publications scientifiques du Muséum.
- CHAPPAZ R., BRUN G. & OLIVARI G., 1988. Stratégie de développement du goujon Gobio gobio (L.) dans un lac oligotrophe : la retenue de Sainte-Croix (Provence, France). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 307: 493-497.
- CHAPPAZ R., GILLES A., MIQUELIS A., CAVALLI L. & MARTIN J.-F., 1998. Différenciation génétique et hybridation chez le cyprin *Leuciscus leuciscus*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 321: 933-940.
- CHEN W.J., BONILLO C. & LECOINTRE G., 2003. Repeatability as a criterion of reliability of new clades in the acanthomorph (Teleostei) radiation. *Mol. Phyl. Evol.*, 26: 262-288.

- CHEN X.-Y. & ARRATIA G., 1996. Breeding Tubercles of *Phoxinus* (Teleostei: Cyprinidae): Morphology, Distribution, and Phylogenetic Implications. *J. Morphol.*, 228: 127-144.
- CHEN X.-Y. & HE F., 2009. Speciation and endemism under the model of island biogeography. *Ecology*, 90: 39-45.
- CHESSEL D., DUFOUR A.B. & THIOULOUSE J., 2004. The ade4 package-I- One-table methods. *R News*, 4: 5-10.
- CHIMITS P., 1947. Note sur le repeuplement artificiel du Brochet. *Bull. Fr. Piscic.*, 146: 16-24.
- CHIMITS P., 1956. Le Brochet. Bull. Fr. Piscic., 180: 81-96.
- CLAUZON G., 1999. L'impact des variations eustatiques du basin de Méditerranée occidentale sur l'orogène alpin. *Etude de Géographie Physique*, 28: 33-40.
- CLAUZON G., SUC J.-P., GAUTIER F., BERGER A. & LOUTRE M.-F., 1996. Alternate interpretation of the Messinian salinity crisis: Controversy resolved?. *Geology*, 24: 363-366.
- COLLARES-PEREIRA M.J., COWX I.G. & COELHO M.M., 2002. Conservation of freshwater fishes: options for the future. 462 p. Oxford: Fishing News Books.
- COLLIN H. & FUMAGALLI L., 2011. Evidence for morphological and adaptative genetic divergence between lake and strem habitats in European minnows (*Phoxinus phoxinus*, Cyprinidae). *Mol. Ecol.*, 20: 4490-4502.
- COLLIN H. & FUMAGALLI L., 2015. The role of geography and ecology in shaping repeated patterns of morphological and genetic differentiation between European minnows (*Phoxinus phoxinus*) from the Pyrenees and the Alps. *Biol. J. Linn. Soc.*, 116: 691-703.
- COLLINS R.A., ARMSTRONG K.F., MEIER R., YI Y., BROWN S.D.J., CRUICKSHANK R.H., KEELING S. & JOHNSTON C., 2012. Barcoding and Border Biosecurity: Identifying Cyprinid Fishes in the Aquarium Trade. *PLoS ONE*, 7(1): e28381.
- CORDIER S., FRECHEN M., HARMAND D. & BEINER M., 2005. Middle and Upper Pleistocene fluvial evolution of the Meurthe and Moselle valleys in the Paris Basin and the Rhenish Massif. *Quaternaire*, 16: 201-215.
- COSTEDOAT C., PECH N., CHAPPAZ R., SALDUCCI D., LIM P. & GILLES A., 2004.

   Study of introgressive hybridization between *Chondrostoma t. toxostoma* and *Chondrostoma n. nasus* (Teleostei, Cyprinidae) using multiple approaches. *Cybium*, 28: 51–61.
- COSTEDOAT C., PECH N., SALDUCCI M.D., CHAPPAZ R. & GILLES A., 2005. Evolution of mosaic hybrid zone between invasive and endemic species of Cyprinidae through space and time. *Biol. J. Linn. Soc.*, 85: 135–155.
- COSTEDOAT C., CHAPPAZ R., BARASCUD B., GUILLARD O. & GILLES A., 2006.

   Heterogenous colonization pattern of European Cyprinids, as highlighted by the dace complex (Teleostei : Cyprinidae). *Mol. Phyl. Evol.*, 41: 127-148.
- COSTEDOAT C., PECH N., CHAPPAZ R. & GILLES A., 2007. Novelties in Hybrid Zones: Crossroads between Population Genomic and Ecological Approaches. *PLoS ONE*, 2(4): e357.
- COSTEDOAT C. & GILLES A., 2009. Quaternary Pattern of Freshwater Fishes in Europe: Comparative Phylogeography and Conservation Perspective. *TOCONSBJ*, 3: 36-48
- COWX I.G. (Ed.), 1990. Developments in Electric Fishing. 358 p. Oxford: Fishing News Books.

- COWX I.G. & LAMARQUE P. (Eds.), 1990. Fishing with electricity: applications in freshwater fishereies management. 248 p. Oxford: Fishing News Books.
- CRAIG J.F., 2008. A short review of pike ecology. *Hydrobiologia*, 601: 5-16.
- CRAW D., BURRIDGE C., ANDERSON L. & WATERS J.M., 2006. Late Quaternary river drainage and fish evolution, Southland, New Zealand. *Geomorphology*, 84: 98-110.
- CRACRAFT J., 1983. Species concepts and speciation analysis. *In*: Current Ornithology (R.F. Johnston, Ed.). pp. 159-187. New York: Plenum Press.
- CRACRAFT J., 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. *In*: Speciation and its consequences (D. Otte & J.A. Endler, Eds.). pp. 28-59. Sunderland: Sinauer Associates.
- CRESPIN L. & BERREBI P., 1994. L'hybridation naturelle entre le barbeau commun et le barbeau meridional en France. Compte rendu de dix années de recherches. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 334: 177-189.
- CRESPON J., 1844. Faune méridionale; ou, Description de tous les animaux vertébrés vivans et fossiles, sauvages ou domestiques qui se recontrent toute l'année ou qui ne sont que de passage dans la plus grande partie du midi de la France : suivie d'une méthode de taxidermie ou l'art d'empailler les oiseaux. 2 vol. Nimes: Crespon.
- CRISPO E., MOORE J.-S., LEE-YAW J.A., GRAY S.M. & HALLER B.J., 2011. Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals. *BioEssays*, 33: 508-518.
- CRIVELLI A.J., 1995. Are fish introductions a threat to endemic freshwater fishes in the northern Mediterranean region?. *Biol. Conserv.*, 72: 311-319.
- CROSSMANN E.J., 1996. Taxonomy and distribution. In: Pike: Biology and exploitation (J.F. Craig, Ed.), Fish and Fisheries Series 19, pp. 1-11, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall.
- CUCHEROUSSET J. & OLDEN J.D., 2011. Ecological Impacts of Non-native Freshwater Fishes. *Fisheries*, 36: 215-230.
- CUVIER G., 1829. Le Règne Animal, distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée. 406 p. Paris: Deterville.
- CUVIER G. & VALENCIENNES A., 1828-1849. Histoire naturelle des poissons. 22 vol. Paris : F.G. Levrault.

#### D

- DAGET J. & BAUCHOT M.-L., 1976. Les problèmes de l'espèce chez les Téléostéens. In : Les problèmes de l'espèce dans le règne animal (C. Bocquet, J. Génermont & M. Lamotte Eds.). Tome 1. pp. 67-127. Paris: Société Zoologique de France.
- DARLU P. & TASSY P., 1993. Reconstruction phylogénétique : concepts et méthodes. 245 p. Paris, Milan, Barcelone: Masson.
- DARRIBA D., TABOADA G.L., DOALLO R. & Posada D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics ans parallel computing. *Nature Methods*, 9: 772.
- DARWIN C., 1859. On the origin of species by means of natural selection, or The preservation of favoured races in the struggle for life. 502 p. London: J. Murray.
- DAVIS P.H. & HEYWOOD V.H., 1963. Principles of Angiosperm Taxonomy. 556 p. Edinburgh: Oliver & Boyd.
- DAYRAT B., 2005. Toward integrative taxonomy. *Biol. J. Linnean Soc.*, 85: 407-415.
- DE GOER H.A. & BURG J.P., 1990. Carte géologique de la France à 1:50 000. 813, Chaudes-Aigues. 130 p. Orléans: Bureau de recherches géologiques et minières.

- DE LA PYLAIE A.J.M., 1835. Recherches, en France, sur les poissons de l'Océan, pendant les années 1832 et 1833, Congrès Scientifique de France v.2, Poitiers.
- DE PINNA M.C.C., 1999. Species concepts and phylogenetics. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 9: 353-373.
- DE QUEIROZ K., 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Syst. Biol.*, 56: 879-886.
- DE QUEIROZ K. & GAUTHIER J., 1990. Phylogeny as a central principle in taxonomy: phylogenetic definitions of taxon names. *Syst. Zool.*, 39: 307-322.
- DE QUEIROZ K. & GAUTHIER J., 1994. Toward a phylogenetic system of biological nomenclature. *Trends Ecol. Evol.*, 9: 27-31.
- DENYS G.P.J., DETTAI A., PERSAT H., DOADRIO I., CRUAUD C. & KEITH P., 2013. Status of the Catalan chub *Squalius laietanus* (Actinopterygii, Cyprinidae) in France: input from morphological and molecular data. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.*, 408(4): 1-13.
- DENYS G.P.J., DETTAI A., PERSAT H., HAUTECOEUR M. & KEITH P., 2014. Morphological and molecular evidence of three species of pikes *Esox spp* (Actinopterygii, Esocidae) in France, including the description of a new species. *C. R. Biol.*, 337: 521-534.
- DENYS G.P.J., GEIGER M.F., PERSAT H., KEITH P. & DETTAI A., 2015. Invalidity of *Gasterosteus gymnurus* (Cuvier, 1829) (Actinopterygii, Gasterosteidae) according to integrative taxonomy. *Cybium*, 39: 37-45.
- DESALLE R., EGAN M.G. & SIDDALL M., 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360: 1905-1916.
- DESVAUX A.N., 1851. Essai d'ichtyologie des côtes océaniques et de l'intérieur de la France ou Diagnose des poissons observés. 175 p. Angers : Imprimerie de Cosnier et Lachèse.
- DETTAI A., LAUTREDOU A.-C., BONNILLO C., GOIMBAULT E., BUSSON F., CAUSSE R., COULOUX A., CRUAUD C., DUHAMEL G., DENYS G., HAUTECOEUR M., IGLESIAS S., KOUBBI P., LECOINTRE G., MOTEKI M., PRUVOST P., TERCERIE S. & OZOUF C., 2011. The actinopterygian diversity of the CEAMARC cruises: Barcoding and molecular taxonomy as a multi-level tool for new findings. *Deep-Sea Research II*, 58: 250-263.
- DETTAI A., GALLUT C., BROUILLET S., POTHIER J., LECOINTRE G. & DEBRUYNE R., 2012. Conventiently Pre-Tagged and Pre-Packaged: Extended Molecular Identification and Metagenomics Using Complete Metazoan Mitochondrial Genomes. *PLoS ONE*, 7: e51263.
- DEZES P., SCHMID S.M. & ZIEGLER P.A., 2004. Evolution of the European Cenozoic Rift system: interaction of the Alpine and Pyrenean orogens with their foreland lithosphere. *Tectonophysics*, 389: 1-33.
- DOADRIO I., 2001. Atlas y libro rojo de los peces continentales de España. 364 p. Madrid: Direccion General de Conservación de la Naturaleza & Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- DOADRIO I. & MADEIRA M.J., 2004. A new species of the genus *Gobio* Cuvier, 1816 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Iberian Peninsula and southwestern France. *Graellsia*, 60: 107-116.
- DOADRIO I. & CARMONA J.A., 2003. Testing freshwater Lago Mare dispersal theory on the phylogeny relationships of Iberian cyprinid genera *Chondrostoma* and *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae). *Graellsia*, 59: 457-473.

- DOADRIO I. & CARMONA J.A., 2006. Phylogenetic overview of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in the Iberian Peninsula, with description of two new species. *Cybium*, 30: 199-214.
- DOADRIO I., KOTTELAT M. & DE SOSTOA A., 2007. *Squalius laietanus*, a new species of cyprinid fish from north-eastern Spain and southern France (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyol. Explor. Fres.*, 18: 247-256.
- DOBZHANSKY T., 1950. Mendelian populations and their evolution. *Am. Nat.*, 84: 401-418.
- DOBZHANSKY T., 1970. Genetics of the evolutionary process. 505 p. New York: Columbia University Press.
- DOLEDEC S., CHESSEL D. & GIMARET-CARPENTIER C., 2000. Niche separation in community analysis: a new method. *Ecology*, 81: 2914-2927.
- DONOGHUE M.J., 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist*, 82: 172-181.
- DOTTRENS E., 1950. Le corégone actuel du Léman. Rev. Suisse Zool., 57: 789-813.
- DOTTRENS E., 1951-1952. Poissons d'eau douce. 2 vol. Neuchätel : Delachaux & Niestle.
- DOTTRENS E. & QUARTIER A., 1949. Les corégones du lac de Neuchâtel étude biométrique. *Rev. Suisse Zool.*, 56 : 689-730.
- DOWTON M., MEIKLEJOHN K., CAMERON S.L. & WALLMAN J., 2014. A Preliminary Framework for DNA Barcoding, Incorporating the Multispecies Coalescent. *Syst. Biol.*, 63: 639-644.
- DRAY S. & DUFOUR A.B., 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Soft.*, 22: 1-20.
- DRAY S., DUFOUR A.B. & CHESSEL D., 2007. The ade4 package-II: Two-table and K-table methods. *R News*, 7: 47-52.
- DUBOIS A., 2005. Proposed rules for the incorporation of nomina of higher-ranked zoological taxa in the International Code of Zoological Nomenclature. 1. Some general questions, concepts and terms of biological nomenclature. *Zoosystema*, 27: 365-426.
- DUBOIS A., 2007a. Naming taxa from cladograms: a cautionary tale. *Mol. Phyl. Evol.*, 42: 317-330.
- DUBOIS A., 2007b. Naming taxa from cladograms: some confusions, misleading statements, and necessary clarifications. *Cladistics*, 23: 390-402.
- DUBOIS A., 2008. Drôles d'espèces. Hybridations, perturbations de la méiose et spéciation dans le règne animal : quelques points délicats de terminologie, d'éidonomie et de nomenclature. In : Linné et la systématique aujourd'hui (D. Prat, A. Raynal-Roques & A. Roguenant Eds.). pp. 169-202. Paris : Belin.
- DUBOIS A., 2010. Nomenclatural rules in zoology as a potential threat against natural history museums. *Org. Divers. Evol.*, 10: 81-90.
- DUBOIS A., 2011. Species and « strange species » in zoology: Do we need a « unified concept of species »?. C. R. Palevol., 10: 77-94.
- DUBORGEL M., 1955. La pêche et les poissons de rivière. 368 p. Paris : Librairie Hachette.
- DUDGEON D., ARTHINGTON A.H., GESSNER M.O., KAWABATA Z.-I., KNOWLER D.J., LEVÊQUE C., NAIMAN R.J., PRIEUR-RICHARD A.-H., SOTO D., STIASSNY M.L.J. & SULLIVAN C.A., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.*, 81: 163–182.
- DUPIS A. & CHOQUIER A., 1999. Hydrologie et paléohydrographie de la planèze de Saint-Flour, Massif Central, France. *Bull. Soc. Geol. France*, 170: 559-568.

- DURAND J.D., PERSAT H. & BOUVET Y., 1999. Phylogeography and postglacial dispersion of the chub (*Leuciscus cephalus*) in Europe. *Mol. Ecol.*, 8: 989-997.
- DURAND J.D., ÜNLÜ E., DOADRIO I., PIPOYAN S. & TEMPLETON A.R., 2000. Origin, radiation, dispersion and allopatric hybridization in the chub (*Leuciscus cephalus*). *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267: 1687-1697.

E

- ECONOMIDIS P.S., 1991. Check list of freshwater fishes of Greece. Recent status of threats and protection. Athènes: Hellenic Society for the Protection of Nature.
- EDGAR R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.*, 32: 1792-1797.
- EDWARDS S.V., 2009. Is a new and general theory of molecular systematics emerging?. *Evolution*, 63: 783-791.
- ENGLBRECHT C.C., FREYHOF J., NOLTE A., RASSMANN K., SCHLIEWEN U. & TAUTZ D., 2000. Phylogeography of the bullhead Cottus gobio (Pisces: Teleostei: Cottidae) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations. *Mol. Ecol.*, 9: 709-722.
- EPPE R., PERSAT H., BEAUDOU D. & BERREBI P., 1999. Genetic variability in sculpin (genus *Cottus*) from southern France, with reference to taxonomic status of an endemic species, *C. petiti. Heredity*, 83: 533-540.
- ESCHMEYER W.N. (ed)., 2014 Catalog of Fishes: genera, species, references. (http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp). Electronic version accessed 15 Apr 2014.
- ETIENNE R. & LARUE J.-P., 2011. Contribution à l'étude des liaisons Loire-Seine : mise en évidence par l'étude des minéraux lourds de l'antécédence de la Loire en Sologne (Bassin Parisien, France). *Physio-Géo*, 5: 269-291.

F

- FATIO V., 1888a. Sur un nouveau corégone français (*Coregonus bezola*) du lac du Bourget. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, 106: 1541-1544.
- FATIO V., 1888b. Un nouveau corégone français *Coregonus bezola* du lac du Bourget. *Arch. Sci. Phys. Nat.*, 20: 180-185.
- FATIO V., 1890. Faune des vertébrés de la Suisse. Volume V. Histoire naturelle des poissons, 2e partie. Genève, Bâle : H. Georg.
- FELSENSTEIN J., 1981. Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *J. Mol. Evol.*, 17: 368-376.
- FELSENSTEIN J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- FELSENSTEIN J., 2004. Inferring phylogenies. 664 p. Sunderland: Sinaeur Associates.
- FLOT J.-F., 2010. SEQPHASE: a web tool for interconverting PHASE input/output files and FASTA sequence alignments. *Mol. Ecol. Res.*, 10: 162-166.
- FOLLOT S., 2001. Etude des caractéristiques chromosomiques de populations de Cottus gobio et C. petiti de France. 29 p. Paris : Rapport de stage pour l'obtention du brevet technicien supérieur agricole ANABIOTEC. MNHN / Laboratoire d'ichtyologie et service de systématique moléculaire.
- FOREL F.-A., 1892. Le Léman, monographie limnologique. 3 vol. Lausanne: E. Rouge.
- FOURNEL D.H.L., 1836. Faune de la Moselle, ou manuel de zoologie, contenant la description des animaux libres ou domestiques observés dans le département de la Moselle. 512 p. Metz: Veronnais.

- FREYHOF J., 1998. Die Fische und Neunaugen der Sieg in den Grenzen von Nordreign-Westfalen. *Decheniana*, 151: 183-194.
- FREYHOF J., 2003. Immigration and potential impacts of invasive freshwater fishes in Germany. *Berichte IGB*, 17: 51–58.
- FREYHOF J., SCHOLTEN M., BISCHOFF A., WANZENBÖCK J., STAAS S. & WOLTER C., 2000. Extensions to the known range of the whitefin gudgeon in Europe and biogeographical implications. *J. Fish Biol.*, 57: 1339-1342.
- FREYHOF J. & NASEKA A.M., 2005. *Gobio delyamurei*, a new gudgeon from Crimea, Ukraine (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyol. Explor. Fres.*, 16: 331-338.
- FREYHOF J., KOTTELAT M. & NOLTE A., 2005. Taxonomic diversity of European *Cottus* with description of eight new species (Teleostei: Cottidae). *Ichthyol. Explor. Fres.*, 16: 107-172.
- FROESE R. & PAULY D., 2014 FishBase. World Wide Web electronic publication. (www.fishbase.org). version accessed June 2014.
- FROESE R. & PAULY D., 2015 FishBase. World Wide Web electronic publication. (www.fishbase.org). version accessed April 2015.
- FROST W.E., 1943. The natural history of the minnow, *Phoxinus phoxinus*. *J. Animal Ecology*, 12: 139-162.
- FUJII R., 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Res.*, 13: 300-319.

G

- GABERT P., 1962. Le nummulitique sud-pyrénéen à l'Ouest de l'Aragon. *Méditerranée*, 3: 98-102.
- GALTIER N., 2001. Maximum-Likelihood Phylogenetic Analysis Under a Covarion-like Model. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 866-873.
- GALTIER N., NABHOLZ B., GLEMIN S. & HURST G.D.D., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.*, 18: 4541-4550.
- GANDOLFI A., FERRARI C., CRESTAVELLO B., GIRARDI M. & LUCENTINI L., 2014. Conservation genetics of Southern pike: how many different management units? Riassunti XV Congresso Naz. A.I.I.A.D., Gorizia, 14 15 novembre 2014: 7
- GANDOLFI A., FONTANETO D., NATALI M. & LUCENTINI L., 2015. Mitochondrial genome of *Esox flaviae* (Southern pike): announcement and comparison with other Esocidae. *Mitoch. DNA*, in press.
- GANDOLFI G., ZERUNIAN S., TORRICELLI P. & MARCONATO A., 1991. I pesci delle acque interne italiane. 616 p. Rome : Instituto Poligrafico e Zecca dello Stato.
- GARCÍA-MARÍN J.L., UTTER F.M. & PLA C., 1999. Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity*, 82: 46-56.
- GARGOMINY O., TERCERIE S., REGNIER C. & VANDEL E., 2011. TAXREF v4.0 Sources. Référentiel taxonomique de la faune, la flore et la fonge de France métropolitaine et d'outre-mer, 30 p, Paris : MNHN SPN.
- GAUDANT J., 1976. Découverte d'un Cobitidae (Poisson Téléostéen, Cypriniforme) dans le Pliocène continental des environs de Rochefort-Montagne (Puy-de-Dôme). *Géobios*, 9: 673-679.
- GAUDANT J., 1977. Nouvelles observations sur l'ichtyofaune stampienne d'Oberdorf (Canton de Soleure). *Ecolog. Géol. Helv.*, 70: 789-809.

- GAUDANT J., 1978. Découverte du plus ancien représentant connu du genre *Esox* L. (Poisson Téléostéen, Esocoidei) dans le Stampien moyen du bassin d'Apt (Vaucluse). *Géol. Méditer.*, 5: 257-268.
- GAUDANT J., 1979a. Contribution à l'étude des vertébrés Oligocènes de Soulce (Canton du Jura). *Ecolog. Geol. Helv.*, 72: 871-895.
- GAUDANT J., 1979b. L'ichthyofaune tiglienne de Tegelen (Pays-Bas) : Signification paéoécologique et paléoclimatique. *Scripta Geol.*, 50: 1-16.
- GAUDANT J., 1980. Mise au point de l'ichtyofaune Miocène d'Öhningen (Baden, Allemagne). C. R. Acad. Sci. Paris., 291: 1033-1036.
- GAUDANT J., 1984. Nouvelles recherches sur les Cyprinidae (Poissons Téléostéens) Oligocènes des limagnes. *Géobios*, 17: 659-666.
- GAUDANT J., 1988. L'ichtyofaune Eocène de Messel et du Geisaltel (Allemagne), Essai d'approche paléobiogéographique. *Cour. Forsch. Inst. Senckenberg*, 107: 355-367.
- GAUDANT J., 1989. Nouvelles observations sur l'ichtyofaune miocène de Steinheim am Albuch (Wurtemberg, Allemagne). *Stuttg. Beitr. Naturk.*, B, 151: 1-33.
- GAUDANT J., 1997. L'ichtyofaune pliocène de Willershausen am Harz (Basse Saxe, Allemagne) un réexamen. *Stuttg. Beitr. Naturk.*, B, 257: 1-51.
- GAUDANT J. & ROUSSET C., 1979. Découverte de restes de Cyprinidae (Poissons Téléostéens) dans l'Oligocène moyen de Marseille (Bouches-du-Rhône). *Géobios*, 12: 331-337.
- GEIGER M.F., HERDER F., MONAGHAN M.T., ALMADA V., BARBIERI R., BARICHE M., BERREBI P., BOHLEN J., CASAL-LOPEZ M., DELMASTRO G.B., DENYS G.P.J., DETTAI A., DOADRIO I., KALOGIANNI E., KÄRST H., KOTTELAT M., KOVAČIĆ M., LAPORTE M., LORENZONI M., MARČIĆ Z., ÖZULUĞ M., PERDICES A., PEREA S., PERSAT H., PORCELOTTI S., PUZZI C., ROBALO J., ŠANDA R., SCHNEIDER M., ŠLECHTOVÁ, STOUMBOUDI M., WALTER S. & FREYHOF J., 2014 Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Mol. Ecol. Res.*, 14: 1210-1221.
- GELLER J., 1999. Decline of a native mussel masked by sibling species invasion. *Conserv. Biol.*, 13: 661-664.
- GERVAIS H. & BOULART R., 1876-1877. Les poissons : synonymie, description, mœurs, frai, pêche, iconographie, des espèces composant plus particulièrement la faune française. 3 vol. Paris : J. Rothschild.
- GERVAIS H. & BOULART R., 1897. Les poissons : synonymie, description, mœurs, frai, pêche, iconographie, des espèces composant plus particulièrement la faune française. 233 p. Paris : J. Rothschild.
- GIBBARD P.L., ROSE J. & BRIDGLAND D.R., 1988. The history of the great northwest European rivers during the past three million years. *Philo. Trans. Royal Soc. London*, Serie B, 318: 559-602.
- GLANGEAUD P., 1922. Le bassin oligocène effondré de Saint-Flour, Le Malzieu, la Truyère miocène, affluent de l'Allier. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 174: 401-404.
- GOLLMAN G., 1996. Species concepts: a contrast of viewpoints. AMRE, 17: 295-301.
- GOTTIS M., LENGUIN M., SELLIER E. & TAVOSO A., 1972. Hypothèses sur les causes et la chronologie des défluviations dans la gouttière de Carcassonne entre Toulouse et Narbonne. *Bull. Soc. Linn. Bordeaux*, 2: 125-131.
- GOZLAN R.E., BRITTON J.R., COWX I. & COPP G.H., 2010. Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. *J. Fish Biol.*, 76: 751-786.

- GRANDE L., 1999. The first *Esox* (Esocidae: Teleostei) from the Eocene Green River formation, and a brief review of esocid fishes. *J. Vert. Paleontol.*, 19: 271-292.
- GRANDE T., LATEN H. & LÓPEZ J.A., 2004. Phylogenetic Relationships of Extant Esocid Species (Teleostei: Salmoniformes) Based on Morphological and Molecular Characters. *Copeia*, 4: 743-757.
- GRANT P.R. (Ed.), 1998. Evolution on Islands. 334 p. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press.
- GRATTON P., ALLEGRUCCI G., SBORDONI V. & GANDOLFI A., 2014. The evolutionary jigsaw puzzle of the surviving trout (Salmo trutta L. complex) diversity in the Italian region. A multilocus Bayesian approach. *Mol. Phyl. Evol.*, 79: 292-304.
- GREGOIRE P., 1983. Contribution à la connaissance de la répartition des poissons d'eau douce en France. 117 p. Paris : PhD Thesis, CEMAGREF.
- GRENIER R., COSTEDOAT C., CHAPPAZ R. & DUBUT V., 2013. Two pultiplexed sets of 21 and 18 microsatellites for *Phoxinus phoxinus* (L.) and *Gobio gobio* (L.) developed by cross-species amplification. *Eur. J. Wildl. Res.*, 59: 291-297.
- GRIFFITHS D., 2006. Pattern and process in the ecological biogeography of European freshwater fish. *J. Animal Ecol.*, 75: 734-751.
- GRISMER L.L., 1999. An evolutionary classification of reptiles on islands in the Gulf of California, Mexico. *Herpetologica*, 55: 446-469.
- GRISMER L.L., 2001. An evolutionary classification and checklist of amphibians and reptiles on the Pacific islands of Baja California, Mexico. *Bull. South. Calif. Acad. Sci.*, 100: 12-23.
- GROSS H.P., 1979. Geographic variation in European ninespine sticklebacks, *Pungitius pungitius*. *Copeia*, 1979: 405-412.
- GUMM J.M., FELLER K.D. & MENDELSON T.C., 2011. Spectral Characteristics of Male Nuptial Coloration in Darters (*Etheostoma*). *Copeia*, 2011 : 319-326.

### Н

- HALL T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95-98-NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- HAMILTON K.E., FERGUSSON A., TAGGART J.B. & TÓMASSON T., 1989. Post-glacial colonization of brown trout, *Salmo trutta* L.: *Ldh-5* as a phylogeographic marker locus. *J. Fish Biol.*, 35: 651-664.
- HANNER R., 2009. Data standards for BARCODE records in INSDC (BRIs). Available at: http://barcoding.si.edu/PDF/DWG\_data\_standards-Final.pdf (last accessed 09/2015).
- HANTKE R., 1993. Flussgeschichte Mitteleuropas. 459 p. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- HAO X., JIANG R. & CHEN T., 2011. Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics*, 27: 611–618.
- HARRINGTON R.C. & NEAR T.J., 2012. Phylogenetic and Coalescent Strategies of Species Delimitation in Subnose Darters (Percidae: Etheostoma). *Syst. Biol.*, 61: 63-79.
- HE S., MAYDEN R.L., WANG X., WANG W., TANG K.L., CHEN W.-J. & CHEN Y., 2008. Molecular phylogenetics of the family Cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as evidenced by sequence variation in the first intron of S7 ribosomal protein-coding gene: Further evidence from a nuclear gene of the systematic chaos in the family. *Mol. Phyl. Evol.*, 46: 818-829.

- HEALY J.A. & MULAHY M.F., 1980. A biochemical genetic analysis of populations of the northern pike, *Esox lucius* L., from Europe and North America. *J. Fish Biol.*, 17: 317-324.
- HEBERT P.D.N., CYWINSKA A., BALL S.L. & DE WAARD J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, 270: 313-321.
- HECKEL J.J., 1836. Über einige neue, oder nicht gehörig unterschiedene Cyprinen, nebst einer systematischen Darstellung der europäischen Gattungen dieser Gruppe. *Ann. Wiener Mus. Naturgesch.*, 1: 219-234.
- HECKEL J. & KNER R., 1858. Die Süsswasserfische der Östreichischen Monarchie. 388 p. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann.
- HENNIG W., 1966. Phylogenetic systematics. 263 p. Urbana: University of Illinois Press.
- HEWITT G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature, 405: 907-913.
- HEY J., WAPLES R.S., ARNOLD M.L., BUTLIN R.K. & HARRISON R.G., 2003. Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 597-603.
- HIGUCHI M., SAKAI H. & GOTO A., 2014. A new threespine stickleback, *Gasterosteus nipponicus* sp. nov. (Teleostei: Gasterosteidae), from the Japan Sea region. *Ichthyol. Res.*, 61: 341-351.
- HINSINGER D.D., DEBRUYNE R., THOMAS M., DENYS G.P.J., MENNESSON M., UTGE M. & DETTAI A., sous presse Fishing for barcodes in the Torrent: from COI to complete mitogenomes on NGS platforms. *DNA Barcodes*.
- HOLČÍK J., BĂNĂRESCU P. & EVANS D., 1989. General Introduction to Fishes. In: General Introduction to Fishes Acipenseriformes (J. Holčík Ed.). pp. 18-147. Wiesbaden: AULA-Verlag.
- HSÜ K.J., CITA M.B. & RYAN W.B.F., 1973. The origin of the Mediterranean evaporites. *Initial Reports DSDP*, 13: 1023-1231.
- HUBBS C.L., 1955. Hybridization between Fish Species in Nature. Syst. Zool., 4: 1-20.
- HUBERT N., HANNER R., HOLM E., MANDRAK N.E., TAYLOR E., BURRIDGE M., WATKINSON D., DUMONT P., CURRY A., BENTZEN P., ZHANG J., APRIL J. & BERNATCHEZ L., 2008. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE*, 3: e2490.
- HUET M., 1959. Profiles and biology of western European streams as related to fisheries management. *T. Am. Fish. Soc.*, 88, 155-163.
- HUGUENY B., OBERDORFF T. & TEDESCO P.A., 2010. Community Ecology of River Fishes: A Large-Scale Perspective. *In*: Community ecology of stream fishes: concepts, approaches, and techniques (K.B. Gido & D.A. Jackson, Eds). Vol.73. pp 29-62. Bethesda: American Fish Society.
- HUREAU J.-C., 1991. La base de données GICIM. *In*: Atlas préliminaire des poissons d'eau douce de France (J. Allardi & P. Keith, Eds.). 225-227 p. Paris: Publications scientifiques du Muséum national d'histoire naturelle.
- HUREAU J.-C. & MONOD T. (Eds.), 1973. Check-list of the fishes of the North-eastern Atlantic and of the Mediterranean (Clofnam). 2 vol. Paris: UNESCO.
- HUTAGALUNG R.A., LIM P., BELAUD A. & LAGARRIGUE T., 1997. Effets globaux d'une agglomération sur la typologie ichtyenne d'un fleuve : cas de la Garonne à Toulouse (France). *Annls. Limnol.*, 33: 263-279.
- HUTCHINSON G.E., 1957. Concluding remarks: Cold spring harbor. *Symp. Quant. Biol.*, 22: 415-427.
- HYNES H.B.N., 1970. The Ecology of running waters. 555 p. Liverpool: Liverpool University Press.

- IBARRA A.A., LIM P. & LEK S., 2005. Fish diversity conservation and river restoration in southwest France: a review. *In*: Modelling Community Structure in Freshwater Ecosystems (S. Lek, M. Scardi, F.M. Verdonschot, J.-P. Descy & Y.-S. Park eds). pp 64-75. Berlin: Springer.
- IGLESIAS S.P., 2012. Actinopterygians from the North-eastern Atlantic and Mediterranean (A natural classification based on collection specimens, with DNA barcodes and standardized photographs), Volume I (plates), Provisional version 08, 01 April 2012. 245p. http://www.mnhn.fr/iccanam.
- IMOTO J.M., SAITOH K., SASAKI T., YONEZAWA T., ADACHI J., KARTAVTSEV Y.P., MIYA M., NISHIDA M. & HANZAWA N., 2013. Phylogeny and biogeography of highly diverged freshwater fish species (Leuciscinae, Cyprinidae, Teleostei) inferred from mitochondrial genome analysis. *Gene*, 514: 112-124.
- ISHIGURO N.B., MIYA M. & NISHIDA M., 2003. Basal euteleostean relationships: a mitogenomic perspective on the phylogenetic reality of the 'Protacanthopterygii'. *Mol. Phyl. Evol.*, 27: 476-488.
- IUCN, 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. Téléchargé en juin 2014.

J

- JACOB A., EVANNO G., RENAI E., SERMIER R. & WEDEKIND C., 2009. Male body suze and breeding tubercles are both linked to intrasexual dominance and reproductive success in the minnow. *Anim. Behav.*, 77: 823-829.
- JACOBSEN L., SKOV C., KOED A. & BERG S., 2007. Short-term salinity tolerance of northern pike, *Esox lucius*, fry, related to temperature and size. *Fisheries Manag. Ecol.*, 14: 303-308.
- JUKES T. & CANTOR C., 1969. Evolution of protein molecules. *In*: Mammalian protein metabolism, Vol III (H. Munro ed.). pp 21-132. New York: Academic Press.
- JURINE L., 1825. Histoire abrégée des poissons du lac Léman. *Mem. Soc. Phys. Hist. nat. Geneve*, 3: 133-235.

K

- KEARSE M., MOIR R., WILSON A., STONES-HAVAS S., CHEUNG M., STURROCK S., BUXTON S., COOPER A., MARKOWITZ S., DURAN C., THIERER T., ASHTON B., MEINTJES P. & DRUMMOND A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28: 1647-1649.
- KEITH P., 1998. Evolution des peuplements ichtyologiques de France et stratégies de conservation. 236 p. Université de Rennes I : PhD thesis.
- KEITH P., ALLARDI J. & MOUTOU B., 1992. Livre rouge des espèces menacées de poissons d'eau douce de France et bilan des introductions. 111 p. Paris : Muséum national d'histoire naturelle, Secrétariat de la faune et de la flore, CEMAGREF, Conseil supérieur de la pêche.
- KEITH P. & ALLARDI J., 2001. Atlas des poissons d'eau douce de France. 387 p. Paris : Secrétariat de la faune et de la flore.
- KEITH P. & MARION L., 2002. Methodology for drawing up a Red List of threatened freshwater fish in France. *Aquatic Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 12: 169-179.

- KEITH P., PERSAT H., FEUNTEUN E. & ALLARDI J., 2011a. Les Poissons d'eau douce de France. 552 p. Collection Inventaires et Biodiversités. Mèze: Biotope Editions, Paris: Publications scientifiques du Muséum.
- KEITH P., LORD C., LORION J., WATANABE S., TSUKAMOTO K., COULOUX A. & DETTAI A., 2011b. Phylogeny and biogeography of Sicydiinae (Teleostei: Gobiidae) inferred from mitochondrial and nuclear genes. *Mar. Biol.*, 158: 311-326.
- KEIVANY Y. & NELSON J.S., 2000. Taxonomic review of the genus *Pungitius*, ninespine sticklebacks (Gasterosteidae). *Cybium*, 24: 107-122.
- KEKÄLÄINEN J., VALKAMA H., HUUSKONEN H. & TASKINEN J., 2010a. Multiple Sexual Ornementation Signals Male Quality and Predicts Female Preference in Minnows. *Ethology*, 116: 895-903.
- KEKÄLÄINEN J., HUUSKONEN H., TUOMAALA M. & KORTET R., 2010b. Both male and female sexual ornaments reflect offspring performance in a fish. *Evolution*, 64: 3149-3157.
- KEKÄLÄINEN J., LEPPÄNEN H.-R., HUUSKONEN H., LAI Y.-T., VALKAMA H. & TASKINEN J., 2011. The information content of odour, colour and tactile cues in the mate choice of minnows. *Behaviour*, 148: 909-925.
- KESTEMONT P., 1990. Dynamic aspects of ovogenesis in an asynchronous fish, the gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae), under controlled temperature and photoperiod conditions. *Aquat. Living Resour.*, 3: 61-74.
- KESTEMONT P., 2007. Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 2 Variations saisonnières dans l'histologie des testicules. *J. Appl. Ichthyol.*, 5: 111-121
- KIENER A., 1985. Au fil de l'Eau en Pays méditerranéen. 307 p. Avignon : Aubanel.
- KIENER A. & OLLIER J., 1970. Contribution à l'étude écologique et biologique de la rivière le Gapeau (Var). *Hydrobiologia*, 36: 189-251.
- KIENER A., DELIZE A. & BELKIOR P., 1981. Aspects piscicoles du fleuve Argens (Var). *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 282: 43-74.
- KIER G., KREFT H., LEE T.M., JETZ W., IBISCH P.L., NOWICKI C., MUTKE J. & BARTHLOTT W., 2009. A global assessment of endemism and species richness across island and mainland regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 9322-9327.
- KIMURA M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.
- KNAPEN D., HNAEPKENS G., BERVOETS L., TAYLOR M.I., EENS M. & VERHEYEN E., 2003. Conservation units based on mitochondrial and nuclear DNA variation among European bullhead populations (*Cottus gobio* L., 1758) from Flanders, Belgium. *Conserv. Genet.*, 4: 129-140.
- KNEBELSBERGER T., DUNZ A.R., NEUMANN D. & GEIGER M.F., 2015. Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding. *Mol. Ecol. Res.*, 15: 562-572.
- KNOWLTON N. & WEIGT L.A., 1998. . New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 2257-2263.
- KOCHER T.D., THOMAS W.K., MEYER A., EDWARDS S.V., PÄÄBO S., VILLABLANCA & WILSON A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA*, 86: 6196-6200.
- KOTTELAT M., 1997. European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes in Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for

- non-systematists and comments on nomenclature and conservation. *Biol. Brat. Section Zool.*, 52, suppl. 5: 1-271.
- KOTTELAT M., 1998. Systematics, species consepts and the conservation of freshwater fish diversity in Europe. *Ital. J. Zool.*, 65: 65-72.
- KOTTELAT M., 2007. Three new species of *Phoxinus* from Greece and southern France (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyol. Explor. Fres.*, 18: 145-162.
- KOTTELAT M. & PERSAT H., 2005. The genus *Gobio* in France, with redescription of *G. gobio* and description of two new species. *Cybium*, 29: 211-234.
- KOTTELAT M. & FREYHOF J., 2007. Handbook of European freshwater fishes. 646 p. Cornol: Publication Kottelat.
- KRACZKOWSKI M.L. & CHERNOFF B., 2014. Molecular Phylogenetics of the Eastern and Western Blacknose Dace, *Rhinichthys atratulus* and *R. obtusus* (Teleostei: Cyprinidae). *Copeia*, 2014: 325-338.
- KREITMANN L., 1942. Quel poisson ai-je pêché ? : Détermination simplifiée des poissons d'eau douce et des écrevisses de la France. 163 p. Paris: G. Doin.
- KUHLEMANN J., 2007. Paleogographic and paleotopographic evolution of the Swiss and Eastern Alps since the Oligocene. *Global Planet. Change*, 58: 224-236.
- KULLANDER S.O., 1999. Fish species how and why. Rev. Fish Biol. Fisher., 9: 325-352.
- KUNTNER M. & AGNARSSON I., 2006. Are the Linnean and Phylogenetic Nomenclatural Systems Combinable? Recommendations for Biological Nomenclature. Syst. Biol., 55: 774-784.

Τ.

- LA SALLE J., WHEELER Q., JACKAWAY P., WINTERTON S., HOBERN D. & LOVELL D., 2009. Accelerating taxonomic discovery through automated character extraction. *Zootaxa*, 2217: 43-55.
- LAFFAILLE P., BROSSE S., OMBREDANE D. & FEUNTEUN P., 2011. Richesse et organisation spatiale des communautés de poissons d'eau douce. *In:* Les Poissons d'eau douce de France (P. Keith, H. Persat, E. Feunteun, J. Allardi Eds.), pp. 128-155, Collection Inventaires & biodiversité, Mèze: Biotope Editions, Paris: Publications scientifiques du Muséum.
- LAI Y.-T., KEKÄLÄINEN J. & KORTET R., 2013. Male Ornementation in the European Minnow (*Phoxinus phoxinus*) Signals Swimming Performance. *Ethology*, 119: 1-9.
- LAMBERT D.M. & SPENCER H.G. (Eds.), 1995. Speciation and the recognition concept: Theory and application. 502 p. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- LAPORTE E., 1853. Faune ichthyologique du département de la Gironde. *Actes Soc. Linn. Bordeaux*, 19: 157-224.
- LASNE E., BERGEROT B., LEK S. & LAFFAILLE P., 2007. Fish zonation and indicator species for the evaluation of the ecological status of rivers: example of the Loire basin (France). *River. Res. Applic.*, 23: 877-890.
- LARUE J.-P., 2003. L'encaissement inégal de la Seine et de la Loire dans le Bassin parisien (France). *Géogr. Phys. Quatern.*, 57: 21-36.
- LAUNEY S., MORIN J., MINERY S. & LAROCHE J., 2006. Microsatellite genetic variation reveals extensive introgression between wild and introduced stocks, and a new evolutionary unit in French pike *Esox lucius L. J. Fish Biol.*, 68: 193-216.

- LAURIN M., DE QUEIROZ K., CANTINO P., CELLINESE N & OLMSTEAD R., 2005.

   The PhyloCode, types, ranks and monophyly: a response to Pickett. *Cladistics*, 21: 605-607.
- LAURIN M., DE QUEIROZ K. & CANTINO P., 2006. Sense and stability of taxon names. *Zool. Scripta*, 35: 113-114.
- LAUTREDOU A.-C., BONILLO C., DENYS G., CRUAUD C., OZOUF-COSTAZ C., LECOINTRE G. & DETTAI A., 2010. Molecular taxonomy and identification within the Antarctic genus *Trematomus* (Notothenioidei, Teleostei): How valuable is barcoding with COI?. *Polar Science*, 4: 333-352.
- LE GALL O., 1984. L'Ichtyofaune d'eau douce dans les sites préhistoriques : ostéologie, paléoécologie, palethnologie. 196 p. Paris: Editions du Centre National de la Recherche Scientifique.
- LE GALL O., 2008. Les poisons d'eau douce pléistocènes sont-ils des indicateurs paléoclimatiques? Une approche élargie à l'Europe. *In:* Archéologie du poisson, 30 ans d'ichtyologie au CNRS (P. Béarez, S. Grouard, B. Clavel, Eds.). pp. 311-326. Antibes: ADPCA.
- LE GALL O., 2010. Influences des glaciaires-Interglaciaires sur les ichtyofaunes des eaux dous européennes. *Quaternaire*, 21: 203-214.
- LE ROUZIC A., ØSTBYE K., KLEPAKER T.O., HANSEN T.F., BERNATCHEZ L. SCHLUTER D. & VØLLESTAD L.A., 2011. Strong and consistent natural selection associated with armour reduction in sticklebacks. *Mol. Ecol.*, 20: 2483-2493.
- LE ROUX M., 1928. Recherches biologiques dans les Grands Lacs de Savoie : Lacs du Bourget et d'Annecy. 164 p. Annecy: Imprimerie J. Abry et Cie.
- LEINONEN T., MCCAIRNS R.J.S., HERCZEG G. & MERILÄ J., 2012. Multiple evolutionary pathways to decreased lateral plate coverage in freshwater threespine sticklebacks. *Evolution*, 66: 3866-3875.
- LEUNDA P.M., MIRANDA R. & OSCOZ J., 2010. Piscardo *Phoximus bigerri* Kottelat, 2007. *In*: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles (A. Salvador & B. Elvira, Eds). <a href="http://www.vertebradosibericos.org/">http://www.vertebradosibericos.org/</a>. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- LEUNDA P.M., SISTIAGA M., OSCOZ J. & MIRANDA R., 2012. Ichtyofauna of a near-natural pyrenean river: spatio-temporal variability and reach-scale habitat. *Environ. Eng. Manag. J.*, 11: 1111-1124.
- LI C., ORTÍ G., ZHANG G. & LU G., 2007. A practical approach to phylogenomics: the phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. *BMC Evol. Biol.*, 7: 44
- LINNAEUS C., 1758. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata. 824 p. Holmiae: Salvius.
- LIU Y. & YANG J., 2014. Complete mitochondrial genome of *Esox reichertii* (Amur pike). *Mitoch. DNA*, 26: 927-928.
- LHERMINIER P. & SOLIGNAC M., 2006. De l'espèce. 694 p. Paris : Edition Syllepse.
- LOBÓN-CERVIÁ J. & TORRES S., 1984. On the growth and reproduction of two populations of gudgeon (*Gobio gobio* L.) in Central Spain. *Acta Hydrobiol.*, 25/26: 101-115.
- LOGET N. & VAN DEN DRIESSCHE J., 2006. On the origin of the Strait of Gilbratar. *Sediment. Geol.*, 188-189: 341-356.

- LOOT G., POULET N., REYJOL Y., BLANCHET S. & LEK S., 2004. The effects of the ectoparasite *Tracheliastes polycolpus* (Copepoda: Lernaeopodidae) on the fins of rostrum dace (*Leuciscus leuciscus burdigalensis*). *Parasitol. Res.*, 94: 16-23.
- LOOTVOET A., BLANCHET S., GEVREY M., BUISSON L., TUDESQUE L. & LOOT G., 2013. Patterns and processes of alternative host use in a generalist parasite: insights from a natural host–parasite interaction. *Funct. Ecol.*, 27: 1403-1414.
- LUCEK K. & SEEHAUSEN O., 2015. Distinctive insular forms of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from western Mediterranean islands. *Conserv. Genet.*, in press.
- LUCENTINI L., PALOMBA A., LANCIONI H., GIGLIARELLI L., NATALI M. & PANARA F., 2006. Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius* L.). *Fish. Res.*, 80: 251-262.
- LUCENTINI L., PULETTI M.E., RICCIOLINI C., GIGLIARELLI L., FONTANETO D., LANFALONI L., BILÒ F., NATALI M. & PANARA M., 2011. Molecular and Phenotypic Evidence of a New Species of Genus *Esox* (Esocidae, Esociformes, Actinopterygii): The Southern Pike, *Esox flaviae*. *PLoS ONE*, 6: e25218.

#### M

- MAAN M.E. & SEEHAUSEN O., 2011. Ecology, sexual selection and speciation. *Ecol. Lett.*, 14: 591-602.
- MACE G.M., 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 359: 711-719.
- MADEIRA M.J., GOMEZ-MOLINIER B.J. & DOADRIO I., 2005. Genetic characterization of *Gobio gobio* populations of the Iberian peninsula based on cytochrome b sequences. *Fol. Zool.*, 54: 5-12.
- MAES G.E., VAN HOUDT J.K.J., DE CHARLEROY D. & VOLCKAERT F.A.M., 2003. Indications for a recent Holarctic expansion of pike based on a preliminary study of mtDNA variation. *J. Fish Biol.*, 63: 254-259.
- MAGNAN D., 1982. Les poissons sédentaires. *In*: Rivière allier (Société pour l'Etude de la Protection de la Nature dans le Massif Central, Fédération de la Région Auvergne pour la Nature et l'Environnement). Collection Nature vivante : pp 46-53
- MAIRE A., 2014. Comment sélectionner les zones prioritaires pour la conservation et la restauration des communautés de poissons de rivière ? Applications aux échelles de la France et du Pas-de-Calais. 265 p. INP de Toulouse : PhD thesis.
- MAIRE A., BUISSON L., BIAU S., CANAL J. & LAFFAILLE P., 2013. A multifaceted framework of diversity for prioritizing the conservation of fish assemblages. *Ecol. Indic.*, 34: 450-459.
- MAIRE A., BUISSON L., CANAL J., RIGAULT B., BOUCAULT J. & LAFFAILLE P., 2015. Hindcasting modelling for restoration and conservation planning: application to stream fish assemblages. *Aquat. Conserv.*, in press.
- MAITLAND P.S., 1977. Les poisons des lacs et rivières d'Europe en couleurs. 255 p. Paris : Elsevier-Séquoia.
- MAITLAND, P.S., 2004. Keys to the freshwater fish of Britain and Ireland, with notes on their distribution and ecology. 248 p. Ambleside: Freshwater Biological Association.
- MÄKINEN H.S., CANO J.M. & MERILÄ J., 2006. Genetic relationships among marine and freshwater populations of the European tree-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) revealed by microsatellites. *Mol. Ecol.*, 15: 1519-1534.

- MÄKINEN H.S. & MERILÄ J., 2008. Mitochondrial DNA phylogeography of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in Europe—Evidence for multiple glacial refugia. *Mol. Phyl. Evol.*, 46: 167-182.
- MALLET J., 1995. A species definition for the modern synthesis. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 294-299.
- MANN R.H.K., 1980. The growth and reproductive strategy of the gudgeon *Gobio gobio* (L.), in two hard-water rivers in southern England. *J. Fish Biol.*, 17: 163-176.
- MANN R.H.K., 1996. Fisheries and economics. *In:* Pike: Biology and exploitation (J.F. Craig, Ed.), Fish and Fisheries Series 19, pp. 219-241, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall.
- MANNÉ S. & POULET N., 2008. First record of the western tubenose goby *Proterorhinus semilunaris* (Heckel, 1837) in France. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.*, 389(3): 1-5.
- MANNÉ S., POULET N. & DEMBSKI S., 2013. Colonisation of the Rhine basin by non-native gobiids: an update of the situation in France. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.*, 411(2): 1-17.
- MARTINO A., 2012. Ecologie trophique des poissons top-prédateurs interactions entre espèces natives et introduites au sein d'écosystèmes dulçaquicoles. 126 p. Université de Toulouse 3 Paul Sabatier : PhD thesis.
- MARZIN A., VERDONSCHOT P.F.M. & PONT D., 2013. The relative influence of catchment, riparian corridor, and reach-scale anthropogenic pressures on fish and macroinvertebrate assemblages in French rivers. *Hydrobiologia*, 704: 375-388.
- MASTERS J.C., RAYNER R.J., MCKAY I.J., POTTS A.D., NAILS D., FERGUSON J.W., WEISSENBACHER B.K., ALLSOPP M. & ANDERSON M.L., 1987. The concept of species: Recognition *versus* isolation. *S. Afr. J. Sci.*, 83: 534-537.
- MASTRORILLO S., DAUBA F. & BELAUD A., 1996. Utilisation des microhabitats par le vairon, le goujon et la loche franche dans trois rivières du sud-ouest de la France. *Annls. Limnol.*, 32: 185-195.
- MATHEWS C.P., 1971. Contribution of youn fish to total production of fish in the River Thames near Reading. *J. Fish Biol.*, 3: 157-180.
- MAUDUYT F., 1848. Ichthyologie de la Vienne, ou tableau méthodique et descriptif des poissons qui vivent habituellement dans les eaux de ce département ou qui y remontent périodiquement et accidentellement. *Bulletin Société Academique d'Agriculture, Belles-Lettes, Sciences et Arts de Poitiers*, 3: 8-49.
- MAY R.M., 1990. Taxonomy as destiny. *Nature*, 347: 129-130.
- MAYDEN R.L., 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. *In*: Species: The units of biodiversity (M.F. Claridge, H.A. Dawah & M.R. Wilson, Eds.). pp 381–424. London: Chapman and Hall.
- MAYDEN R.L., 2002. On biological species, species concepts and individuation in the natural world. *Fish Fish.*, 3: 171-196.
- MAYR E., 1942. Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist. 334 p. New York: Columbia University Press.
- MAYR E., 1982. Microtaxonomy, the science of species. *In*: The Growth of Biological Thought (E. Mayr, Ed.). pp. 251-300. Cambridge, London: Belknap Press of Harvard University Press.
- MAYR E., 2000. A Critique from the Biological Species Concept Perspective: What Is a Species, and What Is Not? *In*: Species concepts and phylogenetic theory a debate (Q.D. Wheeler & R. Meier, Eds.), pp. 93-100, New York: Columbia University Press.

- MCKELVEY B., 1982. Oraganizational systematics. Taxonomy, Evolution, Classification. 463 p. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press
- MCKINNON J.S. & RUNDLE H.D., 2002. Speciation in nature: the threespine stickleback model systems. *Trends Ecol. Evol.*, 17: 480-488.
- MCLENNAN D.A., 1995. Male mate choice based upon female nuptial coloration in the brook stickleback, *Culea inconstans* (Kirtland). *Anim. Behav.*, 50: 213-221.
- MEIER R., 2009. DNA sequences in taxonomy: Opportunity and challenges. *In*: The new taxonomy (Q. Wheeler, Ed.). pp. 95-127. New York: CRC Press.
- MEIER R. & WILLMANN, 2000. The Hennigian species concept. *In*: Species concepts and phylogenetic theory (Q.D. Wheeler & R. Meier, Eds.). pp. 30-43. New York: Columbia University Press.
- MEIN P., MEON H., ROMAGGI J.P. & SAMUEL E., 1983. La vie en Ardèche au Miocène supérieur d'après les documents trouvés dans la carrière de la montagne d'Andance. *Nouv. Arch. Mus. Hist. Nat. Lyon*, suppl. 21: 37-44.
- MENDEL J., LUSKOVÁ V., HALAČKA K., LUSK S. & VETEŠNÍK L., 2005. Genetic diversity of *Gobio gobio* populations in the Czech Republic and Slovakia, based on RAPD markers. *Folia Zool.*, 54 Suppl. 1: 13-24.
- MENDEL J., LUSK S., VASIL'EVA E.D., VASIL'EV V.P., LUSKOVÁ V., ERK'AKAN F., RUCHIN A., KOŠČO J., VETEŠNÍK L., HALAČKA K., ŠANDA R., PASHKOV A.N. & RESHETNIKOV S.I., 2008. Molecular phylogeny of the genus *Gobio* Cuvier, 1816 (Teleostei: Cyprinidae) and its contribution to taxonomy. *Mol. Phyl. Evol.*, 47: 1061-1075.
- MENDEL J., MAREŠOVÁ E., PAPOUŠEK I., HALAČKA K., VETEŠNÍK L., ŠANDA R., KONIČKOVÁ M. & URBÁNIKOVÁ S., 2012. Molecular Biodiversity Inventory of the Ichthyofauna of the Czech Republic. *In*: Analysis of Genetic Variation in Animals (M. Caliskan, Ed.). pp. 287-314. Rijeka: InTech.
- MERILÄ J., 2013. Nine-spines stickleback (*Pungitius pungitius*): an emerging model for evolutionary biology research. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1289: 18-35.
- MEUSNIER I., SINGER G.A.C., LANDRY J.-F., HICKEY D.A., HEBERT P.D.N. & HAJIBABAEI M., 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9: 1-4.
- MILLER L.M. & SENANAN W., 2003. A Review of Northern Pike Population Genetics Research and its Implications for Management. *N. Am. J. Fish. Manage.*, 23: 297-306.
- MICHENER C.D., 1970. Diverse approaches to systematics. Evol. Biol., 4: 1-38.
- MICHON L., RONALD T., VAN BALEN R.T., MERLE O., & PAGNIER H., 2003. The Cenozoic evolution of the Roer Valley Rift System integrated at a European scale. *Tectonophysics*, 367: 101-126.
- MILLET P.-A., 1828. Faune de Maine et Loire, ou, Description méthodique des animaux qu'on rencontre dans toute l'étendue du département de Maine et Loire. 773 p. Paris : Rosier, Angers : L. Pavie.
- MISHLER B.D., 1985. The morphological, developmental, and phylogenetic basis of species concepts in bryophytes. *Bryologist*, 88: 207-214.
- MIYA M. & NISHIDA M., 2015. The mitogenomic contributions to molecular phylogenetics and evolution of fishes: a 15-year retrospect. *Ichthyol. Res.*, 62: 29-71
- MIYAGI R. & TERAI Y., 2013. The diversity of male nuptial coloration leads to species diversity in Lake Victoria cichlids. *Genes Genet. Syst.*, 88: 145-153.

- MÖDDEN C., SCHÄFER C., REICHENBACHER B., SCHWARZ J. & KADOLSKY D., 2000. Säugetiere, Fisch-Otolithen, Ostracoden, Mollusken und Charophyten aus den Süsswasser-Schichten (Oligozän) von Wolfsheim im Mainzer Becken. *Paläont*. *Z.*, 74: 343-361.
- MOLOFSKY J., BEVER J.D. & ANTONOVICS J., 2001. Coexistaence under positive frequency dependence. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268: 273-277.
- MOREAU E., 1881-1891. Histoire naturelle des poissons de la France. 4 vol. Paris : Masson.
- MOREAU E., 1892. Manuel d'ichtyologie française. 650 p. Paris: Masson.
- MOREAU E., 1899. Les poissons du département de l'Yonne. 227 p. Auxerre: Imprimerie de la constitution.
- MÜLLER G. & WARD P.I., 1995. Parasitism and heterozygosity influence the secondary sexual characters of the European Minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.) (Cyprinidae). *Ethology*, 100: 309-319.
- MÜNZING J., 1963. The evolution of variation and distributional patterns in European populations of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Evolution*, 17: 320-332.
- MÜNZING J., 1969. Variabilität, Verbreitung und Systematik der Arten und Unterarten der Gattung *Pungitius* Coste, 1848 (Pisces, Gasterosteidae). *Zeit. Zool. Syst. Evol.*, 7: 208-233.
- MURIENNE J., JEZIORSKI C., HOLOTA H., COISSAC E., BLANCHET S. & GRENOUILLET G., 2015. PCR-free shotgun sequencing of the stone loach mitochondrial genome (*Barbatula barbatula*). *Mitoch. DNA*, in press.
- MYERS G.S., 1938. Freshwater fishes and West Indian zoogeography. *Ann. Report Smithsonian Inst.*, 1937: 339-364.

#### N

- NASEKA A.M., ERK'AKAN F. & KÜÇÜK F., 2006. A description of two new species of the genus *Gobio* from Central Anatolia (Turkey) (Teleostei: Cyprinidae). *Zoosyst. Rossica*, 15: 185-194.
- NELSON G. & PLATNICK N.I., 1981. Systematics and biogeography: cladistics and vicariance. 567 p. New York: Columbia University Press.
- NEUHAUSS S.C.F., 2003. Behavioral Genetic Approaches to Visual System Development and Function in Zebrafish. *J. Neuobiol.*, 54: 148-160.
- NICOD J.-C., WANG Y.Z., EXCOFFIER E. & LARGIADÈR C.R., 2004. Low levels of mitochondrial DNA variation among central and southern European *Esox lucius* populations. *J. Fish Biol.*, 64: 1442-1449.
- NILSSON P.A., SKOV C. & FARRELL J.M., 2008. Current and future directions for pike ecology and management: a summary and synthesis. *Hydrobiologia*, 601: 137-141.
- NIXON K.C. & WHEELER Q.D., 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics*, 6: 211-223.
- NOLTE A.W. & TAUTZ D., 2010. Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends Genet.*, 26: 54-58.
- NOLTE A.W., FREYHOF J., STEMSHORN K.C. & TAUTZ D., 2005. An invasive lineage of sculpins, *Cottus* sp. (Pisces, Teleostei) in the Rhine with new habitat adaptations has originated from hybridization between old phylogeographic groups. *Proc. R. Soc. B*, 272: 2379-2387.

- NOLTE A.W., FREYHOF J. & TAUTZ D., 2006. When invaders meet locally adapted types: rapid moulding of hybrid zones between two species of sculpins (*Cottus*, pisces) in the Rhine system. *Mol. Ecol.*, 15: 1983-1993.
- NOLTE A.W., GOMPERT Z. & BUERKLE C.A. 2009. Variable patterns of introgression in two sculpin hybrid zones suggest that genomic isolation differs among populations. *Mol. Ecol.*, 18: 2615-2627.
- NOWAK M., KOŠČO J. & POPEK W., 2008. Review of the current status of systematics of gudgeons (Gobioninae, Cyprinidae) in Europe. *ACCL BIOFLUX*, 1: 27-38.

O

- OBERDORFF T., GUILBERT E. & LUCCHETTA J.-C., 1993. Patterns of fish species richness in the Seine River basin, France. *Hydrobiologia*, 259: 157-167.
- OBERDORFF T., GUEGAN J.F. & HUGUENY B., 1995. Global scale patterns of fish species richness in rivers. *Ecography*, 18: 345–352.
- OBERDORFF T., LEK S. & GUEGAN J.F., 1999. Patterns of endemism in riverine fish of the Northern Hemisphere. *Ecol. Lett.*, 2: 75–81.
- OBERDORFF T., PONT D., HUGUENY B. & CHESSEL D., 2001. A probabilistic model characterizing fish assemblages of French rivers: aframework for environmental assessment. *Freshwater Biol.*, 46: 399-415.
- OBERDORFF T., PONT D., HUGUENY B., BELLIARD J., BERREBI DIT THOMAS T. & PORCHER J.P., 2002. Adaptation et validation d'un indice poisson (FBI) pour l'évaluation de la qualité biologique des cours d'eau français. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 365/366: 405-433.
- OBERDORFF T., TEDESCO P.A., HUGUENY B., LEPRIEUR F., BEAUCHARD O., BROSSE S. & DÜRR H.H., 2011. Global and Regional Patterns in Riverine Fish Species Richness: A Review. *Int. J. Ecol.*, 12, Article ID 967631.
- OGERIEN L.F., 1863. Histoire naturelle du Jura et des départements voisins, Tome III. 570 p. Zoologie vivante, Paris: Masson.
- ORTÍ G., BELL M.A., REIMCHEN T.E. & MEYER A., 1994. Global Survey of Mitochondrial DNA Sequences in the Threespine Stickleback: Evidence for Recent Migrations. *Evolution*, 48, 3: 608-622.
- OSCOZ J., LEUNDA P.M., MIRANDA R. & ESCALA M.C., 2006. Summer feeding relationships of the co-occuring *Phoxinus phoxinus* and *Gobio lozanoi* (Cyprinidae) in an Iberian river. *Folia Zool.*, 55: 418-432.
- ØSTBYE K., BERNATCHEZ L., NÆSJE T.F., HIMBERG K.-J.M. & HINDAR K., 2005. Evolutionary history of the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) species complex as inferred from mtDNA phylogeography and gill-raker numbers. *Mol. Ecol.*, 14: 4371-4387.
- OUELLET-CAUCHON G., NORMANDEAU E., MINGELBIER M. & BERNATCHEZ L., 2014. EST-based microsatellites for northern pike (*Esox lucius*) and cross-amplification across all *Esox* species. *Conserv. Genet. Res.*, 6: 451-454.

P

- PADIAL J.M., CASTROVIEJO-FISHER S., KÖHLER J., VILÁ C., CHAPARRO J.C. & DE LA RIVA I., 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zool. Scripta*, 38: 431–447.
- PADIAL J.M. & DE LA RIVA I., 2010. A response to recent proposals for integrative taxonomy. *Biol. J. Linnean Soc.*, 101: 747-756.

- PADIAL J.M., MIRALLES A., DE LA RIVA I. & VENCES M., 2010. The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.*, 7: 1-16.
- PALANDAČIĆ A., BRAVNIČAR J., ZUPANČIČ P., ŠANDA R. & SNOJ A., 2015. Molecular data suggest a pultispecies complex *Phoxinus* (Cyprinidae) in the Western Balkan Peninsula. *Mol. Phyl. Evol.*, 92: 118-123.
- PANTE E., PUILLANDRE N., VIRICEL A., ARNAUD-HAOND S., AURELLE D., CASTELIN M., CHENUIL A., DESTOMBE C., FORCIOLI D., VALERO M., VIARD F. & SAMADI S., 2015a. Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Mol. Ecol.*, 24: 525-544.
- PANTE E., SCHOELINCK S. & PUILLANDRE N., 2015b. From Integrative Taxonomy to Species Description: One Step Beyond. *Syst. Biol.*, 64: 152-160.
- PARK Y.-S., GRENOUILLET G., ESPERANCE B. & LEK S., 2006. Stream fish assemblages and basin land cover in a river network. *Sci. Total Environ.*, 365: 140-153.
- PAŚKO L., KUSZNIERZ J., MAŚLAK R., TAGAYEV D., SERGIEL A., PIETRAS-LEBIODA A. & BORCZYK B., 2014. Morphometric exploration of diversity of the Eurasian minnow *Phoxinus phoxinus*: a case study of a widely distributed Palaearctic fish. *Ann. Zool. Fennici*, 51: 399-412.
- PASSERAT C., 1911. Les origins de la vallée de la Charente. Ann. Géo., 20: 213-232.
- PATERSON H.E.H., 1985. The recognition concept of species. *In*: Species and speciation (E.S. Vrba, Ed.). pp. 21-29. Pretoria: Transvaal Museum.
- PAUERS M.J., 2010. Species concepts, speciation, and taxonomic change in the Lake Malawi mbuna, with special reference to the genus *Labeothropheus* Ahl 1927 (Perciformes: Cichlidae). *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 20: 187-202.
- PAULS S.U., ALP M., BÁLINT M., BERNABÒ P., ČIAMPOR F. JR, ČIAMPOROVÁ-ZAŤOVIČOVÁ Z., FINN D.S., KOHOUT J., LEESE F., LENCIONI V., PAZ-VINAS I. & MONAGHAN M.T., 2014. Integrating molecular tools into freshwater ecology: Developments and opportunities. *Freshwater Biol.*, 59: 1559-1576.
- PEDROLI J.-C., ZAUGG B. & KIRCHHOFER A., 1991. Verbreitungsatlas der Fische und Rundmäuler der Schweiz. *Doc. Faun. Helv.*, 11: 1-207.
- PEREA S., BÖHME M., ZUPANCIC P., FREYHOF J., SANDA R., ÖZULUG M., ABDOLI A. & DOADRIO I., 2010. Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evol. Biol.*, 10: 1-27.
- PEREIRA L.H.G., MAIA G.M.G., HANNER R., FORESTI F. & OLIVEIRA C., 2011. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondr. DNA*, 22: 71–79.
- PERRIER R., 1934. La faune de la France en tableaux synoptiques illustrés. Tome 10, Vertébrés. 214 p. Paris: Delagrave.
- PERSAT H., OLIVIER J.-M. & PONT D., 1994. Theoretical habitat templets, species traits, and species richness: fish in the Upper Rhône and its floodplain. *Freshwater Biol.*, 31: 439-454.
- PERSAT H., BEAUDOU D. & FREYHOF J., 1996. The sculpin of the Lez spring (South France), *Cottus petiti* (Bacescu and Bacescu-Mester, 1964), one of the most threatened fish species in Europe. *In:* Conservation of Endangered Freshwater Fish in Europe (A. Kirchhofer & D. Hefti, Eds.), pp. 321-328, Basel, Boston: Birkhauser Verlag.

- PERSAT H. & KEITH P., 1997. La répartition géographique des poissons d'eau douce en France: qui est autochtone et qui ne l'est pas? *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 344/345: 15-32.
- PERSAT H. & KEITH P., 2011. Biogéographie et historique de la mise en place des peuplements ichtyologiques de France métropolitaine. *In:* Les Poissons d'eau douce de France (P. Keith, H. Persat, E. Feunteun, J. Allardi, Eds.), pp. 37-93, Collection Inventaires & biodiversité, Mèze : Biotope Editions, Paris : Publications scientifiques du Muséum.
- PICKETT K.M., 2005a. The new and improved PhyloCode, now with types, ranks, and even polyphyly: a conference report from the First International Phylogenetic Nomenclature Meeting. *Cladistics*, 21: 79-82.
- PICKETT K.M., 2005b. Is the PhyloCode now roughly analogous to the actual codes? A reply to Laurin et al. *Cladistics*, 21: 608-610.
- PINON P., 1995. Canaux, Rivières des hommes. 143 p. Paris : Rempart.
- PIQUÈS G., HÄNNI C. & SILVINO T., 2008. L'approvisionnement de Lugdunum en poissons au IIIe siècle : les données de la fouille du Parc Saint-Georges (Lyon, France). *In:* Archéologie du poisson, 30 ans d'ichtyologie au CNRS (P. Béarez, S. Grouard, B. Clavel Eds.). pp. 255-268. Antibes: ADPCA.
- PIRES A.C. & MARINONI L., 2010. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotrop.*, 10: 339-346.
- PISSART A., 1961. Les terrasses de la Meuse et de la Semois. La capture de la Meuse lorraine par la Meuse de Dinant. *Ann. Soc. Géol. Belg.*, 84: 1-108.
- PISSART A., 1974. La Meuse en France et en Belgique. *In:* L'évolution quaternaire des bassins fluviaux de la Mer du Nord méridionale. pp. 105-131. Liège: Annales de la Société géologique de Belgique.
- PISSART A., HARMAND D. & KROOK L., 1997. L'évolution de la Meuse de Toul à Maastricht depuis le Miocène : corrélations chronologiques et traces des captures de la Meuse lorraine d'après les minéraux denses. *Géogr. Phys. Quatern.*, 51: 267-284.
- PITON L., 1931. Faune de l'Auvergne, Poissons : Famille des Cyprinidés. *Bull. Soc. Hist. Nat. Auvergne*, 17: 1-11.
- POMEROL C., 1973 Stratigraphie et Paléographie. Ere Cénozoïque (Tertiaire et Quaternaire). 269 p. Paris: Doin.
- POMEROL C., 1982 The Cenozoic Era, Tertiary and Quaternary. 272 p. Chichester: Ellis Horwood.
- POMPANON F. & SAMADI S., 2015. Next generation sequencing for characterizing biodiversity: promises and challenges. *Genetica*, 143: 133-138.
- PONS J., BARRACLOUGH T., GOMEZ-ZURITA J., CARDOSO A., DURAN D., HAZLL S., KAMOUN S., SUMLIN W.D. & VOGLER A.P., 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst. Biol.*, 55: 595–609.
- PONT D., HUGUENY B. & ROGERS C., 2007. Development of a fish-based index for the assessment of river health in Europe: the European Fish Index. *Fish. Manage. Ecol.*, 14: 427-439.
- PRIOUX G.M., 1952. La pêche au coup. *In*: Le grand livre de la pêche et des poissons (E. Dottrens & T. Burnand, Eds.). pp. 151-176. Monaco: Union européenne d'éditions; Paris, Bruxelles, Genève, Zurich: R. Kister & G. Schmid.
- PRUVOST P., CAUSSE R. & MURAIL J.-F., 1996. Gicim, relational database for management of MNHN fish collection, Muséum National d'Histoire Naturelle.

- Disponible sur le site : https://science.mnhn.fr/institution/mnhn/collection/ic/item/search/form
- PUILLANDRE N., BOUCHET P., BOISSELIER-DUBAYLE M.-C., BRISSET J., BUGE B., CASTELIN M., CHAGNOUX S., CHRISTOPHE T., CORBARI L., LAMBOURDIERE J., LOZOUET P., MARANI G., RIVASSEAU A., SILVA N., TERRYN Y., TILLIER S., UTGE J. & SAMADI S., 2012a. New taxonomy and old collections: integrating DNA barcoding into the collection curation process. *Mol. Ecol. Res.*, 12: 396-402.
- PUILLANDRE N., LAMBERT A., BROUILLET D. & ACHAZ G., 2012b. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.*, 21: 1864-1877.

Q

QUICKE D.L.J., 1993. – Principles and techniques of contemporary taxonomy. 311 p. New York: Blackie Academic & Professional.

R

- R CORE TEAM, 2014. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. http://www.R-project.org/. Accessed 12 février 2014.
- RAAT A.J.P., 1988. Synopsis of biological data on the northern pike *Esox lucius* Linnaeus, 1758, FAO Fisheries Synopsis, No. 30. 179 p. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- RADWAN J., 2008. Maintenance of genetic variation in sexual ornaments: a review of the mechanisms. *Genetica*, 134: 113-127.
- RAEYMAEKERS J.A.M., VAN HOUDT J.K.J., LARMUSEAU M.H.D., GELDOF S. & VOLCKAERT F.A.M., 2007. Divergent selection as revealed by  $P_{\rm ST}$  and QTL-based  $F_{\rm ST}$  in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations along a coastal-inland gradient. *Mol. Ecol.*, 16: 891-905.
- RAMLER D., DELMASTRO G.B., PALANDACIC A., AHNELT H. & MIKSCHI E., 2015. Geometric morphometrics as a tool to discover phenotypical divergence. Biodiversity in the Mediterranean Basin. Koper, Slovénie, Mars 2015.
- RATNASINGHAM S. & HEBERT P.D.N., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes*, 7: 355-364.
- RATNASINGHAM S. & HEBERT P.D.N., 2013. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*, 8: e66213.
- RAVERET-WATTEL C., 1900. Atlas de poche des poissons d'eau douce de la France, de la Suisse Romande et de la Belgique : avec leur description, mœurs et organisation, suivi d'un appendice sur les crustacés, mollusques, etc., les plus répandus dans les mêmes eaux. 165 p. Paris: P. Klincksieck.
- RAXWORTHY C.J., INGRAM C.M., RABIBISOA N. & PEARSON R.G., 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Syst. Biol.*, 56: 907–923.
- RESHETNIKOV Y.S., BOGUTSKAYA N., VASILIEVA E.D., DOROFEYEVA E.A., NASEKA A., POPOVA O.A., SAWAITOVA K.A., SIDELEVA V.G. & SOKOLOV L.I., 1997. An annotated check-list of the freshwater fishes of Russia (en Russe). *J. Ichthyol.*, 37: 723-771.
- REHBEIN H., 2013. Differentiation of fish species by PCR-based DNA analysis of nuclear genes. *Europ. Food Res. Technol.*, 236: 979-990.

- REIBER F., 1888. L'histoire naturelle des eaux strabourgeoises de Léonard Baldner (1666), et Catalogue des poissons observés en Alsace, et surtout aux environs de Strasbourg. *Bull. Soc. Hist. Nat. Colmar*, 27-29: 3-132.
- REICHENBACHER B., 2004. A partly endemic euryhaline fish fauna (otoliths, teeth) from the Early Miocene of the Aix-Basin (Provence, southern France). *Cour. Forsch. Inst. Senckenberg*, 246: 113-127.
- REICHENBACHER B. & WEIDMANN M., 1992. Fisch-Otolithen aus der oligo-/miozänen Molasse der West-Schweiz und der Haut-Savoie (Frankreich). *Stutt. Beit. Naturk.*, B, 184: 1-83.
- ŘEPA P. & PIVNIČKA K., 1980. Morphologische Variabilität der Elritze (*Phoxinus phoxinus*) (Pisces: Cyprinidae). *Vestn. Cesk. Spol. Zool.*, 44: 68-80.
- REY O., FORTUNE L., PAZ-VINAS I., LOOT G., VEYSSIERE C., ROCHE B. & BLANCHET S., 2015. Elucidating the spatio-temporal dynamics of an emerging wildlife pathogen using approximate Bayesian computation. *Mol. Ecol.*, in press.
- REYJOL Y., HUGUENY B., PONT D., BIANCO P.G., BEIER U., CAIOLA N., CASALS F., COWX I., ECONOMOU A., FERREIRA T., HAIDVOGL G., NOBLE R., DE SOSTOA A., VIGNERON T. & VIRBICKAS T., 2007. Patterns in species richness and endemism of European freshwater fish. *Global Ecol. Biogeogr.*, 16: 65-75.
- RIBEIRO F. & LEUNDA P.M., 2012. Non-native fish impacts on Mediterranean freshwater ecosystems: current knowledge and research needs. *Fish. Manag. Ecol.*, 19: 142-156.
- RIDE W.D.L., COGGER H.G., DUPUIS C., KRAUS O., MINELLI A., THOMPSON F.C. & TUBBS P.K., 1999. International Code of Zoological Nomenclature. 4th edn. 306 pp. London: The Natural History Museum.
- RIDLEY M., 1989. The cladistics solution to the species problem. *Biol. Philos.*, 4:1-16.
- RISSO A., 1810. Ichthyologie de Nice, ou, Histoire naturelle des poissons du département des Alpes Maritimes. 388 p. Paris: F. Schoell.
- RISSO A., 1826. Histoire naturelle des principales productions de l'Europe méridionale et particulièrement de celles des environs de Nice et des Alpes Maritimes. 5 vol. Paris: F.-G Levrault.
- ROCHA L.A., ROBERTSON R.D., ROCHA C.R., TASSELL J.L., CRAIG M.T. & BOWEN B.W., 2005. Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Mol. Ecol.*, 14: 3921-3928.
- ROHLF F.J. & MARCUS L.F., 1993. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* (TREE), 8: 129-132.
- RONDELET G., 1558. L'histoire entière des poissons. *In*: Meunier, F.J. (Ed.) 2002. 637 p. Paris: Collection CTHS sciences.
- RONQUIST F., TESLENKO M., VAN DER MARK P., AYRES D.L., DARLING A., HÖHNA S., LARGET B., LIU L., SUCHARD M.A. & HUELSENBECK J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Syst. Biol.*, 61: 539-542.
- ROSELLÓ-IZQUIERDO E., BARGANZA-GOCHI E., NORES-QUESADA C. & MORALES-MUÑIZ A., 2015. Santa Catalina (Lequeitio, Basque Country): An ecological and cultural insight into the nature of prehistoric fishing in Cantabrian Spain. *J. Archaeol. Sci. Reports*, in press.
- ROSEN D.E., 1979. Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 162: 267-376.

- ROSENBAUM G., LISTER G.S. & DUBOZ C., 2002. Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene. *J. Virtual Expl.*, 8: 107-126.
- ROULE L., 1925. Les poissons des eaux douces de la France : manuel descriptif illustré. 228 p. Paris : Presses Universitaires de France.
- ROWLAND W.J., BAUBE C.L. & HORAN T.T., 1991. Signalling of sexual receptivity by pigmentation pattern in femal sticklebacks. *Anim. Behav.*, 42: 243-249.
- RUTTE E., 1962. Schlundzähne von Süsswasserfischen. *Palaeontographica*, A 120: 211-227.

S

- SACH V., GAUDANT J., REICHENBACHER B. & BÖHME M., 2003. Die Fischfaunen der Fundstellen Edelbeuren-Mauerkopf und Wannenwaldtobel 2 (Miozän, Oberen Süsswassermolasse, SW-Deutschland). *Stuttg. Beit. Naturk.*, 334: 1-25.
- SAITOH K., SADO T., MAYDEN R.L., HANZAWA N., NAKAMURA K., NISHIDA M. & MIYA M., 2006. Mitogenomic Evolution and Interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): The First Evidence Toward Resolution of Higher-Level Relationships of the World's Largest Freshwater Fish Clade Based on 59 Whole Mitogenome Sequences. *J. Mol. Evol.*, 63: 826-841.
- SANGER F. & COULSON A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 94: 441-446.
- SANGER F., NICKLEN S. & COULSON A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- SANJUR O.I., CARMONA J.A. & DOADRIO I., 2003. Evolutionary and biogeographical patterns within Iberian populations of the genus Squalius inferred from molecular data. *Mol. Phyl. Evol.*, 29: 20-30.
- SANTOUL F., CAYROU J., MASTRORILLO S. & CEREGHINO R., 2005. Spatial patterns of the biological traits of freshwater fish communities in south-west France. *J. Fish Biol.*, 66: 301-314.
- SANE N., ARAGUAS R.M., VIDAL O. & VIÑAS J., 2015. Glacial refuges for three-spined stickleback in the Iberian Peninsula: mitochondrial DNA phylogeography. *Freshwater Biol.*, 60: 1794-1809.
- SCHLICK-STEINER B., STEINER F.M., SEIFERT B., STAUFFER C., CHRISTIAN E. & CROIZIER R.H., 2010. Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploting Biodiversity. *Annu. Rev. Entomol.*, 55: 421-438.
- SCHLICK-STEINER B., ARTHOFER W. & STEINER F.M., 2014. Take up the challenge! Opportunities for evolution research from resolving conflict in integrative taxonomy. *Mol Ecol.*, 23: 4192-4194.
- SCHEIBER A., 2002. Differences in levels of heterozygosity in populations of the common gudgeon (*Gobio gobio*, Cyprinidae) among adjacent drainages in Central Europe: an effect of postglacial range dynamics?. *Heredity*, 89: 163-170.
- SCHÖFFMANN J., SUŠNIK S. & SNOJ A., 2007. Phylogenetic origin of *Salmo trutta* L 1758 from Sicily, based on mitochondrial and nuclear DNA analyses. *Hydrobiologia*, 575: 51-55.
- SCRIBNER K.T., PAGE K.S. & BARTRON M.L., 2001. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 10: 293–323.

- SEBERG O., HUMPHRIES C.J., KNAPP S., STEVENSON D.W., PETERSEN G., SCHARFF N. & ANDERSEN N.M., 2003. Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 63-65.
- ŠEDIVÁ A., JANKO K., ŠLECHTOVÁ V., KOTLÍK P., SIMONOVIĆ P., DELIC A. & VASSILEV M., 2008. Around or across the Carpathians: colonization model of the Danube basin inferred from genetic diversification of stone loach (Barbatula barbatula) populations. *Mol. Ecol.*, 17: 1277-1292.
- SEIFERTOVÁ M., BRYJA J., VYSKOČILOVÁ M., MARTÍNKOVÁ N. & ŠIMKOVÁ A., 2012. Multiple Pleistocene refugia and post-glacial colonization in the European chub (*Squalius cephalus*) revealed by combined use of nuclear and mitochondrial markers. *J. Biogeogr.*, 39: 1024-1040.
- SENANAN W. & KAPUSCINSKI A.R., 2000. Genetic relationships among populations of northern pike (Esox lucius). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 57: 391-404.
- SEVILLA R.G., DIEZ A., NORÉN M., MOUCHEL O., JÉRÔME M., VERREZ-BAGNIS V., VAN PELT H., FAVRE-KREY L., KREY G., THE FISHTRACE CONSORTIUM & BAUTISTA J.M., 2007. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Mol. Ecol. Res.*, 7: 730-734.
- SHENDURE J. & JI H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.*, 26: 1035–1045.
- SIMPSON G.G., 1951. The species concept. Evolution, 5: 285–298.
- SKOG A., VØLLESTAD L.A., STENSETH N.C., KASUMYAN A. & JAKOBSEN K.S., 2014. Circumpolar phylogeography of the northern pike (*Esox lucius*) and its relationship to the Amur pike (*E. reichertii*). *Front. Zool.*, 11: 67.
- ŠLECHTOVÁ V., LUSKOVÁ V., ŠLECHTA V., HALAČKA K., LUSK, S. & KOŠČO J., 2005. Intraspecific allozyme diversity of *Gobio gobio* in Czech and Slovak rivers. *Folia Zool.*, 54 Suppl. 1: 25-32.
- SNEATH P.H.A. & SOKAL R.R., 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. 573 p. San Francisco: Freeman W.H.
- SOKAL R.R. & CROVELLO T.J., 1970. The biological species concept: A critical evaluation. *Am. Nat.*, 104: 127-153.
- SOKAL R.R. & ROHLF F.J., 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 887 p. New York: W.H. Freeman.
- SONNENBERG R., NOLTE A.W. & TAUTZ D., 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Front. Zool.*, 4: 6.
- SOUSA-SANTOS C., ROBALO J.I., COLLARES-PEREIRA M.-J. & ALMADA V.C., 2005. Heterozygous indels as useful tools in the reconstruction of DNA sequences and in the assessment of ploidy level and genomic constitution of hybrid organisms. *DNA Seq.*, 16: 462-467.
- SPILLMANN C.J., 1958. Sur deux poissons des collections du Muséum, témoins de l'existence au XIXème siècle, dans le lac Léman, de corégones du type « dispersus ». *Bull. Mus. Nat. Hist. Nat. Paris Série 2*, 30 : 144-145.
- SPILLMANN C.J., 1961. Faune de France, Poissons d'eau douce de France. 303 p. Paris: P. Lechevalier.
- STEMSHORN K.C., REED F.A., NOLTE A.W. & TAUTZ D., 2011. Rapid formation of distinct hybrid lineages after secondary contact of two fish species (*Cottus* sp.). *Mol. Ecol.*, 20: 1475-1491.
- STEPHENS M., SMITH N.J. & DONNELLY P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 978–989.

- STEPIEN C.A. & HAPONSKI A.E., 2015. Taxonomy, Distribution, and Evolution of the Percidae. *In*: Biology and Culture of Percid Fishes: Principles and Practices (P. Kestemont, K. Dabrowski & R.C. Summerfelt, Eds.). pp 3-60. Dordrecht: Springer.
- STOECKLE M., 2003. Taxonomy, DNA, and Bar Code of Life. *BioScience*, 53: 796-797.
- STROHM J.H.T., GWIAZDOWSKI R.A. & HANNER R., 2015. Mitogenome metadata: current trends and proposed standards. *Mitoch. DNA*, in press.

# T

- TABERLET P., COISSAC E., POMPANON F., BROCHMANN C. & WILLERSLEV E., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.*, 21: 2045-2050.
- TAKÁCS P., BIHARI P., ERÖS T., SPECZIÁR A., SZIVÁK I., BÍRÓ P. & CSOMA E., 2014. Genetic Heterogeneity Reveals On-Going Speciation and Cryptic Taxonomic Diversity of Stream-Dwelling Gudgeons (Teleostei, Cyprinidae) in the Middle Danubian Hydrosystem (Hungary). *PLoS ONE*, 9: e97278.
- TALES E., KEITH P. & OBERDORFF T., 2004. Density-range size relationships in French riverine fishes. *Oecologia*, 138: 360-370.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M. & KUMAR S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731-2739.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A. & KUMAR S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30: 2725-2729.
- TANCIONI L., RUSSO T., CATAUDELLA S., MILANA V., HETT A.K., CORSI E. & ROSSI A.R., 2013. Testing Species Delimitations in Four Italian Sympatric Leuciscine Fishes in the Tiber River: A Combined Morphological and Molecular Approach. *PLoS ONE*, 8(4): e60392.
- TAUTZ D., ACTANDER P., MINELLI A., THOMAS R.H. & VOGLER A.P., 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, 18, 2: 70-74.
- TAYLOR H.R. & HARRIS W.E., 2012. An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Mol. Ecol. Res.*, 12: 377-388.
- TEDESCO P.A., LEPRIEUR F., HUGUENY B., BROSSE S., DÜRR H.H., BEAUCHARD O., BUSSON F. & OBERDORFF T., 2012. Patterns and processes of global riverine fish endemism. *Global Ecol. Biogeogr.*, 21: 977-987.
- TELETCHEA F., 2010. After 7 years and 1000 citations: Comparative assessment of the DNA barcoding and the DNA taxonomy proposals for taxonomists and non-taxonomists. *Mitoch. DNA*, 21: 206-226.
- TEMPLETON A.R., 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. *In*: Speciation and its consequences (D. Otte & J.A. Endler, Eds.). pp. 3-27. Sunderland, Massachussetts: Sinauer Associates.
- TEMPLETON A.R., 1998. Species and speciation: Geography, population structure, ecology, and gene trees. *In*: Endless forms: Species and speciation (D.J. Howard & S.H. Berlocher, Eds.). pp. 32-43. New York: Oxford University Press.
- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G. & GIBSON T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673–4680.

- THUILLER W., GEORGES D. & ENGLER R., 2013. Biomod2: Ensemble platform for species distribution modelling. R package version 2.1.7. http://CRAN.Rproject.org/package=biomod2.
- TRICARICO E., 2012. A review on pathways and drivers of use regarding non-native freshwater fish introductions in the Mediterranean region. *Fisheries Manag. Ecol.*, 19: 133-141.
- TRICART J., 1949. La partie orientale du basin de Paris: étude morphologique. Vol. 2. Paris: Société d'édition d'enseignement supérieur.
- TRINGE S.G., VON MERING C., KOBAYASHI A., SALAMOV A.A., CHEN K., CHANG H.W., PODAR M., SHORT J.M., MATHUR E.J., DETTER J.C., BORK P., HUGENHOLTZ P., RUBIN E.M., 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308: 554–557.
- TROSCHEL F.G., 1854. Ueber die fossilen Fische aus der Braunkohle des Siebengebirges. Verh. Naturhist. Ver. Rheinlaude, 11: 1-28.
- TURAN D., GÜLER EKMEKÇI F., LUSKOVÁ V. & MENDEL J., 2012. Description of a new species of the genus *Gobio* from Turkey (Teleostei: Cyprinidae). *Zootaxa*, 3257: 56-65.
- TURNER G.F., 1999. What is a fish species? Rev. Fish Biol. Fisher., 9: 281-297.

# U

UICN FRANCE, MNHN, SFI & ONEMA, 2010. – La liste rouge des espèces menaces en France, Chapitre Poissons d'eau douce de France métropolitaine. 12 p. Paris.

#### V

- VALLOT J.N., 1837. Ichthyologie française, ou, Histoire naturelle des poissons d'eau douce de la France. 321 p. Dijon: Imprimerie de E. Frantin.
- VAN VALEN L., 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, 25: 233–239.
- VASIL'EVA E.D., VASIL'EV V.P. & KUGA T.I., 2004. On taxonomy of gudgeons of the genus *Gobio* (Gobioninae, Cyprinidae) of Europe: a new gudgeon species *Gobio kubanicus* from the basin of the Kuban River. *J. Ichthyol.*, 44: 716-731.
- VAWTER L. & BROWN W.M., 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science*, 234: 194-196.
- VIBERT R., 1968. Applications de l'électricité à la biologie et à l'aménagement des pêches continentales. Symposium, Belgrade, mai 1966. 276 p. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- VIBERT R., LAMARQUE P. & CUINAT R., 1960. Tests et indices d'efficacité des appareils de pêche électrique. *Ann. Stat. Centr. Hydrobiol. Appl.*, 8: 53-89.
- VILLATTE DES PRÛGNES R., 1897. Faune de l'arrondissement de Montluçon : les poissons. 52 p. Montluçon: A. Herbin.
- VOGLER A.P. & MONAGHAN M.T., 2007. Recent advances in DNA taxonomy. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 45: 1-10.
- VOLCKAERT F.A.M., HÄNFLING B., HELLEMANS B. & CARVALHO G.R., 2002. Timing oft he population dynamics of bullhead *Cottus gobio* (Teleostei: Cottidae) during the Pleistocene. *J. Evol. Biol.*, 15: 930-944.

# WX

WALTER S., 2013. – Morphologie und Haplotypenverteilung von Phoxinus phoxinus (Linnaeus, 1758) (Pisces: Teleostei: Cyprinidae) in der Sieg. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.

- WANG C., SHIKANO T., PERSAT H. & MERILÄ J., 2015. Mitochondrial phylogeography and cryptic divergence in the stickleback genus *Pungitius*. *J. Biogeogr.*, in press.
- WARD R.D., ZEMLAK T.S., INNES B.H., LAST P.R. & HEBERT P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. London [Biol.]*, 360: 1847-1857.
- WARD R.D., HANNER R. & HEBERT P.D.N., 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J. Fish Biol.*, 74: 329-356.
- WEBB S.A., GRAVES J.A., MACIAS-GARCIA C., MAGURRAN A.E., Ó FOIGHIL D. & RITCHIE M.G., 2004. Molecular phylogeny of the livebearing Goodidae (Cyprinodontiformes). *Mol. Phyl. Evol.*, 30: 527-544.
- WEHRHAHN D., 2010. Automated plasmid DNA purification in 96-well plate and 8-well strip format using the MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® Robot-8/96 Plasmid kits on the epMotion® 5075 from Eppendorf. Eppendorf Application Note, 169: 1-5.
- WEILER W., 1933. Die fische des Steinheimer Beckens. Paleontographica, 8: 1-20.
- WELCOMME R.L., 1988. International Introductions of Inland Aquatic Species. 318 p. FAO Fisheries Technical paper, No. 294. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- WILEY E.O., 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool.*, 27: 17–26
- WILEY E.O. & MAYDEN R.L., 2000. The evolutionary species concept. In: Species concepts and phylogenetic theory a debate (Q.D. Wheeler & R. Meier, Eds.), pp. 70-89, New York: Columbia University Press.
- WILL K.W., MISHLER B.D. & WHEELER Q.D., 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Syst. Biol.*, 54: 844-851.
- WILLMANN R., 1989. Evolutionary or biological species. *Abh. Natwiss. Ver. Hambg.*, 28: 95–110.
- WILSON E.O., 2000. A Global Biodiversity Map. Science, 289: 2279.
- WINNEPENNINCKX B., BACKELJAU T. & WACHTER R.D., 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet.*, 9: 407.
- WINSTON J.E., 1999. Describing species: practical taxonomic procedure for biologists. 518 p. New York: Columbia University Press.
- WITKOWSKI A & ROGOWSKA M., 1992. Breeding tubercles in some European cyprinid fishes (Osteichthyes, Cypriniformes: Cyprinidae). *Zool. Abh. Dresden*, 46: 131-156.
- WHITTAKER R.H., LEVIN S.A. & ROOT R.B., 1973. Niche, habitat and ecotope. *Am. Nat.*, 107: 321-338.
- WHITTAKER R.J., 1998. Island biogeography: ecology, evolution, and conservation. 285 p. Oxford, New York: Oxford University Press.
- WOLTMANN I.A. & BERG M., 2013. Morphologie, Morphometrie und Verbreitung von Gasterosteus spec. in Nordwestdeutschland. 10. Tagung der Gesellschaft für Ichthyologie (GfI), Bonn, conference abstract: 46.
- WOOLLER M.J., GAGLIOTI B., FULTON T.L., LOPEZ A. & SHAPIRO B., 2015. Niche, habitat and ecotope. *Quat. Sci. Rev.*, 120: 118-125.
- WOOTTON R.J., 1984. The functional Biology of the Sticklebacks. 300 p. London: Academic Press.
- WRIGHT S., 1940. The statistical consequences of Mendelian heredity in relation to speciation. *In*: The new systematics (J. Huxley, Ed.). pp. 161-183. London: Oxford University Press.

#### Y

- YAKOVLEV V.N., SLYN'KO Y.V., GRECHANOV I.G. & KRYSANOV E.Y., 2000. Distant hybridization in fish. *J. Ichthyol.*, 40: 298–311.
- YANG Z., 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. *J. Mol. Evol.*, 39: 306-314.
- YANG Z. & RANNALA B., 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 9264-9269.
- YOU Y., HUBER M., MÜLLER R.D., POULSEN C.J. & RIBBE J., 2009. Simulation of the Middle Miocene Climate Optimum. *Geophys. Res. Lett.*, 36: L04702.
- YVERNAULT P., 1972. La Faune des poissons d'eau douce en Charente-Maritime. 154 p. La Rochelle : Imprimerie de l'Ouest.

#### Z

- ZARDOYA R. & DOADRIO I., 1999. Molecular Evidence on the Evolutionary and Biogeographical Patterns of European Cyprinids. *J. Mol. Evol.*, 49: 227-237.
- ZHANG D.-X. & HEWITT G.M., 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.*, 11: 247-251.

# **GLOSSAIRE**

ADN : Acide désoxyribo-nucléique. Molécule organisée en longue chaîne, portant le code génétique, chez toutes les espèces invasives.

ADN mitochondrial : partie mineure de l'ADN des organismes contenue dans les mitochondries du cytoplasme des cellules. Transmis aux descendants par la mère seule

ADN nucléaire : partie majeure de l'ADN des organismes évolués, située dans les chromosomes, eux même situés dans le noyau des cellules. Généralement transmis aux descendants par les deux parents.

Allèles : variants d'un même gène issu d'une ou plusieurs mutations.

Allopatrie : caractéristique de deux population ou espèces vivant sur des territoires géographiquement séparés.

Barcoding : technique d'identification moléculaire d'un individu à partir du marqueur du COI

Dulçaquicole : se dit d'une plante ou d'un animal qui vit en eau douce.

Endémique : se dit d'une espèce ayant une localisation géographique limitée.

Espèce cryptique : espèces impossible à distinguer par leur morphologie, souvent découvertes lors d'analyses génétiques.

Euryèce : adjectif caractérisant une espèce qui peut supporter d'importantes variations visà-vis de facteurs écologiques, tels que la température. L'adjectif contraire d'euryèce est sténoèce.

Evolution : processus général des organismes vivants qui leur permet de se transformer au cours des temps géologiques en se complexifiant. Les phénomènes de base sont la mutation et la sélection.

Génome : ensemble du matériel génétique d'une cellule, composé chez les animaux par l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial

Introgression : apport exogène d'allèles dû à un flux génique entre populations ou espèces.

Introns : partie non codées des gènes, entre deux exons, siège de mutations nombreuses servant de marqueur hypervariable.

Lentique : désigne un biotope et les êtres vivants propres aux écosystèmes d'eaux calmes à renouvellement lent (lacs, marécages, étangs, mares, etc.) par opposition aux milieux d'eaux courantes qui correspondent aux écosystèmes lotiques.

Lotique: voir Lentique.

Mitogénome : génome mitochondrial.

Monophylétique : se dit d'un groupe de taxons descendant tous d'un même ancêtre.

Morpho-méristique : technique d'analyse morphologique d'individus à partir d'une série de rapports de mesures des différentes parties du corps de l'animal, et des comptages d'écailles, de rayons de nageoires et de vertèbres.

Morphométrie : technique d'analyse morphologique comparant les formes générales des individus et les distances entre des points repères.

Phylogénie moléculaire : reconstitution hypothétique de l'histoire d'apparition des taxons à partir des variants moléculaires qu'ils possèdent ; elle est souvent représentée sous forme d'arbre.

Phylogéographie : science qui s'attache à relier les différents variants avec leur distribution géographique afin de reconstituer les migrations dont ils sont issus.

Population : unité fonctionnelle d'organisation des êtres vivants caractérisée par sa panmixie (reproduction au hasard de tous ses membres).

Rhéophile : se dit des organismes qui aiment les zones de courant.

Spéciation : processus de différentiation de deux parties au moins d'une espèce, aboutissant à l'isolement reproducteur et à la formation de deux espèces filles.

Sympatrie : caractéristique de deux populations ou espèces partageant le même biotope ou le même territoire.

Taxon : unité nominale distincte pouvant être une population différenciée ou une espèce.

**RESUME**: La publication du catalogue des poissons d'eau douce européens par Kottelat et Freyhof en 2007, dans lequel les auteurs listent 16 espèces natives supplémentaires en France, a montré l'intérêt d'une révision taxonomique de l'ichtyofaune française et européenne. L'objectif de la thèse était de réviser 5 genres de poissons d'eau douce de France selon une approche de taxonomie intégrative en utilisant des données morphologies, moléculaires et écologiques : Squalius (chevesne), Phoxinus (vairon), Gobio (goujon), Esox (brochet) et Gasterosteus (épinoche). Plus de 1700 individus ont été collectés dans 283 stations en France, observés et analysés morphologiquement, et enregistrés dans les collections du MNHN. Plus de 460 spécimens ont fait l'objet d'analyses génétiques, dont pour certains le séquençage du mitogénome. Nous avons également réalisé une comparaison des robes nuptiales de vairons entre les bassins, ainsi qu'une analyse des niches occupées par les différentes espèces supposées de goujons. Les résultats confirment la présence de 2 espèces de chevesnes en France S. cephalus et S. laietanus. L'utilisation des données moléculaire invalide G. gymnurus et il n'y aurait ainsi qu'une seule espèce d'épinoche G. aculeatus. L'utilisation des collections a indiqué la présence de 3 espèces de brochet : E. lucius, E. cisalpinus et une nouvelle pour la science E. aquitanicus. La comparaison des robes nuptiales corroborée par la génétique discrimine 6 espèces de vairons dont P. phoxinus, P. bigerri, P. septimaniae, et P. marsilii qui serait valide, ainsi que deux espèces nouvelles. Enfin l'utilisation des données morphologiques, moléculaires, et écologiques corrobore 3 des 4 espèces de goujons (G. gobio, G. lozanoi et G. occitaniae ; G. alverniae serait synonyme junior de ce dernier). Ces nouvelles données en taxonomie confirment les lacunes dans les connaissances sur notre ichtyofaune dulçaquicole et ouvrent de nouvelles perspectives de recherche dans beaucoup de disciplines en biologie. Cette étude devrait être étendue à l'ensemble des taxons français.

**ABSTRACT**: The publication of the handbook of European freshwater fishes by Kottelat and Freyhof in 2007, in which the authors list 16 additional native species in France, set off a taxonomical revision of French and European ichthyofauna. The objective of the present thesis is to revise 5 genera of freshwater fishes of France in an integrative taxonomy framework using morphological, molecular and ecological data: Squalius (chub), Phoxinus (minnow), Gobio (gudgeon), Esox (pike) and Gasterosteus (three-spined stickleback). More than 1700 specimens were collected in 283 locations in France, studied and analyzed morphologically, before integration in the MNHN collections. More than 460 specimens were studied genetically, including complete mitogenome sequencing for a subset. Also we compared secondary sexual ornamentation of minnows among basins, as well as an analysis of the niches occupied by the different gudgeon species. The results confirm the presence of two chub species in France S. cephalus and S. laietanus. The use of molecular data invalidates G. gymnurus, so there is a single species of three-spined stickleback G. aculeatus. The study of collection material shows the presence of three pike species: E. lucius, E. cisalpinus and a previously undetected new species E. aquitanicus. Secondary sexual ornamentation corroborated by sequence data discriminates 6 minnow species, including P. phoxinus, P. bigerri, P. septimaniae, P. marsilii which would be valid, as well as two new species. The use of morphological, molecular and ecological data support 3 out of the 4 gudgeon species (G. gobio, G. lozanoi and G. occitaniae; G. alverniae would be a junior synonym of G. occitaniae). The new taxonomical data highlight the gaps in our knowledge of the French freshwater fauna. It opens new perspectives and opportunities of research in numerous fields of biology. However this kind of in-depth study should be applied to all French taxonomic groups.